

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Dr. rer. nat.



Rhabdovirus Envelope-Switching:
Untersuchungen zum Tropismus und Transport von
Rabies Viren

Vorgelegt von
Yvonne Klingen
München, 23. Juli 2008

Erstgutachterin:

PD Dr. Bettina Kempkes

Zweitgutachter:

PD Dr. Steffen Dietzel

Sondergutachter:

Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Tag der mündlichen Prüfung:

01. Dezember 2008

Wir die guten Willens sind
Versuchen das Unmögliche zu vollbringen.
Wir haben so lange so viel mit so wenig versucht,
das wir jetzt qualifiziert sind
fast alles mit nichts zu bewerkstelligen.

(Unbekannter Autor)

I. Inhaltsverzeichnis:

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungen und Tabellen.....	VI
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1.	Einleitung	1
1.1.	Das Tollwutvirus.....	1
1.1.1.	Die Krankheit	1
1.1.2.	Das Tollwutvirus und weitere Viren aus der Gattung der Lyssaviren	2
1.1.3.	Die Molekularbiologie des Tollwutvirus	4
1.1.4.	Das Glykoprotein des Tollwutvirus und seine Rezeptoren	7
1.1.5.	Der retrograde axonale Transport	8
1.2.	Das Glykoprotein EnvA des <i>Avian Sarcoma und Leukosis Virus</i> der Subgruppe A (ASLV-A) und sein Rezeptor Tva	9
1.3.	Die Inkorporation von Fremdproteinen in die Virushülle der Rhabdoviren	10
1.4.	Rhabdoviren als Vektoren	11
1.5.	Das Prionprotein.....	13
1.5.1.	Spongiforme Enzephalopathien.....	13
1.5.2.	Die Struktur des zellulären, murinen Prionproteins und seine Funktion ..	13
1.6.	Aufgabenstellung	15
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Material	16
2.1.1.	Geräte.....	16
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3.	Vorgefertigte Systeme (Kits).....	16
2.1.4.	Puffer und Zellkulturmedien	17
2.1.5.	Chemikalien	18
2.1.6.	Weitere Reagenzien.....	18
2.1.7.	Enzyme	19
2.1.8.	Antikörper	19
2.2.	Konstruktion der verwendeten RFP/RV G Fusionsproteine	20

2.3. Chimäre PrP^C Fusionsproteine mit RV G- oder <i>Borna Disease Virus</i> (BDV)-Anker.....	21
2.4. Klonierung von verwendeten Plasmiden.....	22
2.4.1. Lyssavirus Glykoprotein exprimierende Plasmide.....	22
2.4.2. tm-RFP Expressionsplasmide	22
2.4.3. Rekombinante Tollwutvirus cDNA-Klone mit tm-RFP	23
2.4.4. PrP ^C Expressionsplasmide	24
2.4.5. cDNA-Klone mit PrP ^C Fusionsprotein.....	25
2.5. DNA, Bakterienstämme, Virusstämme und Zelllinien	25
2.5.1. DNA	25
2.5.2. Bakterienstämme	30
2.5.3. Virusstämme.....	30
2.5.4. Zelllinien	32
2.6. Methoden.....	33
2.6.1. Zellkultur	33
2.6.1.1. Passagieren von Zellen.....	33
2.6.1.2. Einfrieren von Zellen	33
2.6.1.3. Auftauen von Zellen.....	33
2.6.1.4. Transfektion von Zellen.....	33
2.6.1.5. Differenzierung von Neuroblastomazellen	35
2.6.1.6. Herstellung von stabilen Zelllinien	35
2.6.2. Immunfluoreszenz.....	36
2.6.3. Das konfokale Laserfluoreszenzmikroskop.....	37
2.6.3.1. Benutzung des konfokalen Laserfluoreszenzmikroskops.....	38
2.6.3.2. Die Bildverarbeitung mit ImageJ	39
2.6.4. Arbeiten mit Viren	39
2.6.4.1. Herstellung rekombinanter Tollwutviren aus cDNA (Virus rescue)	39
2.6.4.2. Herstellung rekombinanter, G-defizienter Tollwutviren aus cDNA (modifizierter Virus rescue).....	40
2.6.4.3. Herstellung rekombinanter, G-defizienter Pseudotyp-Tollwutviren mit Hilfe einer transkomplementierenden Zelllinie	40
2.6.4.4. Herstellung rekombinanter, G-defizienter Pseudotyp-Tollwutviren mit Hilfe eines transkomplementierenden Plasmides	41
2.6.4.5. Herstellung von RV Virusstocks.....	41

2.6.4.6. Herstellung von rekombinanten MVA Virusstocks.....	41
2.6.4.7. Ankonzentrierung von virushaltigen Überständen mittels Sucrosekissen	42
2.6.4.8. Ankonzentrierung von virushaltigen Überständen mittels Iodixanol- Gradienten	42
2.6.4.9. Bestimmung des Virustiters	43
2.6.5. Verwendung von <i>E.coli</i>	44
2.6.5.1. Anzucht von <i>E.coli</i>	44
2.6.5.2. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	45
2.6.5.3. Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien	45
2.6.5.4. Plasmid-DNA Präparation aus <i>E.coli</i>	46
2.6.6. Arbeiten mit DNA	47
2.6.6.1. Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR))	47
2.6.6.2. Aufreinigung von DNA über Silicasäulen.....	47
2.6.6.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese	47
2.6.6.4. Eluation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	48
2.6.6.5. DNA Modifikationen.....	48
2.6.6.7. Sequenzierung von DNA.....	49
2.6.7. Arbeiten mit RNA	49
2.6.7.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Virus-infizierten Zellen	49
2.6.7.2. Reverse Transkriptase (RT)-PCR	50
2.6.8. Arbeiten mit Proteinen	50
2.6.8.1. Deglykosylierung von Proteinen	50
2.6.8.2. Auftrennung von Proteinen mittels denaturierender Polyacrylamidgele (SDS-PAGE)	51
2.6.8.3. Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose- oder Polyvenyldifluorid (PVDF)-Membranen (Western Blot).....	52
3. Ergebnisse	54
3.1. Die Inkorporation von Glykoproteinen der Lyssaviren Mokola, <i>Bat</i> Hamburg und Lagos <i>Bat</i> in G-defiziente RV Partikel	54
3.2. Die Spezifität für neuronale Zellen wird durch die inkorporierten Glykoproteine der Lyssaviren vermittelt	55

3.3. Die Inkorporation des EnvA-Fusionsproteins (EnvARGCD) in G-defiziente RV Partikel ermöglicht eine hohe Zelltypspezifität	57
3.4. Die Herstellung des RFP-Fusionsproteins als synthetisches Typ I Transmembranprotein	60
3.4.1. Die Überprüfung der Glykosylierungsstellen in tm-RFP(Asn) und tm-RFP(Asn319)	62
3.5. Die Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der RFP-Fusionsproteine	63
3.5.1. Die Oberflächenexpression der RFP-Fusionsproteine	64
3.5.2. Die Herstellung und Analyse von tm-RFP exprimierenden Zelllinien	65
3.5.3. Die Koloalisation von tm-RFP mit RV G und RV M.....	67
3.5.4. Die Inkorporation von tm-RFP in G-defiziente RV Partikel.....	69
3.6. Die Konstruktion von rekombinanten Tollwutviren, welche ein Fremdgen vom Genom exprimieren	70
3.6.1. Die tm-RFP exprimierenden, infektiösen Viren.....	70
3.6.2. Die Rekombinanten, infektiösen Viren: Koinorporation von tm-RFP oder tm-RFP(Asn) und RV G in Virionen	71
3.6.3. Die Infektiösität der Mosaikviren mit RV G und tm-RFP, tm-RFP(Asn) oder tm-RFP(Asn319)	74
3.7. RFP und eGFP markierte Tollwutviren.....	76
3.7.1. Die Analyse der tm-RFP und eGFP markierten Tollwutviren.....	77
3.8. <i>Live-imaging</i> Experimente mit fluoreszierenden Viruspartikeln.....	78
3.8.1. Die umhüllten Viren werden in den axonalen Ausläufern von ausdifferenzierten NS20Y Zellen und primären Nervenzellen transportiert	80
3.8.1.1. Die Ausdifferenzierung der NS20Y Zellen	81
3.8.1.2. Die RV Partikelbewegungen in den ausdifferenzierten NS20Y Zellen .	82
3.8.1.3. Die RV Partikelbewegungen in primären Zellen	86
3.9. Das PrP ^C -Fusionsprotein	88
3.9.1. PrP ^C exprimierende, M- und G-defiziente Tollwutviren	89
3.9.2. Keine Inkorporation des verkürzten PrP ^C mit RVG-Anker in G-defiziente RV Partikel.....	90
3.9.3. Die Verwendung verschiedener Komplementierungssysteme und Bedingungen führten zu keiner Inkorporation von PrP ^C in RV Partikel..	91

3.9.4. PrP ^C und RV G zeigten eine ähnliche Verteilung innerhalb der Zelle.....	96
3.9.5. Keine Kolokalisation von PrP ^C und RV M innerhalb der Zelle.....	98
4. Diskussion.....	100
4.1. Inkorporation von Fremdproteinen in RV Virionen	100
4.2. Die Verwendung von Tollwutviren als neuronale Tracer	106
4.3. <i>Live-imaging</i> Experimente mit fluoreszierenden Viruspartikeln.....	108
5. Zusammenfassung.....	112
6. Summary	113
7. Literaturverzeichnis.....	114
8. Anhang	126
8.1. Publikation	126
8.2. Danksagung.....	127
8.3. Curriculum Vitae.....	129
8.4. Ehrenwörtliche Erklärung	130

II. Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

Abb. 1: Genomorganisation und Aufbau des Tollwutvirus	6
Abb. 2: Inkorporation von Fremdproteinen in die RV Hülle	11
Abb. 3: Herstellung und Verwendung der EnvARGCD pseudotypisierten SAD ΔG Virionen	59
Abb. 4: Schematische Darstellung der chimären RFP/RV G Konstrukte.....	61
Abb. 5: Überprüfung der Glykosylierungsstellen von tm-RFP(Asn) und tm-RFP(Asn319)...	63
Abb. 6: Oberflächenexpression der chimären RFP/RV G Proteine	64
Abb. 7: tm-RFP Expression und Transport in den stabilen Zelllinien BSR T7/5 tm-RFP und NA tm-RFP	66
Abb. 8: tm-RFP kolokalisiert mit den RV Proteinen G und M.....	68
Abb. 9: Inkorporation von tm-RFP in die Virushülle der G-defizienten SAD ΔG Virionen..	69
Abb. 10: Schematische Darstellung der rekombinanten, tm-RFP exprimierenden Viren	70
Abb. 11: Analyse der tm-RFP und RV G exprimierenden Viren	73
Abb. 12: Inkorporation von RV G und tm-RFP in Viruspartikel.....	75
Abb. 13: Schematische Darstellung der hergestellten zweifarbigen Viren.....	76
Abb. 14: Herstellung der zweifarbig-markierten RV	78
Abb. 15: Detektion der fluoreszenz-markierten RV Partikel in lebenden Zellen	80
Abb. 16: Morphologie der NS20Y Zellen.....	81
Abb. 17: RV Partikelbewegungen in axon-ähnlichen Strukturen von NS20Y Zellen.....	85
Abb. 18: RV Partikelbewegungen in DRGs.....	87
Abb. 19: Schematische Darstellung der PrP ^C -Fusionskonstrukte	89
Abb. 20: Schematische Darstellung der PrP ^C -exprimierenden, M- und G-defizienten Viren .	90
Abb. 21: Das verkürzte PrP ^C mit RVG-Anker wird nicht in G-defiziente Viruspartikel inkorporiert.....	91
Abb. 22: PrP ^C hemmt die Bildung von intakten, umhüllten RV Partikeln	95
Abb. 23: PrP ^C und RV G zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster in infizierten BSR 136MGon Zellen.....	97
Abb. 24: Lokalisation von PrP ^C und RV M in virus-infizierten 532-136 Zellen.....	99

Tabellen:

Tab. 1: Die Ordnung <i>Mononegavirales</i> (1) (nach ICTV (<i>Index of virus classification and nomenclature</i>)).....	3
Tab. 2: In der Zellkultur eingesetzte Medien und Zusätze.....	18
Tab. 3: Verwendete Antikörper.....	19
Tab. 4: Verwendete Plasmide im Einzelnen	26
Tab. 5: Klonierungsprimer	29
Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Viren.....	30
Tab. 7: Für die Promotion verwendete Zelllinien	32
Tab. 8: Inkorporation der Lyssaviren Glykoproteine erzeugte eine hohe neuronale Spezifität	56
Tab. 9: Infektiöse Titer der G-defizienten, mit EnvARGCD pseudotypisierten Viren.....	58

III. Abkürzungsverzeichnis

16G	Glykoprotein des Mokola Lyssavirus
58G	Glykoprotein des Lagos <i>Bat</i> Lyssavirus
α	anti, alpha
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABLV	Australisches Fledermaus Lyssavirus (<i>Australien bat lyssavirus</i>)
Ac	Acetat
AG	Arbeitsgemeinschaft
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	Cytosine- β -D-arabinofuranoside
Arg	Argenin
AS	Aminosäure(n)
ASLV-A	Avian Sarkoma-Leukosis Virus der Subgruppe A (<i>Avian sarkoma and leukosis virus type A</i>)
Asn	Asparagin
(Asn)	Synthetische Glykosylierungsstelle
(Asn319)	Glykosylierungsstelle 319 des Tollwutvirus Glykoproteins
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
BDV	<i>Borna Disease Virus</i>
BDVan	<i>Borna Disease Virus</i> -Anker
BH	<i>Bat</i> Hamburg
BHK	Babyhamster-Nierenzellen (<i>Baby hamster kidney cells</i>)
BSE	bovine spongiforme Encephalopathie
Bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
Ca ₂ Cl	Kalziumchlorid
Ca ₂ PO ₄	Kalziumphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3,5-monophosphat
Cap	5'-cap Struktur eukaryotischer mRNAs (7-Methyl-G)
CAT	Chloramphenikol
CD4	<i>Clusters of Differentiation 4</i>

cDNA	komplementäre DNA
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
cm ²	Quadratzentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CoA	Koenzym A
CPE	cytopathischer Effekt
C-terminal	Carboxy-terminal
CTP	Cytosintriphosphat
CVS	Tollwutvirusstamm <i>Challenge Virus Strain</i>
CXCR	Chemokinrezeptor
Cy	Carbocyanin
Δ	delta
D	Glutamat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DLC	Leichte Kette des Dyneinproteins (<i>dynein light chain</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DRG	<i>Dorsal root ganglion</i>
ds	Doppelstrang
DsRed	Rot-fluoreszierendes Protein (<i>red fluorescent protein</i>) von <i>Discosoma sp.</i>
DTT	Dithiothreitol
DUVV	Duvenhage Virus
E14	embryonale Mausneuronen
EBLV	Europäisches Fledermaus Lyssavirus (<i>European bat lyssavirus</i>)
eCFP	Verstärktes cyanfarben fluoreszierendes Protein (<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>)
EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure
EEA1	<i>Early endosomal antigene 1, early endosome associated protein</i>

eGFP	Verstärktes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
eGFP-P	Fusionsprotein aus eGFP und Tollwutvirus Phosphoprotein
EndoH	Endoglykosidase H
Env	Hüll(e) (<i>envelope</i>)
EnvARGCD	Fusionsprotein aus dem Hüllprotein des ASLV TypA (EnvA) und der zytoplasmatischen Domäne (CD) des Tollwut Glykoproteins (G)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERA	Tollwutvirusstamm
et al.	<i>et alii</i>
Fc	Konstante Region eines Antikörpers
FFU	Fokus bildende Einheit (<i>focus forming unit</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
Fw	Vorwärts (<i>forward</i>)
G	Guanin, Glykoprotein
g	eGFP
G418	Geneticin
Gan	Tollwutvirus Glykoprotein Anker
Gcvs	Glykoprotein des Tollwutvirusstammes <i>Challenge Virus Strain</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
Gly	Glyzin
GM130	Golgi-Matrixprotein 130
gp37	Glykoproteinuntereinheit 37
gp85	Glykoproteinuntereinheit 85
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	deionisiertes Wasser
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
I	Isoleucin

ICTV	<i>Index of virus classification and nomenclature</i>
IgG	Immunoglobulin G
IHNV	<i>Infectious hematopoietic necrosis virus</i>
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor (<i>interferon regulatory factor</i>)
JAK	Januskinase
K	Lysin
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
λ	lambda, Wellenlänge
L	Leucin, grosse Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase
LacZ	Gen der β -Galaktosidase
LB	<i>Luria Broth</i>
LBV	Lagos-Fledermausvirus (<i>Lagos Bat Virus</i>)
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (<i>low density lipoprotein</i>)
LNYV	<i>Lettuce necrotic yellows virus</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
M	Matrixprotein
mCherry	rot-fluoreszierende DsRed Variante
MEM	Minimalmedium (<i>minimal essential medium</i>)
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	infektiöse Einheit pro Zelle (<i>multiplicity of infection</i>)
MOKV	Mokolavirus (<i>Mokolavirus</i>)
MPa	Megapascal
mRNA	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
MVA	Vacciniavirus (<i>Modified Vaccinia Ankara</i>)
MVV	Multivesikuläres Vesikel

N	Nukleoprotein, Amino
NaAc	Natriumacetat
NACHR	Nikotinacetylcholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCAM	neuronale Adhäsionsmolekül
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i>
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NKS	Neugeborenes Kälberserum
nm	Nanometer
N/P	Nukleoprotein/Phosphoprotein Gengrenze im Tollwutvirusgenom
NP40	Nonidet P40
NS	Nichtstruktur
nt	Nukleotid
N-terminal	Amino-terminal
nvCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
P	Phosphoprotein, Protein
p75NTR	p75 Neurotrophin Rezeptor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Plaque bildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>), <i>Pyrococcus furiosus</i>
p.i.	nach der Infektion (<i>post infection</i>)
Pipes	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
pmol	Picomol
PNGaseF	Peptide-N-Glykosidase F
PO	Peroxidase
Poly-A	Polyadenylat
Pr95	Prekursor 95

PrP ^C	zelluläres Prionprotein
PrP ^{Sc}	Prionprotein Scrapie, die pathogene Isoform des Prionproteins
P/S	Penicillin-Streptomycin-Lösung
p.t.	nach der Transfektion (<i>post transfection</i>)
PVDF	Polyvenyldifluorid
PYDV	<i>Potato yellow dwarf virus</i>
R	Arginin
r	DsRed
RABV	Tollwutvirus
RCFP	Fluoreszentes Protein aus Riffkorallen (<i>reef coral fluorescent protein</i>)
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein (<i>red fluorescent protein</i>)
RLU	relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RSV	Respiratorisches Synzytial Virus
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
RV	Tollwutvirus (<i>rabies virus</i>), Rückwärts (<i>Reverse</i>)
RV G	Tollwutvirus Glykoprotein
RV L	grosse Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Tollwutvirus
RV M	Tollwutvirus Matrixprotein
RV N	Tollwutvirus Nukleoprotein
RV P	Tollwutvirus Phosphoprotein
SAD B19	Tollwutvirus-Impfstamm <i>Street Alabama Dufferin B19</i>
SAD L16	rekombinanter Tollwutvirusstamm des parentalen Stammes SAD B19
SAP	<i>shrimp</i> alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
sp	Signalpeptid
SS	Signalsequenz
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
SU	Oberflächen-Untereinheit

T	Thymin
T7	T7-Bakteriophage
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TC	Transportcontainer
tdtomato	tandem tomato Protein
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TEN	Tirs-EDTA-NaCl-Puffer
Tet	Tetracyclin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Thr	Threonin
tm	Transmembran-Anker bestehend aus der C-terminalen RV G Proteinsequenz
TM	Transmembran-Untereinheit
tm-RFP	Fusionsprotein aus RFP und Transmembran-Anker des RV G
tm-RFP(Asn)	Fusionsprotein aus RFP und Transmembran-Anker des RV G mit synthetischer Glykosylierungsstelle
tm-RFP(Asn319)	Fusionsprotein aus RFP und verlängertem tm des RV G mit Glykosylierungsstelle 319
Tricin	N-(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSE	<i>transmissible spongiform encephalopathies</i>
TVA800	Rezeptor 800 des ASLV-A (tv steht hier für Tumovirus)
U	Einheiten (<i>units</i>)
u.a.	unter anderem
VSV	Virus der vesikulären Stomatitis (<i>vesiculo stomatitis virus</i>)
vTF7	rekombinantes Vacciniavirus, das die T7 RNA Polymerase exprimiert
<i>wt</i>	<i>Wildtyp</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Ausserdem wurden die Abkürzungen der internationalen Einheiten des „Système International d’unités (SI) und die chemischen Elementsymbole benutzt.

1. Einleitung

1.1. Das Tollwutvirus

1.1.1. Die Krankheit

Tollwut (*Rabies*) ist eine der am längsten bekannten Erkrankungen in der Menschheitsgeschichte. Erste Fälle von Tollwut beim Menschen wurden schon 2300 vor Christus beschrieben. Tollwut ist eine Zoonose; epidemiologisch sind grundsätzlich die „urbane Wut“ und die „sylvatische Wut“ oder „Wildtollwut“ voneinander zu unterscheiden. Auf der nördlichen Halbkugel überwiegt die Wildtollwut; als Überträger kommen Füchse, Wölfe und Dachse in Europa und Asien, sowie Waschbären und Stinktiere auf dem nordamerikanischen Kontinent in Frage (99). Obwohl sich 2003 in Südamerika erstmals mehr Menschen durch Kontakt mit Wildtieren als durch Hundebisse mit dem Tollwutvirus (*Rabies Virus* (RV)) infiziert haben (2), wird das Tollwutvirus auf der südlichen Halbkugel meist von streunenden, herrenlosen Hunden auf den Menschen übertragen (urbane Wut) (99). In letzter Zeit sind vor allem blutsaugende und fruchte-oder insektenfressende Fledermäuse als Reservoir von Tollwutviren in einigen Teilen der Welt (z.B. Amerika und Australien) in den Fokus des Interesses geraten. „Die Epidemiologie der Fledermaustollwut ist jedoch unabhängig von der restlichen Wildtollwut“ (99).

Die Übertragung des Tollwutvirus erfolgt über den Speichel infizierter Tiere (hauptsächlich durch Bisse oder Kratzer). Die Inkubationszeit variiert hierbei von wenigen Tagen bis hin zu in Ausnahmefällen einigen Jahren nach der Exposition. Die durchschnittliche Inkubationszeit beträgt jedoch zwei bis sieben Wochen (99).

Die ersten Symptome einer Tollwuterkrankung sind zunächst meist sehr unspezifisch wie Kopfschmerzen, Gelenksteife und Fieber (2, 99). Im akuten Stadium kann es eine Phase der „rasenden Wut“ mit z.B. Hydrophobie, Schluckkrämpfen und erhöhtem Speichelfluss und/oder eine „stille Wut“ mit Lähmungen, Bewusstlosigkeit und Koma geben; in beiden Fällen entwickelt sich eine komplette Lähmung der Muskulatur, der dann der Tod durch Atemlähmung folgt (2, 99). Zeigen sich die ersten Symptome einer Tollwuterkrankung, so endet die Krankheit tödlich sowohl bei Menschen als auch Tieren (2).

Louis Pasteur hat 1882 erstmals einen Impfstoff gegen Tollwut entwickelt. Seit 1980 gibt es Impfstoffe, die *in vitro* gezüchtete, abgetötete Tollwutviren enthalten und in der Human- sowie Tiermedizin eingesetzt werden. Nach Exposition erfolgt eine Exponiertenprophylaxe bestehend aus Wundversorgung, passiver Immunisierung mit neutralisierenden Antikörpern

gegen das Glykoprotein (G)-Protein und einer aktiven Impfung mit abgetöteten Tollwutviren (99).

Die Anzahl der humanen Tollwutviruserkrankungen wurde 2004 auf 55.000 Fälle pro Jahr geschätzt (2), wobei die meisten Fälle in ländlichen Gegenden von Afrika und Asien zu finden sind. Durch die Einführung der Impfung von Hunden und Katzen und der oralen Impfkampagnen zur Impfung der Wildtiere gegen Tollwut in West-Europa und Nordamerika konnte die Anzahl der humanen Tollwuterkrankungen stark reduziert werden (2).

1.1.2. Das Tollwutvirus und weitere Viren aus der Gattung der Lyssaviren

Das Tollwutvirus gehört zur Ordnung der *Mononegavirales*, in der die Negativ-Strang RNA-Viren mit nicht-segmentiertem Genom zusammengefasst sind. Es handelt sich um einen neurotrophen Vertreter aus der Familie der *Rhabdoviridae* und der Gattung der *Lyssaviren*. Zur Gattung der Lyssaviren gehören neben dem Tollwutvirus (*Rabies virus* (RABV), Genotyp 1), das Lagos-Fledermausvirus (Lagos *Bat* Virus (LBV), Genotyp 2), das Mokolavirus (MOKV, Genotyp 3), das Duvenhage Virus (DUVV, Genotyp 4), die europäischen Fledermaus Lyssaviren *Bat* Hamburg (*European bat lyssavirus* (EBLV) 1, Genotyp 5) und EBLV2 (EBLV2, Genotyp 6) und das australische Fledermaus Lyssavirus (*Australien bat lyssavirus* (ABLV), Genotyp 7). Vergleiche der antigenischen Strukturen der verschiedenen Lyssaviren haben gezeigt, dass sich diese unterscheiden (30). Zusätzliche serologische Untersuchungen, die molekulare Charakterisierung der Lyssaviren und Versuche durch Kreuzreaktionen auch Immunität vor verwandten Lyssaviren zu erzielen, haben gezeigt, dass die Unterschiede zwischen Tollwutvirus und Mokolavirus am größten sind (8, 30, 90, 91, 93, 94). Die Struktur der Glykoproteine ist sich jedoch ähnlich genug, um einen Austausch des Tollwut Glykoproteins gegen z.B. das Mokola Glykoprotein zu erlauben (94). Die anderen Familien dieser Ordnung sind die *Paramyxoviridae*, die *Filoviridae* und die *Bornaviridae*. Tab. 1 zeigt einen Überblick über die Ordnung *Mononegavirales* und ihrer Familien und Gattungen.

Einleitung

Virusfamilie	Unterfamilie	Genus	Wichtige Vertreter
<i>Rhabdoviridae</i>		<i>Vesiculovirus</i>	Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) Chandipuravirus
		<i>Lyssavirus</i>	Tollwutvirus Lagos Fledermaus Virus Mokolavirus Duvenhage Virus Europäisches Fledermaus Lyssavirus 1 Europäisches Fledermaus Lyssavirus 2 Australisches Fledermaus Lyssavirus
		<i>Ephemerovirus</i>	<i>Bovine ephemeral fever virus</i>
		<i>Novirhabdovirus</i>	<i>Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)</i>
		<i>Cytorhabdovirus</i>	<i>Lettuce necrotic yellows virus (LNYV)</i>
		<i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>Potato yellow dwarf virus (PYDV)</i>
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i> <i>Morbillivirus</i>	Sendai Virus Masernvirus Rinderpest Virus
		<i>Rubulavirus</i>	Parainfluenza Virus 2 und 4 Mumps Virus
		<i>Henipavirus</i>	Nipah Virus Hendra Virus
		<i>Avulavirus</i>	<i>Newcastle disease virus</i> <i>Avian Paramyxovirus 2-9</i>
	<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i> <i>Metapneumovirus</i>	Respiratorisches Synzytialvirus <i>Avian Metapneumovirus</i>
<i>Bornaviridae</i>		<i>Bornavirus</i>	<i>Borna disease virus (BDV)</i>
<i>Filoviridae</i>		<i>Marburgvirus</i> <i>Ebolavirus</i>	Marburgvirus Ebolavirus

Tab. 1: Die Ordnung *Mononegavirales* (1) (nach ICTV (*Index of virus classification and nomenclature*))

Die Ordnung *Mononegavirales*, in der die nicht-segmentierten Negativ-Strang RNA-Viren zusammengefasst sind, umfasst vier Familien: die *Rhabdoviridae*, die *Paramyxoviridae*, die *Bornaviridae* und die *Filoviridae*. Die Familie der *Paramyxoviridae* wird in zwei Unterfamilien, die *Paramyxovirinae* und die *Pneumovirinae* unterteilt. Für jeden Genus ist mindestens ein typischer Vertreter aufgelistet (1) (nach ICTV).

1.1.3. Die Molekularbiologie des Tollwutvirus

Alle Virionen von Vertretern der Ordnung *Mononegavirales* sind mit einer Membranhülle umgeben, die sich aus der Membran der Wirtszelle herleitet und in welche die viralen Glykoproteine inseriert sind. Neben dem Gesamtgenom des Tollwutvirus (17, 148) wurden ebenfalls die Genome von Vertretern der Genotypen 3 (77), 5 (68, 83), 6 (83) und 7 (50) charakterisiert. Das Genom besteht aus einem einzelnen Negativ-Strang RNA-Molekül von 12 kb. Es kodiert für die fünf Strukturproteine in der Reihenfolge: Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Glykoprotein (G) und die katalytische Untereinheit L (*large*) der RNA-abhängigen RNA Polymerase, welche alle für die Virusreplikation und die Virusbildung essentiell sind. Die Genomorganisation wird in Abb. 1 anhand des Tollwutvirusgenoms dargestellt. Die virale RNA ist von dem Nukleoprotein fest umhüllt und bildet zusammen mit dem Phosphoprotein als RNA-Polymerase Kofaktor (36) und der katalytischen Untereinheit L der RNA-abhängigen RNA Polymerase den transkriptionsaktiven (3) Ribonukleoproteinkomplex (RNP) (54). Das Phosphoprotein fungiert jedoch nicht nur als Kofaktor für die RNA-abhängige RNA-Polymerase, sondern hat wie auch die anderen Proteine des Tollwutvirus vielfältige Funktionen. Neben seiner Funktion bei der Verpackung des Virusgenoms durch die Chaperonaktivität des N Proteins (23, 58), agiert P als Interferon α/β -Antagonist und verhindert die transkriptionelle Aktivierung der Typ I Interferone durch die Blockierung der Phosphorylierung des Interferon-regulatorischen Faktors (IRF) 3 (13). Des Weiteren wird durch die Bindung von P an die Tyrosin-phosphorylierten Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT)s der Kerntransport der STATs blockiert und dadurch die Interferon α/β - und γ -induzierte Januskinase (JAK)/STAT-Signalkaskade gehemmt (13). Sowohl bei der Replikation als auch bei der Transkription, die beide ausschließlich im Zytoplasma erfolgen, dient das RNP als Vorlage. Neben dem RNP werden bei der Transkription noch die Proteine P und L, bei der Replikation zusätzlich noch das N Protein benötigt (107). Für die RNP Replikation ist eine konstante Menge an N Protein erforderlich, damit die neue RNA direkt wieder als RNP verpackt werden kann (108). In der Zelle wird zunächst das Genom, ausgehend von dem 3'-Ende Promotor der genomischen RNPs, der als *Leader* bezeichnet wird, repliziert. Dabei werden die Start/Stop-Sequenzen an den Gengrenzen ignoriert und es erfolgt auch keine Polyadenylierung. Die so erzeugte antigenomische RNA bzw. das RNP dient als Vorlage zur Herstellung weiterer Genomkopien. Hierbei werden beide Promotoren, der *Leader* sowie der replikationsaktivere *Trailer* verwendet. Die Transkription erfolgt ausschließlich an dem *Leader*-Promotor durch die virale Polymerase. Es entsteht hierbei eine monocistronische

Einleitung

mRNA. Die Transkription der fünf Tollwutvirusgene wird durch die Start/Stop-Gengrenzen, die durch kurze intergenische Regionen unterbrochen werden, gesteuert. Zunächst wird bei der Transkription eine kurze *Leader*-RNA gebildet, die weder eine Cap-Struktur besitzt, noch polyadenyliert wird. Diese *Leader*-RNA wird von dem RNA-Helikaseenzym *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) im Zytosol infizierter, eukaryotischer Zellen erkannt. Durch diese Erkennung kommt es zur Auslösung einer Interferonantwort ohne dass Replikation oder dsRNA-Bildung stattfinden muss (60). Nach der Bildung der *Leader*-RNA erfolgt die sequenzielle Transkription der Tollwutvirus mRNAs, die eine Cap-Struktur aufweisen und von der viruseigenen Polymerase mit einem Poly-A-Schwanz versehen werden. Von einer sequenziellen Transkription oder einem Transkriptionsgradienten spricht man, da an jeder Stoppgrenze ein Teil der transkriptionsaktiven Komplexe nicht mehr in der Lage ist, an der nachfolgenden Startsequenz mit der Transkription des nächsten Gens fortzufahren. Da die Transkription jeweils nur am *Leader* initiiert werden kann, werden die weiter nachfolgenden Gene schwächer transkribiert. Die Länge der intergenischen Regionen, die zwischen 2nt und 24nt beträgt, bestimmt dabei die Steilheit des Transkriptionsgradienten; lange intergenische Regionen verringern die Transkription der nachfolgenden Gene stärker als kurze. Eine sehr genaue Regulation von RNP-Replikation und Genexpression ist für eine erfolgreiche Virusinfektion unabdingbar. Dadurch wird sichergestellt, dass genügend virale Proteine, aber auch RNA vorhanden sind, um eine Virusformation zu ermöglichen, es jedoch nicht zur Produktion überschüssiger Virusproteine kommt. Die Balance zwischen RNP-Replikation und mRNA-Synthese wird von einem weiteren, multifunktionellen Virusprotein, dem Matrixprotein, reguliert (41, 44). Während des Prozesses des *Virusassembly* an der Zelloberfläche, werden die RNPs durch das Matrixprotein zu kompakten Einheiten kondensiert (96). Das Matrixprotein stellt dabei einen entscheidenden Faktor für das *Virusassembly* an der Zellmembran dar. Die innere Schicht aus Matrixproteinen vermittelt auch den Kontakt zur Virushülle, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, die von der Wirtszelle stammt. In diese Membran sind auch die transmembranen Glykoproteine des Tollwutvirus inkorporiert und formen dort nach außen zeigende, trimerische *Spikes*.

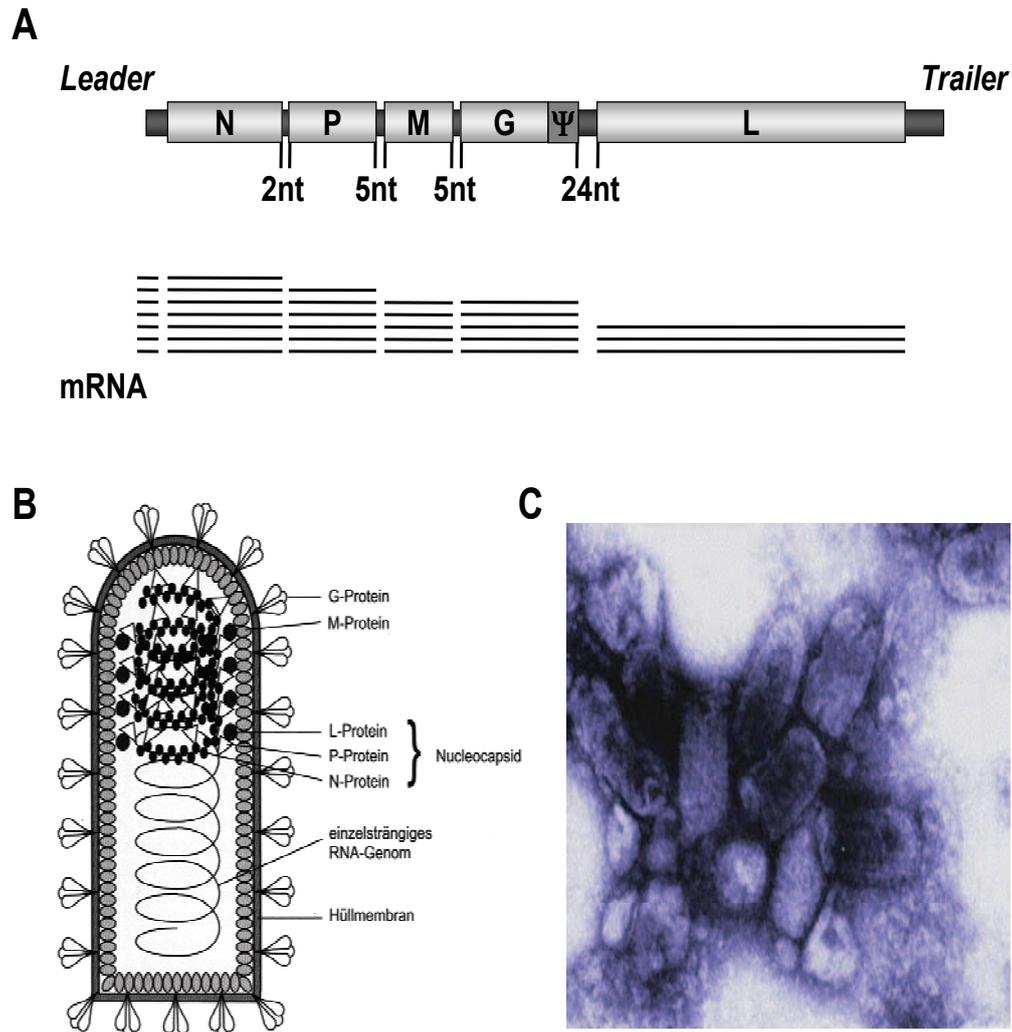


Abb. 1: Genomorganisation und Aufbau des Tollwutvirus

(A) Das Genom kodiert für die fünf Strukturproteine in der Reihenfolge: N, P, M, G und L. Die Transkription wird durch die Start/Stop-Gengrenzen gesteuert, die durch kurze intergenische Regionen (bestehend aus 2nt bis 24nt) unterbrochen werden. Da die Transkription jeweils nur am *Leader*-Promotor initiiert werden kann und die Transkription an den Gengrenzen attenuiert wird, werden die weiter nachfolgenden Gene schwächer transkribiert. Daraus resultiert der sogenannte Transkriptionsgradient. (B) Das virale RNA-Genom ist von dem Nukleoprotein fest umhüllt und bildet zusammen mit dem Phosphoprotein und der katalytischen Untereinheit L der RNA-abhängigen RNA Polymerase den transkriptionsaktiven RNP. Das RNP ist von einer inneren Schicht aus Matrixproteinen umgeben, welche das Genom kondensiert und den Kontakt zur Virushülle vermittelt. In die Virushülle sind die transmembranen Glykoproteine des Tollwutvirus inkorporiert, welche die nach außen zeigenden trimerische *Spikes* bilden. (C) Zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme von Tollwutvirionen (from www.wadsworth.org/rabies/).

1.1.4. Das Glykoprotein des Tollwutvirus und seine Rezeptoren

Das Glykoprotein ist ein Typ I Transmembranprotein. Es besitzt eine 19 Aminosäure (AS) lange Signalsequenz, die von zellulären Signalpeptidasen abgespalten wird. Das reife Protein besteht aus 505 AS. Als Ektodomäne wird der Bereich vom Amino (N)-Terminus bis zur AS 439 bezeichnet. Dann folgt die 22 AS lange Transmembrandomäne und zum Schluss die 44 AS lange Carboxy (C)-terminale, zytoplasmatische Domäne. Die trimerischen *Spikes* aus den Glykoproteinen stellen die Hauptantigene bei der Produktion von Virus-neutralisierenden und schützenden Antikörpern dar (20). Sie sind zudem für die starke Neuropathogenität der Tollwutviren verantwortlich (100) da diese die spezifische Bindung der Viren an ihre zellulären Rezeptoren vermitteln. G-defiziente Tollwutviren sind nicht in der Lage, sich in Zellkultur oder *in vivo* in Mausmodellen auszubreiten (37, 93). Die starke Korrelation von Glykoproteinsequenz und der Pathogenität eines RV Stammes zeigt sich im Vergleich von verschiedenen RV Stämmen. So ist der RV Stamm *Street Alabama Dufferin* (SAD) B19 in Mausexperimenten nach peripherer Applikation apathogen (43). Wird das Glykoprotein jedoch gegen das entsprechende Glykoprotein des RV Stammes *Challenge Virus Strain* (CVS) ausgetauscht, so führen diese rekombinanten Viren nach einer intraplantaren oder einer intramuskulären Injektion zu einer RV-Infektion, die mit dem Ursprungstamm SAD B19 nicht initiiert werden konnte (100). Eine geringere Pathogenität kann ebenfalls erreicht werden, wenn rekombinante Glykoproteine ohne den zytoplasmatischen Bereich verwendet werden (86, 93, 101). Da der zytoplasmatische Bereich des Glykoproteins eine wichtige Rolle bei der Inkorporation des Glykoproteins in die Virushülle spielt, entsteht hier die Virusattenuierung wohl durch die verringerte Inkorporation des Glykoproteins in die Virushülle und nicht durch eine veränderte Rezeptorbindung. Da *in vitro* neben neuronalen Zellen auch ein breites Spektrum an nicht-neuronalen Zellen verschiedener Tierspezies durch das RV infiziert werden, muss es neben Neuronen-spezifischen Rezeptoren auch einen oder mehrere weit verbreitete Rezeptoren geben, welche von den Tollwutviren genutzt werden können (117). Bislang sind nur drei Neuronen-spezifische Rezeptoren für die RV-Infektion bekannt. Diese Neuronen-spezifischen Rezeptoren wie der p75 Neurotrophin Rezeptor (p75NTR), das neuronale Adhäsionsmolekül (NCAM) oder der Nikotinacetylcholin-Rezeptor (NACHR) (78, 146, 150) erlauben den Tollwutviren einen effizienten Zutritt in neuronale Zellen. Nach der Rezeptorbindung erfolgt die Rezeptor-vermittelte Aufnahme der Viren in die Zelle und die Freisetzung der viralen RNPs und der Matrixproteine in das Zytoplasma durch eine pH-abhängig Membranfusion (45, 122). Mutationen der AS-Position 333 des Glykoproteins, die sich in der antigenischen Region III befindet, führen zu einer

verlangsamten Virusaufnahme durch die Zelle. Dadurch wird die Infektion von Motoneuronen und die Virusausbreitung in Neuroblastoma Zellen behindert. In erwachsenen Mäusen konnte zudem eine Reduktion in der Neuroinvasivität beobachtet werden (19, 31). Jedoch führen Mutationen an der AS-Position 333 nicht bei allen RV Stämmen zu einer Abnahme der Viruspathogenität (101). So hat bei ein bis zwei Tage alten Mäusen, welche ein noch nicht völlig ausgereiftes Immunsystem aufweisen, eine Mutation an der genannten Position keine Auswirkung auf die Pathogenität (100, 151).

1.1.5. Der retrograde axonale Transport

Der retrograde, axonale Transport stellt eine Hauptursache für die Neuropathogenität der Tollwutviren dar. In vivo kommt es nach einer peripheren Infektion zu einem raschen Transport des Virus in das Zentrale Nervensystem (ZNS). Dazu nutzen die Tollwutviren das zelluläre, Mikrotubuli-abhängige und Dyneinmotor-getriebene, retrograde Cargo-Transportsystem in den Axonen (53). Zwei unterschiedliche Dyneinmotor-getriebene Transportmechanismen sind möglich: (A) Phosphoprotein-vermittelter Transport von nackten RNP-Komplexen oder (B) Transport von kompletten, umhüllten Viruspartikeln in Transportvesikeln, vermittelt durch die Bindung des Glykoproteins an einen spezifischen, zellulären Rezeptor. Für das P Protein konnte in Kollokalisations-, *Yeast-two-hybrid*- und Western Blot-Experimenten gezeigt werden, dass es mit der *Dynein light chain* (DLC) (LC8), einer Komponente des Dyneinmotorkomplexes, interagiert (63, 116). Dies würde eine Freisetzung der viralen RNPs in das Zytoplasma vor dem Transportvorgang voraussetzen. Jedoch bleibt die Beteiligung des P Proteins an dem Transport der viralen RNP Komplexe unklar. In Zellkultur konnten bei einem Vergleich der Replikation von *Wildtyp* (*wt*) Tollwutviren und Tollwutviren mit mutierter DLC-Bindestelle keine Unterschiede festgestellt werden. Auch bei der peripheren Infektion von einer Woche alten BALB/c Mäusen mit diesen rekombinanten Viren konnte keine Verringerung der Neuropathogenität festgestellt werden (88). Es gibt deutlich mehr Hinweise, dass das Hüllprotein G in den axonalen, retrograden Transport involviert ist und der Transport unabhängig von der Art der RNPs erfolgt. So konnten wir in unseren Untersuchungen des retrograden Transportes nur den Transport umhüllter Viren detektieren (74). Zudem wird VSV pseudotypisiert mit dem RV G Protein in retrograder Richtung transportiert, *wt* VSV hingegen nicht (85, 161). Die Experimente mit pseudotypisierten VSV lassen vermuten, dass das Glykoprotein nicht nur für die Membranfusion und die Infektion der Zelle zuständig ist, sondern durch seine spezifische Bindung an bestimmte neuronale Rezeptoren auch den retrograden, axonalen Transport von

umhüllten Tollwutviren in nicht-angesäuerten Transportvesikeln (85) ermöglicht. Ein eventuell in Frage kommender, Neuronen-spezifischer Rezeptor für RV stellt der p75NTR Neurotrophin-Rezeptor dar (150), welcher auch für den Transport des Neurotrophin-Wachstumsfaktor zuständig ist (118).

1.2. Das Glykoprotein EnvA des *Avian Sarcoma und Leukosis Virus* der Subgruppe A (ASLV-A) und sein Rezeptor Tva

Die *Avian Sarcoma und Leukosis* Viren gehören zu den Alpharetroviren. Aufgrund von immunologischer Reaktivität des Hüllproteins Env, Wirtsbereich und Art der Infektion unterscheidet man verschiedene Subtypen (5, 156). Die Spezifität der zehn Subgruppen (A bis J genannt) wird durch die hypervariablen Regionen im Hüllprotein Env und den unterschiedlichen Gebrauch der spezifischen Rezeptoren bestimmt (9, 10, 32, 33, 156). Die Infektionsversuche mit verschiedenen Hühnerzelllinien und verschiedenen ASLV Subgruppen ergab, dass drei unabhängige Gene (als *tv* für Tumovirus bezeichnet) die Permissivität der Zelllinien für die ASLV Subgruppen A bis E kontrollieren (5, 110, 111, 124, 128, 156). Die Verfügbarkeit des *tva* Locus ermöglicht die Infektion dieser Zellen mit ASLV der Subgruppe A (6, 164). Das EnvA Protein des ASLV-A ist ein Klasse I Fusionsprotein und wird als *Precursor* (Pr95) synthetisiert und in zwei Untereinheiten (Glykoproteinuntereinheit (gp) 85 und gp37), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, gespalten (35). Gp85 ist die N-terminale Oberflächen-Untereinheit (SU), welche die Rezeptorbindung vermittelt, während gp37 die C-terminale Transmembran-Untereinheit (TM) für die Membranfusion darstellt. Die Transmembran-Untereinheit besteht aus einem hydrophobischen N-terminalen Fusionspeptid, einer C-terminalen Transmembrandomäne zur Verankerung des Proteins in der viralen Membran und N- und C-terminalen *Heptad repeats*, welche Fusionspeptid und C-terminale Transmembrandomäne in der Membran ausrichten. Das Fusionsprotein existiert als metastabiler, trimerer Komplex aus SU/TM-Heterodimeren (28, 35, 48) auf der Virusoberfläche und wird bei der Fusion in eine stabilere Konformation überführt. Bei ASLV kommt es zu einem zweistufigen Viruseintritt. In einem ersten Schritt bei neutralem pH-Wert kommt es zur Rezeptor-induzierten Konformationsänderung des Env Proteins. Dies führt zur Exposition des Fusionspeptides auf der Oberfläche und zur Inkorporation des Fusionsproteins in die Zellmembran. Der zweite Schritt, ausgelöst durch einen niedrigen pH-Wert, umfasst die Vervollständigung der Fusionsreaktion in einem sauren, endosomalen Kompartiment, gefolgt von Virusaufnahme und endosomalem Transport (4). Bei dem Rezeptor Tva für ASLV-A handelt es sich um ein Protein, das mit dem *low-density* Lipoprotein (LDL)-Rezeptor

verwandt ist und ein einzelnes, extrazelluläres LDL-A Modul enthält. Zwei unterschiedliche Formen des Rezeptors sind durch alternatives *Splicing* möglich; eine Transmembran Version mit einer einfachen Membran-durchziehenden Domäne und eine Form mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker. Die Bindung des ASLV-A EnvA Glykoproteins erfolgt an dieses LDL Modul (4).

1.3. Die Inkorporation von Fremdproteinen in die Virushülle der Rhabdoviren

Die Inkorporation von Fremdproteinen in die Virushülle der Rhabdoviren wird dadurch ermöglicht, dass diese Viren in der Lage sind, auch in Abwesenheit des authentischen Glykoproteins ein *Budding* durchzuführen und virale Partikel freizusetzen (93, 123). Durch das Fehlen des Glykoproteins kommt es allerdings zu einer reduzierten Viruspartikelbildung. Unter bestimmten Voraussetzungen kann nun das authentische Glykoprotein gegen ein anderes Glyko- oder auch Transmembranprotein ausgetauscht werden. Bei der Verwendung eines Glykoproteins kann die Reduktion der entstehenden Viruspartikel zum Teil aufgehoben werden (93, 123). Die inkorporierten Proteine behalten dabei im Idealfall ihre immunogenen Eigenschaften (76) und ihre ursprüngliche Funktion (92). Die minimale Voraussetzung für die Inkorporation eines Fremdproteins in die RV Hülle ist die Anwesenheit des zytoplasmatischen Teils des RV Glykoproteins (92, 94). Dieser Teil des Glykoproteins wird wahrscheinlich für die Interaktion mit dem RV M Protein und damit für den korrekten Einbau des Oberflächenproteins in die Virushülle benötigt. Dabei ist es ausreichend, wenn eines dieser Proteine in einem Komplex über die entsprechende Domäne verfügt. So wird z.B. der zelluläre Chemokinrezeptor (CXCR) 4 in Virionen inkorporiert, wenn chimäres *Clusters of Differentiation* (CD) 4 mit einer zytoplasmatischen RV G Domäne anwesend ist. Dabei wird nur der Komplex aus beiden Proteinen effizient inseriert, CD4 mit RV G Domäne alleine nicht, bzw. viel schwächer (92).

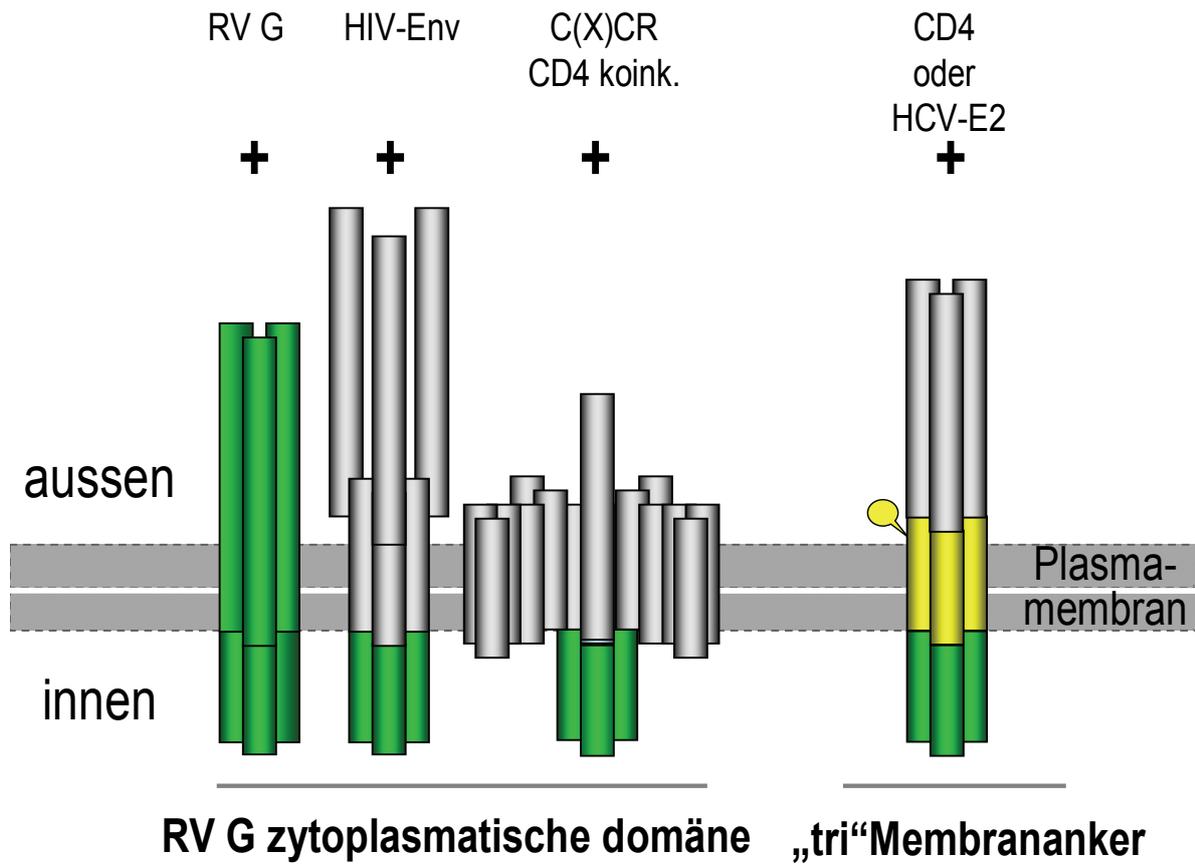


Abb. 2: Inkorporation von Fremdproteinen in die RV Hülle

Für die Inkorporation einiger Membranproteine in die Virushülle ist die Anwesenheit des zytosolischen Bereiches des Tollwutvirus G Proteins (grün) ausreichend. Andere Proteine werden besser eingebaut, wenn auch noch die Transmembrandomäne des G Proteins, welche wahrscheinlich in die Trimerisierung des Proteins involviert ist, vorhanden ist.

1.4. Rhabdoviren als Vektoren

Erst durch die Entwicklung des reversen genetischen Systems (133), welches die Herstellung infektiöser Viren aus doppelsträngiger, komplementärer DNA (cDNA) ermöglichte, konnte der Einsatz von Rhabdoviren und anderen Negativstrangviren als Vektoren in Erwägung gezogen werden. Jetzt konnten auch die etablierten Methoden der rekombinanten DNA-Technologie wie Deletionen und Mutationen der genomischen offenen Leseraster (*open reading frames* (ORF))s und Insertionen von Fremdgenen in das Genom der Rhabdoviren angewendet werden. Rhabdoviren weisen einige positive Eigenschaften als Vektoren auf. So ermöglicht die Genomorganisation der Rhabdoviren mit dem Transkriptionsgradienten die Stärke der Genexpression durch die Insertionsposition des Fremdgens zu bestimmen. Hierbei

Einleitung

zeigte sich, dass die Insertion eines Fremdgens zwischen dem ORF für das Glykoprotein und für die virale Polymerase zu einer guten Genexpression führt und zudem das Viruswachstum nicht beeinflusst wurde (133). Die helikale Anordnung des Virusgenoms ermöglicht den Einbau von Fremdgenen ohne dabei direkt an die Grenzen für die Verpackung des Genoms zu stoßen. Durch die Replikation im Zytoplasma kommt es auch nicht zur Insertion von Virusgenom oder Teilen des Genoms in das Wirtsgenom. Zudem wurden die inserierten Gene auch über einen längeren Zeitraum ohne Selektionsdruck stabil exprimiert. Darüber hinaus wurden schon zahlreiche Fremdgene von verschiedenen Organismen vom RV-Genom exprimiert. Dazu gehören virale, bakterielle sowie zelluläre Proteine des Zytoplasmas, aber auch Fusionsproteine aus viralen und zellulären Bestandteilen wie die Gene für die Nichtstruktur (NS) Proteine des Respiratorischen Synzytial Virus (RSV) (NS1/NS2) (132), die Chloramphenikolesterase (CAT) (95), das verstärkte, grün fluoreszierende Protein (*enhanced green fluorescent protein*) (eGFP) (158) und das virale Fusionsprotein aus eGFP und RV P (eGFP-P) (39). Auch die viralen Hepatitis C Virus (HCV) Glykoproteine (15, 139), das transmembrane Env Protein des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) (89) und der CD4/CXCR4-Komplex (92) wurden bereits erfolgreich in das Virusgenom integriert. So verändert die Inkorporation des HIV-Env Proteins in die Virushülle den Tropismus des RV; was bedeutet, dass nur noch CD4-positive Zellen infiziert werden können (89). RV mit dem eGFP-Gen erlauben die Beobachtung von Virus-infizierten, lebenden Zellen, einschließlich von Neuronen *in situ* (158, 159) im konfokalem Laserfluoreszenzmikroskop. RV Virionen, welche ein Fusionsprotein aus eGFP und Phosphoprotein (eGFP-P) exprimieren, erlauben sogar die Betrachtung von einzelnen Viruspartikeln und die Beobachtung der Freisetzung der eGFP-markierten RNPs aus den endosomalen Strukturen in das Zytoplasma (39). Die Möglichkeiten der stabilen Inkorporation von Fremdgenen und der Veränderung des Tropismus durch in die Virushülle integrierte, fremde oder mutierte Glykoproteine machen die Rhabdoviren zu geeigneten Kandidaten für den Einsatz als virale Vektoren in der Forschung und auch als Lebendvakzine im Bereich der Human- und Veterinärmedizin. Verschiedene Anwendungsmöglichkeiten sind denkbar. Die Untersuchung der unterschiedlichen Rezeptorverwendung der verschiedenen Tollwutvirusstämme, die Verwendung Fluoreszenz-markierter Tollwutvirionen zur Analyse aller wichtigen Stationen im Lebenszyklus wie z.B. des retrograden Transportes (74) der Tollwutviren und als neuronale *Tracer* (158, 159) (Kapitel 4.2.). Die sogenannten G-defizienten, *single-round* Virionen können als sichere Vektoren in Arbeits- und Forschungsgruppen verwendet werden, welche neuronale Netzwerke untersuchen.

1.5. Das Prionprotein

1.5.1. Spongiforme Enzephalopathien

Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (*transmissible spongiform encephalopathies* (TSE)) auch Prionkrankheiten genannt, sind infektiöse, neurodegenerative Krankheiten, die sowohl Menschen als auch eine ganze Reihe verschiedener Tiere betreffen. Die Krankheiten werden durch Prionen verursacht; infektiöse Partikel, die ausschließlich aus Protein bestehen und keine nachweisbaren Nukleinsäuren (RNA oder DNA) als Erbinformation enthalten (99). Einige Prionkrankheiten sind schon seit längerem bekannt, aber erst seit kurzem in das Interesse der Öffentlichkeit gerückt. Dazu gehören die Traberkrankheit (Scrapie) bei Schafen und Ziegen (59, 87), die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (22, 59, 64, 65), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS) (46, 47, 59) und die durch ritualisierten Kannibalismus bei Eingeborenenstämmen in Papua Neuguinea ausgelöste Krankheit Kuru (59, 168). Die bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) stellt dabei eine neu entstandene Prionenkrankheit dar und wurde erstmals 1987 bei einem Rind mit zentralnervösen Störungen diagnostiziert (59, 67, 157). Als Entstehungsursache von BSE wird bis heute die Verfütterung von mit Scrapie-Erregern kontaminiertem Tierkörpermehl gesehen. Jedoch ist diese Hypothese nicht unumstritten, da die experimentelle Infektion von Rindern mit Scrapie ein anderes klinisches Bild und auch eine andere Histopathologie erzeugen (99). Auch die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) beim Menschen ist eine neu entstandene Krankheit und wurde erstmals 1996 (59, 160) beschrieben. Inzwischen gibt es viele Hinweise, dass ihre Entstehung auf den Verzehr BSE-kontaminierter Rinderprodukte zurückzuführen ist.

1.5.2. Die Struktur des zellulären, murinen Prionproteins und seine Funktion

Das Prion besteht aus der pathogenen Isoform PrP^{Sc} des zellulären Glykoproteins PrP^C (Prionprotein, *cellular*), das von einem zellulären Gen kodiert und in neuronalen Zellen gebildet wird (99, 114). Das murine PrP^C besteht aus 231 AS. Die ersten 22 AS des N-Terminus bilden das Signalpeptid, welches das Protein während der Biogenese kotranslational in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) dirigiert. Es erfolgt eine N-verknüpfte Glykosylierung des PrP^C an den Asparagin (Asn)-Resten 181 und 197, so dass das Protein in unglykosylierter, monoglykosylierter und diglykosylierter Form vorliegen kann. PrP^C trägt am C-terminalen Serin 231 einen GPI-Anker, der PrP^C in der Zellmembran verankert (59). Wie viele andere Proteine mit GPI-Anker findet man PrP^C häufig in Detergenz-resistenten

Einleitung

Membranen oder *Lipid rafts* (49, 59, 154). Des Weiteren enthält es eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 179 und 214, welche für die Stabilität der dreidimensionalen Struktur von PrP^C essentiell ist (59, 142). Das murine PrP^C weist zwei Domänen auf, die aus den zusammenhängenden Polypeptidsegmenten AS 23 bis 125 und AS 126 bis 231 bestehen und sehr unterschiedliche räumliche Strukturen aufweisen. Die globuläre Domäne (AS 126 bis 231) besteht aus drei α -*Helices* mit den AS-Resten 144 bis 154, 175 bis 193 und 200 bis 219, einem anti-parallelen β -Faltblatt mit AS 128 bis 131 und 161 bis 164, sowie einer Helix-ähnlichen Sekundärstruktur mit den Resten 222 bis 226. Eine der Disulfidbrücken verbindet die α -*Helices* 2 und 3, die zusammen mit dem β -Faltblatt einen stabilen, hydrophoben Kern des Proteins bilden. Die Polypeptidsegmente AS 121 bis 125, AS 166 bis 171 und AS 220 bis 231 sind wahrscheinlich ungeordnet. Die N-terminale Hälfte der Polypeptidkette bildet einen sehr beweglichen „Schwanz“, welcher auch die fünf sich wiederholende Oktapeptidsequenzen (AS 51 bis 91) enthält, die Kupfer binden können (59).

PrP^C ist an vielen verschiedenen Funktionen im menschlichen Körper beteiligt. So ist es z.B. sowohl an der Regulierung des Immunsystems, der Immunantwort, der Signaltransduktion, an pro- und anti-apoptischen Prozessen, als auch an der Kupferbindung und der synaptischen Transmission beteiligt. Mit biochemischen Methoden konnte gezeigt werden, dass PrP^C vor allem an der synaptischen Plasmamembran lokalisiert ist (57, 59). Die Kupferbindung von PrP^C ist am besten untersucht und es wurde ein hypothetisches Modell zur Funktion der Kupferbindung durch das zelluläre PrP^C an der synaptischen Plasmamembran erstellt. So könnte das an der präsynaptischen Plasmamembran verankerte PrP^C (57, 59) mit seinem N-terminalen Anteil (59, 152) freies Kupfer, welches durch die synaptische Vesikelverschmelzung in den synaptischen Spalt gelangt ist, binden (56, 59, 70). PrP^C wird durch eine endozytotische Aufnahme wieder in die Präsynapse transportiert (59, 109, 138). In den Endosomen erfolgt die Abspaltung des Kupfers, eventuell durch eine Veränderung des pH-Wertes (59, 152). Dadurch wird sicher gestellt, dass trotz die Kupferkonzentration im präsynaptischen Zytosol der Synapse und die Konzentration an freiem Kupfer im synaptischen Spalt konstant bleibt.

1.6. Aufgabenstellung

Das G-unabhängige *Budding* von Rhabdoviren erlaubt den Austausch der Oberflächenproteine (*Envelope-switching*), wodurch Tropismus und immunologische Eigenschaften der Viren grundlegend verändert werden und macht die Rhabdoviren zu geeigneten viralen Vektoren in der Forschung und auch als Lebendvakzine. Die Inkorporation von fluoreszierenden Proteinen in die Virushülle erlaubt daneben auch die direkte Visualisierung von einzelnen Stadien des Lebenszyklus von Viren wie z.B. virale Transportvorgänge (74). Als sogenannte *Tracer* leisten die verwendeten Viren auch einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Morphologie und Physiologie von Neuronen und ihrer Netzwerke (158, 159). Die Aufklärung des viralen, retrograden und axonalen Transportmechanismus zum ZNS könnte hierbei wesentlich zum Verständnis der Biologie neurotroper Pathogene beitragen.

In früheren Forschungsprojekten wurden zur Inkorporation heterologer Proteine in Rhabdovirus-Virionen hauptsächlich G-ähnliche, virale, trimere Transmembranproteine verwendet (42, 42, 43).

In dieser Arbeit sollten neben den Glykoproteinen verwandter Lyssaviren, Polypeptide, die eigentlich keine Transmembrandomäne besitzen, in die Hülle der Tollwutviren inseriert werden. In einem ersten Schritt sollte die Inkorporation der Glykoproteine der Lyssaviren Mokola, *Bat* Hamburg und Lagos *Bat* in G-defiziente RV Partikel und der daraus resultierende Zelltropismus überprüft werden. Zudem sollte ein rekombinantes Fusionsprotein aus dem Hüllprotein des ASLV Typ A (EnvA) und der zytoplasmatischen Domäne (CD) des RV G (RG) (EnvARGCD) in die Virushülle G-defizienter Partikel inkorporiert werden und die Viren als neuronale *Tracer* zur Untersuchung von neuronalen Netzwerken eingesetzt werden. Anschließend sollten zwei unterschiedliche Proteine ohne Transmembrandomäne benutzt werden, um verschiedene Transmembran-Anker mit Trimerisierungs-Domänen zu testen. Neben dem murinen *wt* PrP^C Protein mit GPI-Anker wurde das lösliche, normalerweise zytoplasmatische, autofluoreszierende Protein tdtomato (eine Variante des *red fluorescence protein* (RFP)) verwendet, welches keine eigene Ankersequenz besitzt.

Die funktionierenden Transmembran-Anker sollten nun eingesetzt werden, um tdtomato in die Virushülle zu dirigieren und damit autofluoreszierende Viruspartikel zu produzieren, die in *Live cell imaging* Experimenten eingesetzt werden können (74). Mit deren Hilfe sollte das *Uncoating* bei der Infektion von unterschiedlichen Zelltypen und insbesondere der Transport von Viren in Axonen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet: CO₂-Inkubator MCO-17A (Sanyo), Inkubationskammer, Elektrobloetter ThePanther (OWL Separation systemes), Eppendorf-Kühlzentrifuge, konfokales Laserfluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss), Laserfluoreszenzmikroskop IX71 (Olympus), Lichtmikroskop Axiovert 35 (Zeiss), Heizblock Thermomixer 5436 (Eppendorf), Horizontalgelsystem Modelle A5, B1A, B1, B2 (OWL Separation systemes), Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R (Heraeus), Kühlzentrifuge RC 5CPlus (Sorvall), PCR-Maschine T3 Thermocycler (Biometra), Polyacrylamidgelsystem PenquinTM Modelle P5DS, P10DS (OWL Separation systemes), Spannungsquelle Standard Power Pack P25 (Biometra), Tischultrazentrifuge Optima TLX (Beckmann), Tischzentrifuge Biofuge pico (Heraeus), Ultrazentrifuge L8- 55M (Beckmann).

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia (ECL Hyperfilm), Beckmann (Ultrazentrifugenröhrchen), Eppendorf (Eppendorfreaktionsgefäße, PCR-Reaktionsgefäße), Falcon (50 ml und 15 ml Polypropylen-Röhrchen, Gewebekulturschalen), Millipore (Sterilfilter, Säulen Centricon Plus-20 Polyethersulfon 100.000 MVV CO, Polyvenyldifluorid (PVDF) Membran), Nunc (Gewebekulturflaschen, Gewebekulturschalen, Einfriergefäße), Roth (Blottingpapier), Schleicher&Schuell (Nitrozellulosemembran).

2.1.3. Vorgefertigte Systeme (Kits)

Vorgefertigte Systeme von folgenden Firmen wurden benutzt: Macherey-Nagel (Nucleobond PC100), Perkin-Elmer (Western Blot Chemoluminescence Reagent), Qiagen (QiaExII Gel Extraction kit, QiaQuick Gel Extraction kit, QiaQuick Nucleotide Removal kit, QiaQuick PCR Purification kit, RNeasy Mini kit), Stratagene (Mammalien Transfection kit).

2.1.4. Puffer und Zellkulturmedien

Häufig verwendete Puffer:

Anodenpuffer	200 mM Tris-HCl, pH 8,9	
Kathodenpuffer:	100 mM Tris-HCl, pH 8,25	100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS
Gelpuffer:	3 M Tris-HCl, pH 8,45	
TAE-Puffer:	400 mM Tris-HCOOH, pH 7,8	5 mM NaAc, 5 mM EDTA
TEN-Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 7,4	1 mM EDTA, 150 mM NaCl
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5	5 mM EDTA

Alle anderen verwendeten Puffer werden bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

Zellkulturmedien

Die folgenden, verwendeten Puffer und Zellkulturmedien wurden von Life Technologies bzw. Invitrogen bezogen:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

BHK-21 Medium (Glasgow Minimalmedium (*minimal essential medium*) MEM)

Neugeborenes Kälberserum (NKS)

Tryptosephosphat *broth* 50 x

MEM-Aminosäuren, 50 x

L-Glutamin (200 mM), 100 x

Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S)

Trypsin-EDTA (0,25 % Trypsin, 1 mM Na-EDTA)

Dulbeccos Phosphat gepufferte Saline (PBS) (ohne Kalzium und Magnesium)

Von Boehringer Mannheim bzw. Roche wurden folgende Medien verwendet:

Fötale Kälberserum (FKS).

Tab. 2: In der Zellkultur eingesetzte Medien und Zusätze

Zelllinie	Medien	Zusätze	Weitere Antibiotika (mg/ml Medium)
BSR	BHK-21 Medium	10 % NKS, 2 % Tryptosephosphat <i>broth</i> , 2 % MEM-Aminosäuren, 0,4 % P/S	
BSR T7/5	BHK-21 Medium	10 % NKS, 2 % Tryptosephosphat <i>broth</i> , 2 % MEM-Aminosäuren, 0,4 % P/S	Geneticin (G418) (1 mg/ml)
BSR Mon	BHK-21 Medium	10 % NKS, 2 % Tryptosephosphat <i>broth</i> , 2 % MEM-Aminosäuren, 0,4 % P/S	G418 (1 mg/ml)
BSR 136MGon	BHK-21 Medium	10 % NKS, 2 % Tryptosephosphat <i>broth</i> , 2 % MEM-Aminosäuren, 0,4 % P/S	G418 (1 mg/ml), Hygromycin (0,5 mg/ml)
BSR 139Gon	BHK-21 Medium	10 % NKS, 2 % Tryptosephosphat <i>broth</i> , 2 % MEM-Aminosäuren, 0,4 % P/S	G418 (1 mg/ml), Hygromycin (0,5 mg/ml)
BSR T7/5 tm-RFP	BHK-21 Medium	10 % NKS, 2 % Tryptosephosphat <i>broth</i> , 2 % MEM-Aminosäuren, 0,4 % P/S	G418 (1 mg/ml), Hygromycin (0,5 mg/ml)
BHK Env ARGCD	BHK-21 Medium	10 % FKS, 2 % Tryptosephosphat <i>broth</i> , 2 % MEM-Aminosäuren, 0,4 % P/S	
NA tm-RFP	DMEM	10 % FKS, 0,4 % P/S	G418 (1 mg/ml)
NA	DMEM	10 % FKS, 0,4 % P/S	
NS20Y	DMEM	5 % FKS, 0,4 % P/S	
293T TVA800	DMEM	10 % FKS, 1 % L-Glutamin, 0,4 % P/S	

2.1.5. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von folgenden Firmen:

Axis-Shield (Opti-Prep), INC Biochemicals Inc. (APS), Life Technologies/Invitrogene (Agarose), Merck (Ca₂Cl, Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Ethidiumbromid, KCl, MgSO₄, NaAc, NaCl, NH₄Cl, Orange G, Paraformaldehyd (PFA), Phenolrot, Triton X-100), New England Biolabs (Desoxyribonukleotide (dNTPs)), Riedel-de-Häen (Ethanol, NaOH), Roth (β-Mercaptoethanol, Aceton [tech], Acrylamid/Bisacrylamidlösung [29:1], Dimethylsulfoxid (DMSO), Glycerin, Harnstoff, Methanol, Salzsäure [25 %, konz.], Natriumdodecylsulfat (SDS), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Tween-20), Sigma-Aldrich (Bromphenolblau, N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)).

2.1.6. Weitere Reagenzien

Weitere Reagenzien: DNA-Größenstandard 1 kb ladder (Life Technologies), Agar (Difco), Bactotrypton (Difco), Einbettungsmedium (Linaris), FuGene6 (Roche), Hefeextrakt (Difco), Magermilch-Pulver (Merck), vorgefärbter Proteinstandard (Life Technologies, Biorad).

2.1.7. Enzyme

Die Enzyme wurden von folgenden Firmen geliefert: Biomaster (DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (BioPfu DNA-Polymerase)), Boehringer Mannheim/Roche (*shrimp* alkalische Phosphatase (SAP), Reverse Transcriptase (RT)), New England Biolabs (Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Klenow-Polymerase, Mungbean Nuklease, Peptide-N-Glykosidase F (PNGaseF) Endoglykosidase H (Endo H)), Stratagene (Pfu-Turbo DNA-Polymerase, Reverse Transkriptase).

2.1.8. Antikörper

Tab. 3: Verwendete Antikörper

Name	Beschreibung	Konjugation	Organismus	Referenz
Centocor TM	α RV N Protein, monoklonales IgG	FITC	Maus	Fa. Centocor, Malevin, PA, USA
W239	α RV N Protein, monoklonales Serum		Maus	J. Cox, BFAV Tübingen
S86	α RV N Protein		Kaninchen	J. Cox, BFAV Tübingen
S50	α RV N/P Protein, polyklonales Serum		Kaninchen	J. Cox, BFAV Tübingen
FCA05/1	α RV P Protein, polyklonales Serum		Kaninchen	Fa. Metabion, Planegg-Martinsried
M1B3	α RV M Protein, Peptidserum		Kaninchen	J. Cox, BFAV Tübingen
M2D4	α RV M Protein, Peptidserum		Kaninchen	J. Cox, BFAV Tübingen
E559	α RV G (α G) Protein, monoklonales Serum		Maus	J. Cox, BFAV Tübingen
S72	α RV G Protein, polyklonales Serum		Kaninchen	J. Cox, BFAV Tübingen
ERA G (S71)	α RV G Protein, Peptidserum		Kaninchen	J. Cox, BFAV Tübingen
S91.4	α RV G Protein, Peptidserum		Kaninchen	J. Cox, BFAV Tübingen
S92	α RV G Protein, Peptidserum		Kaninchen	J. Cox, BFAV Tübingen
S93	α RV G Protein, Peptidserum		Kaninchen	J. Cox, BFAV Tübingen
4H11	α PrP, monoklonal		Maus	E. Kremmer, H. Schätzl
3f4	α PrP, IgG2a		Maus	Signet Pathology Dedham, MA, USA
3B5	α PrP		Maus	(7)
A7	α PrP, polyklonales Serum		Kaninchen	H. Schätzl
6H4	α PrP, monoklonales IgG1		Maus	Fa. Prionics, Zürich

Material und Methoden

HCA05/1	α RV Gtail Protein, polyklonales Serum		Kaninchen	Metabion
α DsRed	α DsRed, monoklonales Serum		Maus	Clontech, Takara Bio Company
α RCFP	α RCFP, polyklonaler Antikörper		Kaninchen	Clontech, BD Biosciences
α GM130	α Golgi, monoklonal IgG,		Maus	BD Biosciences
α Calnexin	α EEA1, monoklonal IgG		Maus	BD Biosciences
α p75NTR	α NGFR p75, monoklonales IgG		Maus	Sigma-Aldrich
α NeuN	α NeuN, monoklonales 4G2		Maus	Abcam, Acris Antibodies
α NF200	α Neurofilament 200, monoklonal IgG		Maus	Sigma-Aldrich
α Actin	α Actin, IgG fraction of antiserum		Kaninchen	Sigma-Aldrich
α rabbit PO	α Kaninchen IgG	Peroxidase	Ziege	Dianova
α mouse PO	α Maus IgG	Peroxidase	Ziege	Dianova
α rabbit Alexa488	α Kaninchen IgG	Alexa488	Ziege	Molecular Probes
α mouse Alexa488	α Maus IgG	Alexa488	Ziege	Molecular Probes
α rabbit Alexa633	α Kaninchen IgG	Alexa633	Ziege	Molecular Probes
α mouse Alexa633	α Maus IgG	Alexa633	Ziege	Molecular Probes
α rabbit Cy3	α Kaninchen IgG	Cy3	Ziege	Jackson ImmunoResearch
α mouse Cy5	α Maus IgG	Cy5	Ziege	Jackson ImmunoResearch
α mouse FITC	α Maus IgG	FITC	Ziege	Jackson ImmunoResearch
WGR	Weizenkeim Agglutinin bindet N-Acetylglucosamin N-Acetylneuraminische Säure	Texas Red-X		Molecular Probes
TP3	To-Pro-3, monomerisch färbt Cyaninnukleinsäure			Molecular Probes

2.2. Konstruktion der verwendeten RFP/RV G Fusionsproteine

Zur Fluoreszenzmarkierung der RV Hülle wurde die pH-stabile Variante tdtomato des rot-fluoreszierenden Proteins (*red fluorescent protein*) von *Discosoma sp* (DsRed) verwendet (136). Der ORF von tdtomato kodiert für zwei Kopien in tandem-Orientierung. Die Anordnung in tandem-Orientierung ermöglicht eine intramolekulare Faltung und verhindert die intermolekulare Aggregation der Moleküle. Um den Transport und die Inkorporation des

Fluoreszenzproteins tdtomato in die Zellmembran und dadurch später auch in die Virushülle zu ermöglichen, wurden Fusionsproteine aus Regionen des RV G Proteins und tdtomato konstruiert.

tm-RFP und tm-RFP(Asn)

Das Fusionsprotein tm-RFP besteht aus der N-terminalen RV G Protein Signalsequenz (AS 1 bis 19) (17), dem ORF von tdtomato (AS 2 bis 476) (136) ohne Startcodon (RFP) und der C-terminalen RV G Proteinsequenz (AS 410 bis 524) einschließlich der 48 AS der Ektodomäne (AS 410 bis 458), des Transmembranankers (AS 459 bis 480) und des zytoplasmatischen Schwanzes (AS 481 bis 524) (17) (tm). Bei tm-RFP(Asn) wurde über eine gerichtete Mutagenesereaktion eine synthetische Glykosylierungsstelle (Asn), die zu einem AS Austausch von Asn-Gly-Arg zu Asn-Gly-Thr an der Position 34 bis 36 von tm-RFP führte, eingefügt.

tm-RFP(Asn319)

Dieses tm-RFP Fusionsprotein besitzt einen, um 94 AS verlängerten, C-terminalen Bereich des RV G Proteins mit der Glykosylierungsstelle Asn319 des RV G Proteins.

2.3. Chimäre PrP^C Fusionsproteine mit RV G- oder *Borna Disease Virus* (BDV)-Anker

Zur Herstellung mit PrP^C pseudotypisierter RV-Vektoren wurden PrP^C Fusionsproteine hergestellt. Diese Proteine bestehen aus der murinen *wt* PrP^C-Sequenz mit der N-terminalen Signalsequenz (AS 1 bis 231) und einem RVG-Anker oder einem BDV-Anker. Die RV G Ankersequenz umfasst die zytoplasmatische Domäne (AS 481 bis 524), die Transmembrandomäne (AS 459 bis 480) und einem Teil der Ektodomäne (AS 415 bis 458) des RV G (17). Der BDV-Anker besteht aus einem Bereich der Ektodomäne (AS 429 bis 467) und der Transmembrandomäne (AS 468 bis 492) des BDV Glykoproteins (119) fusioniert an die zytoplasmatische Domäne des RV G Proteins (AS 481 bis 524) (17). Des Weiteren wurden bei manchen der Fusionsproteine zusätzliche Antikörperepitope (3f4 und/oder Flag23) eingefügt. Zwei Konstrukte besitzen zwei Kopien der *wt* PrP^C-Sequenz, getrennt durch eine Linkersequenz. Zudem wurde ein verkürztes murines PrP^C mit einer Deletion der AS 25 bis 120 und einem RVG-Anker (PrP^C Δ25-120 RVG) konstruiert.

2.4. Klonierung von verwendeten Plasmiden

Als Ausgangsplasmid für die RFP/RV G-Expressionsplasmide wurde der Vektor pCR3 verwendet, der einen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor für die Expression in Säugetierzellen besitzt. Zur Herstellung stabiler tm-RFP-exprimierender Zelllinien wurden die Expressionsplasmide pCR3 tm-RFP und pTRE2Hyg, welches eine Hygromycinresistenzkassette besitzt, verwendet.

2.4.1. Lyssavirus Glykoprotein exprimierende Plasmide

Zur Untersuchung der Inkorporation der Glykoproteine verschiedener Lyssaviren (Kapitel 1.1.2.) wurden pseudotypisierte Viren erzeugt. Dazu wurden Expressionsplasmide kloniert, welche die verschiedenen Glykoproteine der Lyssavirenstämme Mokola, *Bat* Hamburg und Lagos *Bat* von dem eukaryotischen β -*chicken actin* Promotor aus exprimieren (S. Finke, unveröffentlicht). Dazu wurden die Glykoproteine der verschiedenen Lyssavirenstämme per PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen EcoRI/NheI (*Bat* Hamburg und Lagos *Bat*) bzw. NsiI/NheI (Mokola)-geschnitten und in den EcoRI/NheI bzw. NsiI/NheI-verdauten Vektor pCAGGS kloniert. Die entstandenen Expressionsplasmide wurden pCAGGS-16G (Mokola), pCAGGS-58G (Lagos *Bat*) und pCAGGS-BH (*Bat* Hamburg) genannt (S. Finke, unveröffentlicht).

2.4.2. tm-RFP Expressionsplasmide

pCR3ssRVG

Die N-terminale Signalsequenz (SS) des RV G Proteins wurde mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* (PCR)) (Matrize: pTIT-G, Primerpaar: Forward (Fw) SS RV G/Reverse (Rv) SS RV G) amplifiziert, HindIII und BamHI geschnitten und in den ebenfalls HindIII und BamHI geschnittenen Vektor pCR3 gesetzt. Der entstandene Vektor wurde pCR3ssRVG genannt.

pCR3sstmRVG

Der N-Terminale Bereich des RV G Proteins, einschließlich der 48 AS der Ektodomäne, des Transmembranankers und des zytoplasmatischen Schwanzes wurde auch mit Hilfe der PCR (Matrize: pTIT-G, Primerpaar: FwTM RV G/RvTM RV G) vermehrt, XbaI und XhoI geschnitten und in den XbaI/XhoI-geschnittenen Vektor pCR3ssRVG ligiert. Dies führte zu Plasmid pCR3sstmRVG.

pCR3 tm-RFP

Der ORF tdtomato ohne das Startcodon wurde mittels PCR von dem Vektor pCDNA3 tdtomato amplifiziert (Primerpaar:FwTomato/RvTomato), EcoRI und EcoRV geschnitten und in den mit denselben Enzymen verdauten Vektor pCR3sstmRVG eingesetzt. Dies führte zu dem endgültigen Expressionsplamid pCR3 tm-RFP.

pCR3 tm-RFP(Asn)

Eine synthetische Glykosylierungsstelle, die zu einem AS Austausch von Asparagin (Asn)-Glycin (Gly)-Argenin (Arg) zu Asn-Gly-Threonin (Thr) an den AS-Positionen 34 bis 36 führte (Asn), wurde mit Hilfe der gerichteten Mutagenese (Primer: recTomatoNGlykol(Fw) und TM RV G(Rv)) in tm-RFP eingefügt.

pCR3 tm-RFP(Asn319)

Zur Konstruktion des Expressionsplasmides pCR3 tm-RFP(Asn319) mit dem Fusionsprotein tm-RFP(Asn319), das einen verlängerten C-terminalen RV G Anteil mit der Glykosylierungsstelle Asn319 besitzt (Asn319), wurde ein längerer C-terminaler Bereich von pTIT-G bis einschließlich AS 316 mit Hilfe der PCR amplifiziert, XhoI/XbaI-verdaut und das erhaltene Fragment über XhoI/XbaI in den Vektor pCR3 tm-RFP gesetzt.

2.4.3. Rekombinante Tollwutvirus cDNA-Klone mit tm-RFP

Zur Herstellung von cDNAs rekombinanter RV mit den verschiedenen chimären RFP/RV G Genen, wurden die Konstrukte pSAD-G-DsRed-N/P (S. Finke, unveröffentlicht), pSAD ΔG mCherry-N/P (S. Finke, unveröffentlicht) mit einer zusätzlichen Nukleoprotein/Phosphoprotein Gengrenze (N/P), pSAD eGFP-P (39) und pSAD eGFP-P Gcvs mit dem Glykoprotein des Tollwutvirusstammes *Challenge Virus Strain* (Gcvs) (S. Finke, unveröffentlicht) verwendet.

pSAD tm-RFP, pSAD tm-RFP(Asn) und pSAD tm-RFP(Asn319)

Zur Herstellung der cDNA Gesamtklone pSAD tm-RFP, pSAD tm-RFP(Asn) und pSAD tm-RFP(Asn319) wurden die entsprechenden Expressionplasmide pCR3 tm-RFP, pCR3 tm-RFP(Asn) und pCR3 tm-RFP(Asn319) mit NheI/SacII-geschnitten und die erhaltenen Fragmente über NheI/SacII in den Vektor pSAD-G-DsRed-N/P ligiert.

pSAD Δ G tm-RFP

pCR3 tm-RFP wurde NheI/SacII-verdaut und in den ebenfalls NheI/SacII-geschnittenen Vektor pSAD Δ G mCherry-N/P (Kapitel 2.5.1., Tab. 4) kloniert. Dies ergab den cDNA-Gesamtklon pSAD Δ G tm-RFP.

pSAD eGFP-P tm-RFP und pSAD eGFP-P Gcvs tm-RFP

Die cDNA-Gesamtklone pSAD eGFP-P tm-RFP und pSAD eGFP-P Gcvs tm-RFP wurden konstruiert, indem der cDNA-Gesamtklon pSAD tm-RFP mit BstAPI-verdaut und das Fragment in die mit demselben Enzym verdauten Ausgangs cDNA-Gesamtklone pSAD eGFP-P und pSAD eGFP-P Gcvs gesetzt wurde.

2.4.4. PrP^C Expressionsplasmide

Die Fusionsproteine PrP^C *wt* RVG, PrP^C Dimer 3f4 RVG, PrP^C 3f4 RVG, PrP^C Flag23 3f4 RVG, PrP^C *wt* BDV, PrP^C Dimer 3f4 BDV, PrP^C 3f4 BDV und PrP^C Flag23 3f4 BDV (Kapitel 2.5.1., Tab. 4 und Kapitel 3.9., Abb. 19) wurden in Vorarbeiten von Petra Stöcker konstruiert und anschließend in den Vektor pBluescriptII(-) mit zusätzlicher Interner Ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und T7 Promotor und Terminator-Sequenz (pTIT) kloniert (P. Stöcker, unveröffentlicht). Bei PrP^C Δ 25-120 RVG wurde aus dem PrP^C *wt* RVG Fusionsprotein die AS 25 bis 120 deletiert. Zur Herstellung stabiler PrP^C-exprimierender Zelllinien wurde das Expressionsplasmid pTRE2Hyg, welches einen Tet-abhängigen P_{hcmv*-1} Promotor besitzt, verwendet.

pTIT PrP^C Δ 25-120 RVG

Zur Herstellung von pTIT PrP^C Δ 25-120 RVG wurde der cDNA Gesamtklon pNP PrP^C Δ 25-120 RVG NheI/PmeI-verdaut und in den NcoI/EcoRV-geschnittenen Vektor pTIT ligiert.

pTRE2Hyg PrP^C *wt* RVG und pTRE2Hyg PrP^C Δ 25-120 RVG

Die beiden Plasmide pNP PrP^C *wt* BDV und pNP PrP^C Δ 25-120 RVG wurden zunächst SphI/SacII-verdaut, dann mit der Mungbean Nuklease nachbehandelt und in den NheI/EcoRV-geschnittenen Vektor pTRE2Hyg ligiert.

2.4.5. cDNA-Klone mit PrP^C Fusionsprotein

Zur Herstellung von cDNAs rekombinanter RV mit den verschiedenen PrP^C Fusionsproteinen wurde das Konstrukt pNPgrL (41) verwendet.

pNP PrP^C Flag23 3f4 BDV, pNP PrP^C 3f4 BDV, pNP PrP^C Dimer BDV, pNP PrP^C Dimer RVG, pNP PrP^C wt BDV und pNP PrP^C wt RVG

Zur Herstellung der cDNA Gesamtklone pNP PrP^C Flag23 3f4 BDV, pNP PrP^C 3f4 BDV, pNP PrP^C Dimer BDV, pNP PrP^C Dimer RVG, pNP PrP^C wt BDV und pNP PrP^C wt RVG wurden die entsprechenden Expressionplasmide pTIT PrP^C Flag23 3f4 BDV, pTIT PrP^C 3f4 BDV, pTIT PrP^C Dimer 3f4 BDV, pTIT PrP^C Dimer 3f4 RVG, pTIT PrP^C wt BDV und pTIT PrP^C wt RVG mit den Primern PrPspNheI (Fw) und RVtailrevEcoRVsnaBI (Rv) amplifiziert, NheI/EcoRV-geschnitten und die erhaltenen Fragmente über NheI/SnaBI in den Vektor pNPgrL ligiert.

pNP PrP^C Δ25-120 RVG

Zur Herstellung des cDNA Gesamtklones pNP PrP^C Δ25-120 RVG wurden per PCR die Nukleotide 1 bis 72 und 363 bis 693 des ORF von PrP^C mit dem Plasmid pTIT PrP^C wt RVG als Vorlage amplifiziert. Diese beiden DNA-Fragmente wurden anschließend mittels der Technik der überlappenden PCR zusammengefügt und amplifiziert. Anschließend wurde das Fragment NheI/EcoRV-geschnitten und in den NheI/SnaBI-verdauten Vektor pNPgrL ligiert.

2.5. DNA, Bakterienstämme, Virusstämme und Zelllinien

2.5.1. DNA

Plasmide

Die DNA-Klonierungsarbeiten wurden in dem Basisvektor pBluescript SKII (Amersham Pharmacia), davon abgeleiteten Vektoren, in pCR3 (Invitrogen), in pCAGGS und in pTRE2Hyg (Clontech Laboratories, Takara Bio Company) durchgeführt. Zur Klonierung der rekombinanten RV cDNA Gesamtklone wurde die cDNA des RV-Gesamtklons (pSAD L16 (133)) als Ausgangsvektor verwendet.

Tab. 4: Verwendete Plasmide im Einzelnen

Plasmid	Relevante Struktur/Beschreibung Promotor	Konstruktion/Referenz
pTIT	Plasmid pBluescriptII(-) mit zusätzlicher IRES und T7 Terminator-Sequenz	(14)
pTIT-N	Plasmid pTIT mit RV N unter Kontrolle des T7 Promotors	(40)
pTIT-P	Plasmid pTIT mit RV P unter Kontrolle des T7 Promotors	(40)
pTIT-M	Plasmid pTIT mit RV M unter Kontrolle des T7 Promotors	(44)
pTIT-G	Plasmid pTIT mit RV G unter Kontrolle des T7 Promotors	(44)
pTIT-L	Plasmid pTIT mit RV L unter Kontrolle des T7 Promotors	(40)
pT7T	Plasmid pBluescriptII(-) mit T7 Promotor- und Terminator Sequenz	(18)
pT7T-N	Plasmid pT7T mit RV N	(18)
pT7T-P	Plasmid pT7T mit RV P	(18)
pT7T-M	Plasmid pT7T mit RV M	(18)
pT7T-G	Plasmid pT7T mit RV G	(18)
pT7T-L	Plasmid pT7T mit RV L	(18)
pT7T-VSV G	Plasmid pT7T mit VSV G	in dieser Arbeit hergestellt
pT7T-VSVSAD G	Plasmid pT7T mit dem Fusionsprotein VSVSAD G	in dieser Arbeit hergestellt
pEGFP-N3	Eukaryotisches Expressionsplasmid mit eGFP hinter dem CMV <i>immediate early</i> Promotor	Clontech Laboratories, Takara Bio Company
pTRE2Hyg	Eukaryotisches Expressionsplasmid mit Tet-abhängigen P _{hcmv*-1} Promotor	Clontech Laboratories, Takara Bio Company
pTRE2Hyg PrP ^C wt RVG	Plasmid pTRE2Hyg mit dem Fusionsprotein PrP ^C wt RVG	in dieser Arbeit hergestellt
pTRE2Hyg PrP ^C Δ25-120 RVG	Plasmid pTRE2Hyg mit dem Fusionsprotein PrP ^C Δ25-120 RVG	in dieser Arbeit hergestellt
pCAGGS	Eukaryotisches Expressionsplasmid mit <i>β-chicken actin</i> Promotor	F. Weber
pCAGGS-L16	Plasmid pCAGGS mit RV G Protein	(S. Finke, unveröffentlicht)
pCAGGS-CVS G	Plasmid pCAGGS mit RV G Protein vom CVS Stamm	(S. Finke, unveröffentlicht)
pCAGGS-16G	Plasmid pCAGGS mit Mokola G Protein	(S. Finke, unveröffentlicht)
pCAGGS-58G	Plasmid pCAGGS mit Lagos <i>Bat</i> G Protein	(S. Finke, unveröffentlicht)
pCAGGS-BH	Plasmid pCAGGS mit <i>Bat</i> Hamburg G Protein	(S. Finke, unveröffentlicht)
pcDNA 3.1	Eukaryotisches Expressionsplasmid mit CMV Promotor	Invitrogen

Material und Methoden

pTIT PrP ^C wt RVG	Plasmid pTIT mit dem Fusionsprotein PrP ^C wt RVG	(P. Stöcker, unveröffentlicht)
pTIT PrP ^C Dimer 3f4 RVG	Plasmid pTIT mit dem Fusionsprotein PrP ^C Dimer 3f4 RVG	(P. Stöcker, unveröffentlicht)
pTIT PrP ^C wt BDV	Plasmid pTIT mit dem Fusionsprotein PrP ^C wt BDV	(P. Stöcker, unveröffentlicht)
pTIT PrP ^C 3f4 BDV	Plasmid pTIT mit dem Fusionsprotein PrP ^C 3f4 BDV	(P. Stöcker, unveröffentlicht)
pTIT PrP ^C Flag23 3f4 BDV	Plasmid pTIT mit dem Fusionsprotein PrP ^C Flag23 3f4 BDV	(P. Stöcker, unveröffentlicht)
pTIT PrP ^C Dimer 3f4 BDV	Plasmid pTIT mit dem Fusionsprotein sp PrP Dimer 3f4 BDV-Anker	(P. Stöcker, unveröffentlicht)
pTIT PrP ^C Δ25-120 RVG	Plasmid pTIT mit dem Fusionsprotein PrP ^C Δ25-120 RVG	in dieser Arbeit hergestellt
pCR3	Eukaryotisches Expressionsplamid mit CMV Promotor	Invitrogen
pCR3ssRVG	Plasmid pCR3ssRVG	in dieser Arbeit hergestellt
pCR3ssRVG Flag	Plasmid pCR3 mit ssRVG und Flag-Epitop	in dieser Arbeit hergestellt
pCR3tmRVG	Plasmid pCR3 tmRVG	in dieser Arbeit hergestellt
pCR3 tdtomato	Plasmid pCR3 mit tdtomato	in dieser Arbeit hergestellt
pCR3sstmRVG	Plasmid pCR3 mit ssRVG und tmRVG	in dieser Arbeit hergestellt
pCR3 tdtomato tmRVG	Plasmid pCR3 mit tdtomato und tmRVG	in dieser Arbeit hergestellt
pCR3 tm-RFP	Plasmid pCR3 mit dem Fusionsprotein tm-RFP	(74), in dieser Arbeit hergestellt
pCR3 tm-RFP Flag	Plasmid pCR3 mit dem Fusionsprotein tm-RFP und Flag-Epitop	in dieser Arbeit hergestellt
pCR3 tm-RFP(Asn)	Plasmid pCR3 mit tm-RFP(Asn)	(74), in dieser Arbeit hergestellt
pCR3 tm-RFP(Asn319)	Plasmid pCR3 mit tm-RFP(Asn319)	(74), in dieser Arbeit hergestellt
pSAD L16	RV cDNA Gesamtklon mit der Sequenz des SAD B19	(133)
pSAD-G-eCFP-N/P	cDNA Gesamtklon pSAD L16 mit Austausch von RV G gegen eCFP und zusätzlicher N/P-Gengrenze	(A. Marschalek, unveröffentlicht)
pSAD-G-DsRed-N/P	cDNA Gesamtklon pSAD-G-eCFP-N/P mit Austausch von eCFP gegen DsRed	(S. Finke, unveröffentlicht)
pNPgrL	cDNA Gesamtklon pSAD L16 mit Austausch von RV M und G gegen DsRed und eGFP	(41)
pNP PrP ^C Flag23 3f4 BDV	cDNA Gesamtklon pNPgrL mit Austausch von DsRed gegen das Fusionsprotein PrP ^C Flag23 3f4 BDV	in dieser Arbeit hergestellt

Material und Methoden

pNP PrP ^C 3f4 BDV	cDNA Gesamtklon pNPgrL mit Austausch von DsRed gegen das Fusionsprotein PrP ^C 3f4 BDV	in dieser Arbeit hergestellt
pNP PrP ^C Dimer 3f4 BDV	cDNA Gesamtklon pNPgrL mit Austausch von DsRed gegen das Fusionsprotein PrP ^C Dimer 3f4 BDV	in dieser Arbeit hergestellt
pNP PrP ^C Dimer 3f4 RVG	cDNA Gesamtklon pNPgrL mit Austausch von DsRed gegen das Fusionsprotein PrP ^C Dimer RVG	in dieser Arbeit hergestellt
pNP PrP ^C <i>wt</i> BDV	cDNA Gesamtklon pNPgrL mit Austausch von DsRed gegen das Fusionsprotein PrP ^C <i>wt</i> BDV	in dieser Arbeit hergestellt
pNP PrP ^C <i>wt</i> RVG	cDNA Gesamtklon pNPgrL mit Austausch von DsRed gegen das Fusionsprotein PrP ^C <i>wt</i> RVG	in dieser Arbeit hergestellt
pNP PrP ^C <i>wt</i> RVG Δ25-120	cDNA Gesamtklon pNPgrL mit Austausch von DsRed gegen das Fusionsprotein PrP ^C Δ25-120 RVG	in dieser Arbeit hergestellt
pSAD tm-RFP	cDNA Gesamtklon pSAD-G-DsRed-N/P mit Austausch von DsRed gegen tm-RFP	(74), in dieser Arbeit hergestellt
pSAD tm-RFP Flag	cDNA Gesamtklon pSAD-G-DsRed-N/P mit Austausch von DsRed gegen tm-RFP mit Flag-Epitop	in dieser Arbeit hergestellt
pSAD tm-RFP(Asn)	cDNA Gesamtklon pSAD-G-DsRed-N/P mit Austausch von DsRed gegen tm-RFP(Asn)	(74), in dieser Arbeit hergestellt
pSAD tm-RFP(Asn319)	cDNA Gesamtklon pSAD-G-DsRed-N/P mit Austausch von DsRed gegen tm-RFP(Asn319)	(74), in dieser Arbeit hergestellt
pSAD eGFP-P	cDNA Gesamtklon pSAD L16 mit eGFP an den N-Terminus von P fusioniert	(39)
pSAD eGFP-P tm-RFP	cDNA Gesamtklon pSAD eGFP-P mit tm-RFP zwischen dem G und dem L ORF	(74), in dieser Arbeit hergestellt
pSAD eGFP-P Gcvs	cDNA Gesamtklon pSAD eGFP-P mit RV G des Stammes CVS	(S. Finke, unveröffentlicht)
pSAD eGFP-P Gcvs tm-RFP	cDNA Gesamtklon pSAD eGFP-P mit tm-RFP zwischen dem G und dem L ORF	(74), in dieser Arbeit hergestellt
pSAD ΔG eGFP	cDNA Gesamtklon pSAD L16 mit Austausch von RV G gegen eGFP	(158)
pSAD ΔG tm-RFP	cDNA Gesamtklon pSAD ΔG eGFP mit Austausch von eGFP gegen tm-RFP	in dieser Arbeit hergestellt
pSAD-ΔG-mCherry-N/P	cDNA Gesamtklon pSAD L16 mit Austausch von RV G gegen mCherry und zusätzlicher N/P-Gengrenze	(S. Finke, unveröffentlicht)

Material und Methoden

Tab. 5: Klonierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	Klonierung von
PrPspNheI (Fw)	GGATCTGGCTAGCAACCATGGCGA ACCTTGGCTACTGGC	pNP PrP ^C Flag23 3f4 BDV pNP PrP ^C 3f4 BDV pNP PrP ^C Dimer BDV pNP PrP ^C Dimer RVG pNP PrP ^C wt BDV pNP PrP ^C wt RVG pNP PrP ^C Δ25-120 RVG
RVtailrevEcoRVSn aBI (Rv)	TCTGTCTACGTAGATATCTTACAGT CTGGTCTCACCCCACT	pNP PrP ^C Flag23 3f4 BDV pNP PrP ^C 3f4 BDV pNP PrP ^C Dimer BDV pNP PrP ^C Dimer RVG pNP PrP ^C wt BDV pNP PrP ^C wt RVG pNP PrP ^C Δ25-120 RVG
PrP AS24(Rv)	ACCAAGGCCCCCACCTTTTTGCA GAGGCCGACAT	pNP PrP ^C Δ25-120 RVG
PrP AS120(Fw)	GTGGGGGGCCTTGGTGGCTACAT	pNP PrP ^C Δ25-120 RVG
Fw SS RV G	CTCGTCAAGCTTGGGAAAGATGGT TCCTCAGG	pCR3ssRVG pCR3ssRVG Flag pCR3 tm-RFP Flag
Rv SS RV G	GCTGTCGGATCCCTTGTCTGGTATC GTGTA	pCR3ssRVG
Fw TM RV G	CTCGTCCTCGAGTCGGTTATCCCC CTTGTG	pCR3tmRVG pCR3sstmRVG
Rv TM RV G	GCTGTCTCTAGATTACAGTCTGGT CTCACC	pCR3tmRVG pCR3sstmRVG pCR3 tm-RFP(Asn) pCR3 tm-RFP(Asn319)
Fw Tomato	CTCGTCGAATTCTGGTGAGCAAGG GCGAGGAG	pCR3 tdtomato pCR3 tdtomato tmRVG pCR3 tm-RFP
Rv Tomato	GCTGTCGATATCCTAGCTTGTACA GCTCGTCCATGC	pCR3 tdtomato pCR3 tdtomato tmRVG pCR3 tm-RFP
Rv SS RV G Flag	GCTGTCGGATCCTTTATCGTCATCG TCTTTGTAGTCCTTGTCTGGTATCG TGTA	pCR3ssRVG Flag pCR3 tm-RFP Flag
Fw SS RV G NheI	CTCGTCGCTAGCGGGAAAGATGGT TCCTCAGG	pSAD tm-RFP
Rv TM RV G SacII	GCTGTCCC GCGGTTACAGTCTGGT CTCACC	pSAD tm-RFP
Fw longTM RV G	CTCGTCCTCGAGACCATATTCAAC AAGACC	pCR3 tm-RFP(Asn319)
Fw recTomatoNGlykol	CTCGTCGGATCCACTAGTAACGGT ACCCAGTGTGC	pCR3 tm-RFP(Asn)
L16 G forward	TACTGAGAATTCGGAAAGATGGTT CCTCAGGCTCTCCT	pCAGGS-L16
L16 G reverse	ACGTCAGCTAGCTTACAGTCTGGT	pCAGGS-L16

Material und Methoden

	CTCACCCCCA	
CVS G forward	TACTGAGAATTCGGAAAGATGGTT CCTCAGGTTC	pCAGGS-CVS G
CVS G reverse	ACGTCAGCTAGCTTACAGTCTGAT CTCACCTCCA	pCAGGS-CVS G
16G forward NSiI	ACGTCAATGCATGCCATCATGAAT ATACCTT	pCAGGS-16G
16G reverse	ACGTCAGCTAGCTCAAGTACCTGG GAGCCCTTA	pCAGGS-16G pCAGGS-VSVSAD G
BH forward	TACTGAGAATTCAAAGCCATGTTA CTCTTACCGCCA	pCAGGS-BH
BH reverse	ACGTCAGCTAGCTTATGACTCACC AGTGGCCCCA	pCAGGS-BH
58G forward	TACTGAGAATTCGTCATCATGAGT CAGCTAATT	pCAGGS-58G
58G reverse	ACGTCAGCTAGCCTACACATTTGA AGTTCCTT	pCAGGS-58G
VSVG forward	TACTGAGAATTCATGAAGTGCCTT TTGTACTION	pCAGGS-VSV G pCAGGS-VSVSAD G
VSVG reverse	ACGTCAGCTAGCTTACTTTCCAAG TCGGTTCATC	pCAGGS-VSV G

2.5.2. Bakterienstämme

Zur Vermehrung von DNA-Plasmiden wurde der *E.coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene) verwendet.

2.5.3. Virusstämme

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Viren

Virus	Beschreibung	Referenz
MVAT7-Pol	<i>Modified Vaccinia Ankara</i> (MVA) mit T7 Polymerase Gen	(162)
SAD L16	RV mit der Sequenz des Stammes SAD B19	(17, 133)
SAD eGFP-P	SAD L16 mit eGFP an den N-Terminus von P fusioniert	(39)
SAD eGFP-P G _{cvS}	SAD eGFP-P mit RV G des Stammes CVS	(S. Finke, unveröffentlicht)
SAD ΔG	SAD L16 mit Austausch der Deletion des RV G ORF komplementiert mit G des RV Stammes SAD	(93)
SAD ΔG eGFP	SAD L16 mit Austausch von RV G gegen eCherry, in trans komplementiert mit G des RV Stammes SAD	(158)

Material und Methoden

SAD ΔG mCherry	SAD L16 mit Austausch von RV G gegen eGFP, in trans komplementiert mit G des RV Stammes SAD	(S. Finke, unveröffentlicht)
SAD NPgrL	SAD L16 mit Austausch von RV M und G gegen DsRed und eGFP	(41)
SAD NP PrP ^C wt BDV	SAD NPgrL mit dem Austausch von DsRed gegen das Fusionsprotein PrP ^C wt BDV	in dieser Arbeit hergestellt
SAD NP PrP ^C Δ25-120 RVG	SAD NPgrL mit dem Austausch von DsRed gegen das Fusionsprotein PrP ^C Δ25-120 RVG	in dieser Arbeit hergestellt
SAD NP-eGFP-Gan-L	SAD NPgrL mit dem Austausch von DsRed gegen den RVG-Anker	(G. Walliser, unveröffentlicht)
SAD NP-eGFP-BDVan-L	SAD NPgrL mit dem Austausch von DsRed gegen den BDV-Anker	(G. Walliser, unveröffentlicht)
SAD tm-RFP	SAD-G-DsRed-N/P mit Austausch von DsRed gegen tm-RFP	(74), in dieser Arbeit hergestellt
SAD tm-RFP(Asn)	SAD-G-DsRed-N/P mit Austausch von DsRed gegen tm-RFP(Asn)	(74), in dieser Arbeit hergestellt
SAD tm-RFP(Asn319)	SAD-G-DsRed-N/P mit Austausch von DsRed gegen tm-RFP(Asn319)	(74), in dieser Arbeit hergestellt
SAD ΔG tm-RFP	SAD ΔG eGFP mit Austausch von eGFP gegen tm-RFP, in trans komplementiert mit G des RV Stammes SAD	in dieser Arbeit hergestellt
SAD eGFP-P tm-RFP	SAD eGFP-P mit tm-RFP zwischen dem G und dem L ORF	(74), in dieser Arbeit hergestellt
SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP	SAD eGFP-P Gcvs mit tm-RFP zwischen dem G und dem L ORF	(74), in dieser Arbeit hergestellt
SAD ΔG eGFP(CVS G)	SAD ΔG eGFP komplementiert mit G des RV Stammes CVS	in dieser Arbeit hergestellt
SAD ΔG eGFP(Mokola G)	SAD ΔG eGFP komplementiert mit G des Mokola Virus	in dieser Arbeit hergestellt
SAD ΔG eGFP(<i>Bat</i> Hamburg G)	SAD ΔG eGFP komplementiert mit G des <i>Bat</i> Hamburg Virus	in dieser Arbeit hergestellt
SAD ΔG eGFP(<i>Bat</i> Lagos G)	SAD ΔG eGFP komplementiert mit G des <i>Bat</i> Lagos Virus	in dieser Arbeit hergestellt
SAD ΔG eGFP(EnvARGCD)	SAD ΔG eGFP komplementiert mit dem EnvARGCD Protein	in dieser Arbeit hergestellt

2.5.4. Zelllinien

Tab. 7: Für die Promotion verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Organismus	Referenz
BSR	BHK-21 Klon	Hamster	J. Cox, BFAV Tübingen
BSR T7/5	BSR Zellen, mit T7-Polymerase Gen transfiziert	Hamster	S. Finke
BSR Teton	BSR Zellen mit reversem Tet repressor (Clontech)	Hamster	S. Finke
BSR Mon	BSR Zellen mit RV M Gen, kontrolliert vom Tetracyclin (Tet)-on Promotor	Hamster	S. Finke
BSR 136MGon	BSR Zellen mit RV M und RV G Gen, kontrolliert vom Tet-on Promotor	Hamster	S. Finke
BSR 139Gon	BSR Zellen mit RV G Gen, kontrolliert vom Tet-on Promotor	Hamster	S. Finke
BSR T7/5 tm-RFP	BSR T7/5 Zellen mit dem Fusionsprotein tm-RFP, kontrolliert vom CMV Promotor	Hamster	in dieser Arbeit hergestellt
532-136	BSR Klon78 Zellen mit dem Fusionsprotein PrP ^C wt RVG kontrolliert vom Tet-on Promotor	Hamster	in dieser Arbeit hergestellt
RVGkurz 332	BSR Klon78 Zellen mit dem Fusionsprotein PrP ^C Δ25-120 RVG kontrolliert vom Tet-on Promotor	Hamster	in dieser Arbeit hergestellt
BHK EnvARGCD	BHK-21 Zellen mit EnvARGCD Protein kontrolliert vom CMV- Promotor	Hamster	(159)
NA	Neuroblastoma	Maus	J. Cox, BFAV Tübingen
NA tm-RFP	NA Zellen mit tm-RFP Gen, kontrolliert vom CMV Promotor	Maus	(74), in dieser Arbeit hergestellt
NS20Y	Neuroblastoma Zellen	Maus	ATCC
293T TVA800	293T Zellen mit EnvA Rezeptor TVA800	Human	(159)
Vero	Affennieren Zellen	Grüne Meerkatze	ATCC

2.6. Methoden

2.6.1. Zellkultur

2.6.1.1. Passagieren von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37 °C, unter 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit (Standardbedingungen) im Brutschrank kultiviert. Zu den in Kap. 2.1.4. beschriebenen entsprechenden Kultivierungsmedien wurde bei den Zelllinien BSR T7/5 und NA tm-RFP Geneticin (G418, 1 mg/ml Medium) zugegeben. Die Zelllinien BSR Mon, BSR 136MGon, BSR 139Gon, BSR T7/5 tm-RFP wurden mit G418 (1 mg/ml Medium) und Hygromycin (0,5 mg/ml Medium) behandelt. Alle drei bis vier Tage wurde zunächst das alte Medium entfernt, dann die Zellen mit einer Trypsinlösung von den Zellkulturflaschen abgelöst und vereinzelt. Die abgelösten Zellen wurden in frisches Medium aufgenommen und in Verdünnungen von 1:5 bis 1:10 in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.6.1.2. Einfrieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und nach dem Erreichen eines konfluenten Zellrasens verwendet. Das alte Medium wurde abgenommen und die Zellen mit einer Trypsinlösung von den Zellkulturflaschen abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in 5 ml Medium wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Unter vorsichtigem Schwenken der Zellkulturflaschen mit den gelösten Zellen wurde auf Eis 8 % (v/v) DMSO zugegeben und die Zellen in 1 ml Aliquots portioniert und in einer Styroporbox bei -70 °C weggefroren. Nach 24 h bei -70 °C wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.6.1.3. Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden schnell bei 37 °C im Wasserbad oder im Brutschrank aufgetaut und in 6-Loch-Platten oder T25 Zellkulturflaschen mit vorgelegtem 1 ml oder 7 ml frischem Zellkulturmedium ausgesät. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.6.1.4. Transfektion von Zellen

Die Zellen wurden entweder mit der Kalziumphosphat (Ca₂PO₄)-Transfektionsmethode (51) mit dem Säugetier Transfektions Kit, mit Hilfe von kationischen Lipiden (FuGene6) oder Polyethylenimin (PEI) 25 transfiziert.

Ca₂PO₄- Transfektion von Zellen mit dem Säugetier Transfektions Kit

Für die Transfektion wurden 3×10^5 Zellen in 6-Loch-Platten oder in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät. Nach Inkubation der Zellen über Nacht bei Standardbedingungen wurde 1 h vor der Transfektion ein Mediumwechsel mit DMEM-Medium ohne Serum durchgeführt. Die gewünschte Menge an zu transfizierender DNA wurde auf Eis mit H₂O_{dd} und 10 µl der Lösung 1 des Kits auf 100 µl Gesamtvolumen verdünnt. Nach Zugabe von 100 µl Lösung 2 und Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur (RT) wurde der Ansatz vorsichtig auf die Zellen getropft. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst einmal mit Zellkulturmedium gewaschen und dann mit frischem Zellkulturmedium über Nacht im Brutschrank bei Standardbedingungen inkubiert.

Transfektion von Zellen mit FuGene6

Bei der Transfektion mit kationischen Lipiden binden diese an die negativ geladene DNA und fusionieren als Nukleinsäure-Liposomen Komplex mit der Zellmembran.

Zur Transfektion mit FuGene6 wurden 3×10^5 Zellen in 6-Loch-Platten oder in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. In Eppendorfreaktionsgefäßen wurden je 100 µl DMEM-Medium ohne Serum vorgelegt und pro 1 µg DNA 3 µl FuGene6-Lösung vorsichtig zugetropft. Der Ansatz wurde gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die gewünschte Menge an DNA zugesetzt. Nach erneuter Inkubation für 15 min bei RT wurde der Ansatz vorsichtig auf die Zellen gegeben und die Zellen über Nacht bei Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert.

Transfektion mit PEI25

Bei Polyethylenimin 25 handelt es sich um ein kationisches Polymer, welches Komplexe mit Nukleinsäuren bilden kann, und daher als Transfektionsreagenz gut geeignet ist.

Für die Transfektion mit PEI25 wurden 3×10^5 Zellen in 6-Loch-Platten oder in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. In Eppendorfreaktionsgefäßen wurden je 200 µl DMEM-Medium ohne Serum vorgelegt und dann die gewünschte Menge an DNA zugegeben. Pro 1 µg DNA wurde anschließend 2,5 µl PEI25-Lösung vorsichtig zugetropft, der Ansatz gemischt, für 20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann über Nacht bei Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert.

2.6.1.5. Differenzierung von Neuroblastomazellen

Zur Untersuchung der viralen Transportvorgänge in neuronalen Zellen wurden ausdifferenzierte, murine Neuroblastoma (NS20Y) Zellen verwendet. Die Ausdifferenzierung zu nicht-teilenden Zellen mit neuronalen Ausläufern erfolgte mit einigen Änderungen nach dem Protokoll von Grouse et al. (55). Für die Ausdifferenzierung wurden ca. 1×10^4 Zellen in μ -Slide VI (Ibidi) oder 4×10^4 Zellen in μ -Slide I (Ibidi) in frischem DMEM-Medium mit 5 % FKS ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen wurden 140 μ l bzw. 1 ml frisches DMEM-Medium mit 5 % FKS zugegeben. Mit Erreichen einer Zelldichte von 70 % Konfluenz wurde das alte Medium gegen DMEM-Medium mit nur 0,5 % FKS und 1 mM Butyryl-zyklisches Adenosin-3,5-monophosphat (cAMP) (Sigma-Aldrich) ausgetauscht. Nach sieben Tagen, in denen alle drei Tage ein Mediumwechsel erfolgte, wurde DMEM-Medium mit 5 % FKS, 50 μ M Cytosine- β -D-arabinofuranoside (AraC) (Sigma-Aldrich) und 300 μ M Uridin (Sigma-Aldrich) zugegeben und das Medium ebenfalls alle drei Tage erneuert.

Nach weiteren sieben Tagen war die Ausdifferenzierung der Zellen abgeschlossen und sie konnten mit Virus infiziert und die Transportvorgänge mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

2.6.1.6. Herstellung von stabilen Zelllinien

Um das RFP/RVG Protein (tm-RFP) stabil zu exprimieren, wurden zwei verschiedene Ausgangszelllinien verwendet. Es handelte sich hierbei um die Zelllinien BSR T7/5 und NA. BSR T7/5 Zellen wurden mit je 5 μ g des Plasmides pCR3 tm-RFP und je 5 μ g des Plasmides pTRE2Hyg, die NA Zellen hingegen nur mit je 5 μ g pCR3 tm-RFP mit Hilfe der Kalziumphosphat-Transfektionsmethode (Kapitel 2.6.1.4) transfiziert. pCR3 tm-RFP kodiert hierbei für das stabil zu exprimierende RFP/RVG Gen unter der Kontrolle des CMV Promotors und besitzt eine Neomycin-Resistenzkassette. Für die Herstellung von Zelllinien, welche rekombinante PrP^C-Fusionsproteine vom Tet-on Promotor Doxycyclin-abhängig exprimieren (Tet-on Zellen), wurden BSR Zellen des Klones 78 mit je 5 μ g des Plasmides pTRE2Hyg PrP^C wt RVG bzw. pTRE2Hyg PrP^C Δ 25-120 RVG transfiziert. pTRE2Hyg kodiert zusätzlich zu dem Tet-on Promotor hinter den die PrP^C-Konstrukte kloniert wurden, noch für das Hygromycin-Resistenzgen. 5 h nach der Transfektion wurden die Zellen in 96-Loch Platten mit einer Konzentration von 2 Zellen/96-Loch (bei den tm-RFP Plasmiden) bzw. 1 Zelle/96-Loch (bei den PrP^C-Konstrukten) ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde mit der Selektion der transfizierten Zellen durch die Kultivierung der Zellen in Gegenwart von Antibiotika, verdünnt in konditioniertem Medium, bestehend aus frischem Medium und alten

Medium im Verhältnis von 1:1, begonnen. Bei den tm-RFP exprimierenden Zellen wurde G418 (1 mg/ml) für die NA Zellen und G418 (1 mg/ml) und Hygromycin (0,5 mg/ml) für die BSR T7/5 Zellen benutzt. Für die Zellen, welche die PrP^C-Fusionsproteine exprimieren sollten, wurden G418 (1 mg/ml) und Hygromycin (0,5 mg/ml) als Selektionsmarker verwendet. Nach 10 Tagen Kultivierung mit den Selektionsantibiotika konnten die ersten Zellen beobachtet werden, die das rekombinante Protein RFP/RV G stabil exprimierten und daher im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop rot erschienen. Diese wurden dann in 48-Loch-Platten überführt und unter Selektionsdruck weiter kultiviert und dabei in immer größere Gefäße bis hin zu T25 Kulturflaschen überführt. Bei den PrP^C-Konstrukten wurden die entstandenen Zellklone bis in 6-Loch-Platten hochgezogen und dann die Zellklone in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin im Western Blot mit einem PrP^C-spezifischen Antikörper auf die Doxycyclin-abhängige Expression von PrP^C untersucht.

2.6.2. Immunfluoreszenz

Anheftung der Virionen an Deckgläser

Zur Anheftung von Viruspartikeln aus Virusüberständen auf Deckgläsern wurde das Protokoll von S. Finke verwendet (39). Es wurden 25 µl der Peakfraktion des Iodixanol-Dichtegradienten auf ein Deckglas getropft und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach der Anheftung der Viruspartikel an die Glasfläche des Deckglases wurden die Virionen zunächst fixiert und mittels Immunfluoreszenz gefärbt oder direkt auf zuvor schon mit Einbettmedium versehene Objektträger aufgebracht und im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert.

Direkte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von RV infizierten Zellen wurde die direkte Immunfluoreszenz mittels CentocorTM, welches an das RV N Protein bindet, verwendet. Dazu wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS und einmal mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen und anschließend mit 80 % (v/v) Aceton für 30 min bei 4 °C fixiert. Nach dem Trocknen der Zellen an der Luft wurde die Centocor-Antikörperlösung in einer Verdünnung von 1:200 in 1 x PBS zugesetzt und für 2 h bei 37 °C und im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit H₂O_{dd}, erfolgte die Auswertung am konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm bis 490 nm.

Indirekte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis verschiedener, viraler Proteine in nicht-infizierten-, in virus-infizierten Zellen oder in Virionen wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. Dazu wurden die Zellen oder die auf Deckgläsern angehefteten Viren mit Paraformaldehyd oder Aceton fixiert.

Paraformaldehydfixierung

Die Zellen oder die immobilisierten Virionen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und dann für 30 min bei RT mit 3 % Paraformaldehyd (3 % (w/v) Paraformaldehyd in 1 x PBS) fixiert. Danach wurden die Präparate dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Für die Immunfärbung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen oder Virionen für 15 min bei RT mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Präparate dreimal mit 1 x PBS gewaschen.

Acetonfixierung

Die Zellen oder die immobilisierten Virionen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen, dann für 30 min bei 4 °C mit 80 % (v/v) Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet. Danach wurden die Präparate dreimal mit 1 x PBS gewaschen.

Immunfärbung

Nach der Fixierung und der eventuell nötigen Permeabilisierung wurden die Präparate mit den für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörperlösungen (1:100 bis 1:200 in 1 x PBS) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die Inkubation der Proben mit den fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern (mit Alexa488 oder Alexa633 oder mit Carbocyanin (Cy)3 oder Cy5 konjugierte Antikörper gegen die IgGs der Maus oder des Kaninchens) für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Präparate zweimal mit 1 x PBS und einmal mit H₂O_{dd} gewaschen und unter der Verwendung von Einbettungsmedium mit Deckgläsern versehen. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Alexa488), 543 nm (Cy3) oder 633 nm (Cy5 und Alexa633).

2.6.3. Das konfokale Laserfluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Analyse von Verteilung und Fluoreszenzintensität von Zellbestandteilen. Das optische System ist hierbei so aufgebaut, dass eine gute Trennung der Anregungs- und Emissionswellenlänge eines Fluorochroms

ermöglicht wird. Durch den Anregungsfilter wird die für die Anregung eines bestimmten Fluorochroms benötigte Wellenlänge aus dem Licht der verwendeten Quecksilberdampf-Lampe heraus gefiltert. Der dichromatische Spiegel im inneren des Mikroskops reflektiert das Licht auf das zu betrachtende Präparat. Das Licht der Anregungswellenlänge wird reflektiert, während das vom Präparat zurück gestrahlte Licht mit der grösseren Wellenlänge durchgelassen wird. Der Emissionsfilter wird nun aufgrund der charakteristischen Anregungs- und Emissionswellenlängen des verwendeten Fluorochroms so gewählt, dass nur ausgewählte Emissionswellenlängen zur detektierenden Kamera oder zum Auge gelangen.

Das hier verwendete konfokale Laserfluoreszenzmikroskop Axiovert 200 mit einem Zeiss LSM510 Metasystem ermöglicht auch die dreidimensionale Betrachtung der Zellen oder Zellbestandteile. Es können Bildaufnahmen in verschiedenen Fokusebenen getätigt werden, die durch Projektion auf eine Ebene ein dreidimensionales Bild ergeben. Der verwendete Photomultiplier verstärkt die Fluoreszenzsignale einer Brennebene und das sogenannte *Pinhole*, welches konfokal zum fokussierten Lichtstrahl angebracht ist, schließt das Streulicht unter- und oberhalb der Fokusebene aus.

2.6.3.1. Benutzung des konfokalen Laserfluoreszenzmikroskops

Für die Bildaufnahmen wurde die Objektive: A-Plan 20 x/0.30 Ph1, Plan-Apochromat 63 x/1.4 Öl Ph3 und Fluar 40 x/1.3 Öl verwendet. Zu Verfügung standen folgende Laser: Argon/2 (458 nm, 477 nm, 488 nm, 514 nm), HeNe1 (543 nm) und HeNe2 (633 nm). Die Haupt- und Nebenverteiler HFT UV/488/543/633, HFT 488/543, HFT 543/633 und NFT 543 kamen zum Einsatz. Für die Proteine eGFP oder Cy3 und tdtomato oder DsRed wurden Laser-Anregungswellenlängen von 488 nm und 543 nm benutzt. Die Fluoreszenzemission wurde unter Verwendung des *band pass* Filters 505-530 nm für eGFP, des *band pass* Filters 585-615 nm, des *long pass* Filters >585 nm und des *long pass* Filters >560 nm für tdtomato oder DsRed detektiert. Für die Farbstoffe Cy5 und Alexa633 wurden eine Anregungswellenlänge von 633 nm und der *long pass* Filters >650 nm verwendet. Es wurden 8-Bit Bilder aufgenommen und jeder Farbkanal wurde einzeln aufgenommen und gespeichert. Um lebende Zellen unter dem konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop zu betrachten, wurden diese in μ -Schalen und μ -Slides (Ibidi) ausgesät und ausdifferenziert. Während der Beobachtung der Zellen wurden die Zellen in einer Heizkammer mit einer Temperatur von 37 °C und unter 5 % CO₂ gehalten. Die aufgenommen Bilder wurden mit Hilfe der *ImageJ* Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) ausgewertet und analysiert (Kapitel 3.8.1.2.).

2.6.3.2. Die Bildverarbeitung mit ImageJ

Die Rohbilder vom konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop wurden in *ImageJ* mit *Plugins*>*LSM Reader 3.2d* geöffnet. *ImageJ* öffnet dabei jeweils ein Bild für jeden aufgenommenen Kanal. Für die im Ergebnis-Teil gezeigten Aufnahmen wurden die LSM-Kanäle (*lsm Channels*) Ch2-T1 (grün), Ch3-T1 (rot) und bei einigen Bildern ChD-T1 (für das nicht-konfokale *differential interference contrast* (DIC)) verwendet. Für die Farbkanäle wurde mit der Funktion *Image*>*Adjust*>*Brightness/Contrast* über die Regler Minimum und Maximum ein guter Kompromiß zwischen Helligkeit und Kontrast ermittelt. Anschließend wurde die Funktion *Process*>*Smooth* angewendet. In einem weiteren Schritt wurden nochmals Helligkeit und Kontrast angepasst und die Funktion *Smooth* gewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass beide Farbkanäle in etwa gleich behandelt wurden. Bei dem DIC-Kanal wurde nur eine Anpassung von Helligkeit und Kontrast vorgenommen. Erfolgte keine Unterlegung der Aufnahmen mit DIC-Bildern, so wurde über *Image*>*Color*>*RGB Merge* ein RGB-Bild angefertigt, wobei grün den LSM-Kanal Ch2-T1 und rot Ch3-T1 darstellte. Ansonsten wurde die Funktion *Plugins*>*Color functions*>*RGB Gray Merge* verwendet und grau für den DIC-Kanal verwendet. Da die entstandenen RGB-Bilder nur noch Pixelangaben enthalten, wurden die Angaben der Originalbilder (*Image*>*Properties*>*Unit of length* in μm und die *Pixels/Unit*) für das RGB-Bild übernommen. Dies ermöglichte über *Plugins*>*Spatial calibration*>*Add scale bar* die Verwendung von Skalierungsbalken.

Handelte es sich um eine Bildserie, bei der von lebenden Zellen in definierten Zeitabständen Aufnahmen getätigt wurden waren, so wurde am Originalbild mit der Funktion *Plugins*>*LSM Reader 3.2d*>*Apply t-stamp*>*Dump to textfile* die Zeitabstände zwischen den einzelnen Bildaufnahmen aufgerufen. Für das RGB-Bild wurde dann über *Plugins*>*Movies*>*Time stamper*>*time between frames* der Zeitabstand in Sekunden eingegeben. Bildaufnahmen über die Zeit wurden als *Avi*-, die anderen Bilder als *Jpeg*-Dateien abgespeichert. Spezialanwendungen von *ImageJ* werden im Detail in den entsprechenden Kapiteln des Ergebnis-Teils beschrieben.

2.6.4. Arbeiten mit Viren

2.6.4.1. Herstellung rekombinanter Tollwutviren aus cDNA (Virus rescue)

Für die Herstellung rekombinanter Tollwutviren aus cDNA (133) wurden 1×10^6 BSR T7/5 Zellen in 8 cm^2 Kulturschalen ausgesät und für 24 h inkubiert. Zusammen mit einem Plasmid, das die komplette cDNA-Sequenz des RV-Genoms enthält (Gesamtklon cDNA) ($10 \mu\text{g}$

Plasmid-DNA), wurden die Expressionsplasmide für die viralen Proteine RV N (5 µg pTIT-N), RV P (2,5 µg pTIT-P) und RV L (2,5 µg pTIT-L) mit Hilfe der Kalziumphosphat-Transfektionsmethode transfiziert. Die stabil in die BSR Zellen transfizierte T7-Polymerase ermöglichte dann die Expression der Proteine RV N, RV P und RV L. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Viruspartikel mittels Zentrifugation (1600 rpm, 4 °C, 10 min) von den Zellbestandteilen getrennt und auf BSR oder BSR T7/5 Zellen passagiert.

2.6.4.2. Herstellung rekombinanter, G-defizienter Tollwutviren aus cDNA (modifizierter Virus rescue)

Zur Erzeugung von G-defizienten Tollwutviren aus cDNA wurden die Zellen wie in Kapitel 2.6.4.1. beschrieben zunächst mit der Gesamtklon cDNA der entsprechenden Viren und den benötigten Expressionsplasmiden transfiziert. 48 h, 72 h und 96 h nach der ersten Transfektion wurden die Zellen mit je 10 µg des Expressionsplasmides für RV G (pTIT-G) übertransfiziert. 48 h nach der 3. Übertransfektion mit RV G wurden die Zellen mit einer Trypsinlösung von den Zellkulturschalen gelöst und 1:1 mit BSR 139Gon Zellen, welche RV G Doxycyclin-abhängig exprimieren, gemischt. 24 h, 48 h und 72 h nach dem Mischen der BSR T7/5 Zellen mit den BSR 139Gon Zellen wurden die Zellen erneut mit je 10 µg pTIT-G übertransfiziert. Vier Tage nach der letzten Übertransfektion mit RV G wurde der Zellkulturüberstand auf frische BSR 139Gon Zellen gegeben (1.Virusüberstandspassage). Einen Tag nach der Virusüberstandspassage wurde durch die Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) die Expression des viralen RV G Proteins induziert. Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz 1:3 geteilt und weiter kultiviert. Die Ausbreitung der viralen Infektion in der Zellkultur wurde durch die Fluoreszenz des vom viralen Genom exprimierten rekombinanten Fluoreszenzprotein tm-RFP beobachtet.

2.6.4.3. Herstellung rekombinanter, G-defizienter Pseudotyp-Tollwutviren mit Hilfe einer transkomplementierenden Zelllinie

Zur Erzeugung von G-defizienten Pseudotyp-Tollwutviren wurde eine 25 cm² Zellkulturflasche konfluenten Zellen, welche das zu komplementierende Protein Doxycyclin-abhängig exprimieren (BSR 139Gon), 1:4 auf neue 25 cm² Zellkulturflaschen geteilt. Die Zellen wurden dann mit einer infektiösen Einheit pro Zelle (*multiplicity of infection* (MOI)) von 0,01 mit dem Tollwutvirus SAD ΔG eGFP infiziert. 72 h nach Infektion wurde das erste Mal Zellkulturüberstand abgenommen (1.Ernte), die Viren durch Zentrifugation (1600 rpm,

4 °C, 10 min) von den Zellbestandteilen abgetrennt, portioniert und bei -70 °C eingefroren. Sechs Tage nach der Infektion erfolgte dann die zweite Ernte.

2.6.4.4. Herstellung rekombinanter, G-defizienter Pseudotyp-Tollwutviren mit Hilfe eines transkomplementierenden Plasmides

Zur Erzeugung von G-defizienten Pseudotyp-Tollwutviren wurde eine 25 cm² Zellkulturflasche konfluenter BSR T7/5 Zellen 1:4 auf neue 25 cm² Zellkulturflaschen geteilt. Die Zellen wurden dann mit einer MOI von 0,01 mit dem Tollwutvirus SAD ΔG eGFP infiziert. 24 h nach Infektion wurden je 3 x 10⁵ der infizierten Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und nach Inkubation der Zellen über Nacht bei Standardbedingungen wurden die Zellen wie in Kapitel 2.6.1.4. beschrieben mit der Kalziumphosphat-Transfektionsmethode mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurde das erste Mal Zellkulturüberstand abgenommen (1.Ernte), die Viren durch Zentrifugation von den Zellbestandteilen abgetrennt, portioniert und bei -70 °C eingefroren. Sechs Tage nach der Infektion erfolgte dann die zweite Ernte.

2.6.4.5. Herstellung von RV Virusstocks

Zur Präparation von Tollwut Virusstocks wurde eine 25 cm² Zellkulturflasche konfluenter BSR T7/5 Zellen 1:4 auf neue 25 cm² Zellkulturflaschen geteilt. Die Zellen wurden dann mit einer MOI von 0,1 mit Tollwutvirus infiziert. 48 h nach Infektion wurde das erste Mal Zellkulturüberstand abgenommen (1.Ernte), die Viren durch Zentrifugation von den Zellbestandteilen abgetrennt, portioniert und bei -70 °C eingefroren. 96 h nach der Infektion erfolgte dann die zweite Ernte. Bei langsamer wachsenden, rekombinanten Tollwutviren erfolgte die erste Ernte erst 72 h nach der Infektion.

2.6.4.6. Herstellung von rekombinanten MVA Virusstocks

Zur Herstellung von MVA Virusstocks wurde eine 25 cm² Zellkulturflasche konfluenter BSR T7/5 Zellen 1:3 auf neue 25 cm² Zellkulturflaschen geteilt. Die Zellen von einer dieser Zellkulturflaschen wurden mit einer MOI von 1 mit Vaccinia Virus infiziert. Anschließend wurden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert bis sich die meisten Vaccinia Virus-infizierten Zellen abgerundet hatten (nach ca. zwei bis drei Tagen). Dann wurden die Vaccinia Virus-infizierten Zellen jeweils zur Hälfte auf zwei 175 cm² Zellkulturflaschen mit konfluenten BSR T7/5 Zellen gegeben. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen so lange kultiviert bis die Zellen sich abgerundet hatten. Danach wurden die Zellen in dem alten Medium von den Zellkulturflaschen gelöst und mittels Zentrifugation (20 min, 4 °C,

3.500 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium aufgenommen, durch dreimaliges Einfrieren bei -70 °C, anschließendem Auftauen bei 37 °C und durch Ultraschallbehandlung (3 Stöße) lysiert. Der Virusüberstand wurde dann zu 100 µl Aliquots portioniert und bei -70 °C gelagert.

2.6.4.7. Ankonzentrierung von virushaltigen Überständen mittels Sucrosekissen

Virushaltige Zellkulturüberstände wurden mittels Ultrazentrifugation über ein Sucrosekissen aufgereinigt. Zwei Tage nach Infektion der Zellen wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen und in einem ersten Zentrifugationsschritt von den Zellbestandteilen abgetrennt. Dann wurde in Ultrazentrifugationsröhrchen 4 ml einer 20 %igen (w/v) Sucroselösung in 1 x TEN-Puffer vorgelegt. Die 20 %ige Sucroselösung wurde anschließend mit 1 ml einer 60 %igen (w/v) Sucroselösung unterschichtet. Dieses Sucrosekissen wurde dann mit 12 ml virushaltigem Zellkulturüberstand überschichtet. Nach der Ultrazentrifugation der Proben für 2 h bei 27.0000 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge wurde die Interphase zwischen den beiden Sucroseschichten durch Punktion mit einer Kanüle abgenommen. Der aufgereinigte Virusüberstand konnte dann weiter verarbeitet oder direkt analysiert werden.

2.6.4.8. Ankonzentrierung von virushaltigen Überständen mittels Iodixanol-Gradienten

Zum Nachweis der Inkorporation von Fremdproteinen in Virionen und zur Quantifizierung von Proteinanteilen in den Viruspartikeln wurden Iodixanol-Dichtegradienten (OptiprepTM, Axis-Shield) durchgeführt. Dazu wurden 3×10^6 BSR T7/5 Zellen mit einer MOI von 1 mit dem entsprechenden Tollwutvirus infiziert. Zwei Tage nach Infektion der Zellen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und in einem ersten Zentrifugationsschritt von den Zellbestandteilen getrennt. Eine Aufkonzentrierung der im Zellkulturüberstand befindlichen Virionen erfolgte durch Zentrifugation der Virusüberstände durch Millipore Säulen (Centricon Plus-20, Polyethersulfone 100.000 MVV CO, Millipore), die nur von Proteinen, die kleiner als 100 kDa sind, passiert werden können. Die aufkonzentrierte Virussuspension wurde in 1 x TEN-Puffer verdünnt. Zur Herstellung des Dichtegradienten wurden je 6 ml einer 10 %igen und 35 %igen Iodixanolösung (10 % bis 35 % Iodixanolgradient) mit Hilfe eines Gradientenmischers zu einem kontinuierlichen Gradienten aufgeschichtet. Auf die 12 ml des Gradienten wurde die in 1 x TEN-Puffer verdünnte Virussuspension überführt. Nach 18 h Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge (Beckman SW28, 27.000 rpm, 4 °C) zur Einstellung des Dichtegradienten wurde der Bereich des Auftrages entfernt und es wurden 12 Fraktionen von jeweils 1 ml (mit Fraktion 1 als oberste Fraktion und Fraktion 12 als unterste Fraktion) gesammelt. Nach SDS-PAGE und Western Blot (Kapitel 2.6.8.2. und 2.6.8.3.) wurde die

Inkorporation von Fremdproteinen und der Proteinanteil in den Virionen der einzelnen Fraktionen mit RV N, P, M und G Protein spezifischen Antikörpern oder mit einem Antikörper spezifisch für DsRed (α DsRed) analysiert. Zusätzlich konnte der Gehalt an infektiösen Viren in den einzelnen Fraktionen durch Titration bestimmt werden.

2.6.4.9. Bestimmung des Virustiters

Die Menge an infektiösen Viruspartikeln einer Virusstock Präparation wurde durch die Virustitration bestimmt. Je nach Virus wurden zwei Methoden verwendet: die Tollwutvirus- oder die MVA-Titration.

Tollwutvirus Titration

Zur Bestimmung des Tollwutvirus Titers wurden die BSR T7/5 Zellen einer 25 cm² Zellkulturflasche mit einer Trypsinlösung abgelöst und in 20 ml frisches Zellkulturmedium aufgenommen. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte wurden 100 μ l Zellen eingesät und für 2 h bei Standardbedingungen kultiviert. Es wurden sieben Verdünnungsstufen (10^{-1} bis 10^{-7}) durch serielle 1:10 Verdünnungen von Virusüberstand in Zellkulturmedium ohne Serum vorbereitet. Jeweils 100 μ l der Verdünnungsstufen wurde pro Vertiefung der 96-Loch-Platte auf die Zellen gegeben. 48 h bzw. 72 h (bei den Viren SAD Δ G oder SAD eGFP-P und deren rekombinanten Abkömmlingen) nach Kultivierung der Zellen unter Standardbedingungen wurden die Zellen wie in Kapitel 2.6.2. beschrieben fixiert und mittels direkter Immunfluoreszenz gefärbt. Die Foci wurden anschließend im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm bis 490 nm ausgezählt. Bei Tollwutviren, die ein Fluoreszenzprotein, ein rekombinantes Fluoreszenzprotein oder ein Fusionsprotein aus RV P und fluoreszierendem eGFP von ihrem Genom aus exprimieren, wurden die Zellen nur fixiert und danach direkt im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert.

MVA Titration (LacZ positive rekombinante Viren)

Die hier verwendeten rekombinanten Vaccinia Viren (MVA) exprimieren das Gen der β -Galaktosidase (LacZ) als Reportergen. Virusinfizierte Zellen sind daher LacZ positiv und können durch eine Enzymreaktion identifiziert werden. BSR T7/5 Zellen einer 25 cm² Zellkulturflasche wurden mit einer Trypsinlösung abgelöst und in 30 ml frisches Zellkulturmedium aufgenommen. Je 500 μ l Zellsuspension wurde pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte eingesät und für 2 h bei Standardbedingungen kultiviert. Für die MVA Titration

wurden neun Verdünnungsstufen (10^{-1} bis 10^{-9}) von Virusüberstand in Zellkulturmedium ohne Serum vorbereitet und je 100 μ l pro Verdünnungsstufe wurde auf die Zellen gegeben. 48 h nach Kultivierung der Zellen unter Standardbedingungen konnten die Virus-infizierten Zellen fixiert und einer 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) Färbung unterzogen werden. Die infizierten und X-Gal gefärbten Zellen konnten anhand ihrer dunkelblauen Färbung identifiziert und die Foci unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden.

Fixierung und X-Gal Färbung von LacZ positiven, MVA-infizierten, Zellen

Fixierlösung

2 % (w/v) Paraformaldehyd
0,2 % (v/v) Glutaraldehyd
in 1 x PBS

Färbelösung

5 mM $K_3Fe(CN)_6$ (Kaliumferricyanid)
5 mM $K_4Fe(CN)_6 \times H_2O$ (Kaliumferrocyanid)
2 mM $MgCl_2$
1 mg/ml X-Gal, gelöst in DMSO
in 1 x PBS

Die Fixierung der Virus-infizierten Zellen erfolgte durch Zugabe von je 2 ml Fixierlösung pro Vertiefung der 24-Loch-Platte und Inkubation für 10 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und für 10-60 min bei 37 °C mit der Färbelösung inkubiert.

2.6.5. Verwendung von *E.coli*

2.6.5.1. Anzucht von *E.coli*

Für die Anzucht von *E.coli* verwendete Medien:

LB Medium:

1 % (w/v) Bacto-Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
1 mM $MgSO_4$

LB Agar Platten:

1 % (w/v) Bacto-Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
1 mM $MgSO_4$
1,5 % (w/v) Agar

Je nach Selektionsmarker auf den verwendeten Plasmiden wurde zur Selektion auf Bakterien, welche das gewünschte Plasmid enthalten, Ampicillin (100 mg/ml) oder Kanamycin (25 mg/ml) verwendet. Die *E.coli* Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C und unter Schütteln kultiviert.

2.6.5.2. Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Benötigte Medien:

LB⁺⁺-Medium	Kalziumchlorid-Puffer
LB-Medium	60 mM CaCl ₂
20 mM MgSO ₄	10 mM Pipes, pH 7,1
10 mM KCl	15 % (v/v) Glycerin

Bakterienzellen des *E.coli* K12 Stammes, wozu auch die XL1-Blue Zellen gehören, können gut mit der CaCl₂-Methode kompetent gemacht werden.

Dazu wurden 100 ml LB⁺⁺-Medium mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und unter Schütteln bis zu einer Optischen Dichte (OD)₆₆₀ von ca. 0,6 inkubiert. Nach dem Abstoppen des Bakterienwachstums durch Überführung der Zellen in eiskalte Zentrifugenröhrchen, wurden die Zellen bei 4 °C und 4.000 rpm für 10 min abzentrifugiert, das Zellsediment in 1/4 Volumen eiskaltem Kalziumchlorid-Puffer resuspendiert und für 40 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4 °C und 4.000 rpm für 10 min und Resuspendierung in 1/20 Volumen Kalziumchlorid-Puffer sind die Zellen kompetent. Diese wurden dann noch 1 bis 3 h auf Eis inkubiert, portioniert und bei -70 °C gelagert.

2.6.5.3. Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien

Die Transformation dient zur Einbringung von genetischem Material, meist Plasmid-DNA, in zuvor kompetent gemachte Bakterienzellen, wobei das Plasmid extrachromosomal in der Zelle verbleibt. Transformiert wurden nun entweder ca. 10-50 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes (1/2 Volumen). Die kompetenten Bakterienzellen (Kapitel 2.6.5.2.) wurden auf Eis aufgetaut, die DNA dann zu jeweils 50 µl kompetenter Zellen zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 min auf Eis, wurden zu den Transformationsansätzen jeweils 200 µl LB⁺⁺ gegeben, der Ansatz für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert und anschließend auf LB Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert. Bei der Transformation von Plasmid-DNA wurde nur eine Platte (200 µl) ausplattiert, während bei der Transformation von Ligationsansätzen mindestens zwei Platten mit jeweils 100 µl pro Platte ausgestrichen wurden. Die Selektionsplatten wurden dann bei 37 °C über Nacht inkubiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden gepickt und zur Plasmid-DNA Isolierung in je 1 ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C und unter Schütteln kultiviert.

2.6.5.4. Plasmid-DNA Präparation aus *E.coli*

Plasmid-Präparationen werden zur Isolierung von *supercoiled* plasmidischer DNA aus Bakterienzellen genutzt. Je nach der zu erzielenden Plasmid-DNA-Ausbeute lässt sich die Plasmid-Präparation in eine Minipräparation mit nur geringer Ausbeute und eine Midipräparation zur Gewinnung grösserer Plasmid-DNA Konzentrationen einteilen.

Plasmid-Minipräparation nach der Methode der alkalischen Lyse

Verwendete Puffer:

Puffer Flexi 1	Puffer Flexi 2	Puffer Flexi 3
100 mM Tris-HCl, pH 7,5	200 mM NaOH	300 mM KAc, pH 5,75
10 mM EDTA, pH 8	1 % (w/v) SDS	(mit HAc eingestellt)
400 µg/ml RNaseI		

Die Übernachtskultur (Kapitel 2.6.5.3.) wurde bei 13.000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellsediment in 200 µl Puffer Flexi 1 resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde zur Lyse 200 µl Puffer Flexi 2 zugegeben, das Ganze vorsichtig gemischt, bis die Lösung klar und viskos aussah und dann für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zur Neutralisation 200 µl Puffer Flexi 3 zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 10 min wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgesäß transferiert. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 420 µl Isopropanol und Inkubation für 10 min. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm pelletiert und einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm wurde die DNA luftgetrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert.

Plasmid-Midipräparation

Für die Plasmid-Midipräparationen wurden 2 µl einer Plasmid-Minipräparation zu je 50 µl kompetenter *E.coli* Zellen transformiert (Kapitel 2.6.5.3.) und die transformierten *E.coli* Zellen direkt zu 100 ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben und über Nacht bei 37 °C und unter Schütteln kultiviert. Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurden die Nucleobond-Säulen (PC-100), die Puffer (S1-S3, N2, N3 und N5) und auch das Protokoll der Firma Macherey-Nagel verwendet.

2.6.6. Arbeiten mit DNA

2.6.6.1. Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction (PCR)*)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Segmenten aus einem Nukleinsäuregemisch eingesetzt (126, 127). Der zyklisch verlaufende Prozess aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des DNA-Segmentes, welches sich zwischen den Bindestellen der gegenläufigen Oligonukleotid-Primer befindet.

Für eine Standard PCR mit einem Gesamtvolumen von 100 µl wurde 100 ng DNA eingesetzt und mit je 25 pmol Primer gemischt. Des Weiteren wurden 10 µl 10 x Reaktionspuffer mit MgSO₄ für die BioPfu-Polymerase, 10 µl DMSO, 1 µl dNTPs (25 µmol) und 0,5 µl BioPfu-Polymerase (5 U/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 sek bei 95 °C denaturiert. Bei den folgenden 30 Zyklen erfolgte die Denaturierung bei 95 °C für 30 sek, die Hybridisierung für 30 sek bei 43 °C und die Elongation für 1 min bei 68 °C. Nach abgeschlossener PCR wurde das PCR-Produkt mit dem QiaQuick PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers Qiagen aufgereinigt und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese die Größe des PCR-Produktes bestimmt.

2.6.6.2. Aufreinigung von DNA über Silicasäulen

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Reaktionsgemischen, wie z.B. einem PCR-Ansatz, wurde das Qiagen QiaQuick Nucleotide Removal Kit nach den Angaben des Herstellers Qiagen verwendet.

2.6.6.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

DNA-Probenpuffer:

15 % (w/v)	Ficoll 400
0,125 % (w/v)	OrangeG+
5 x	TAE-Puffer

Bei der Agarosegelelektrophorese wurden 1 %ige bis 2 %ige (w/v) Agarosegele in 1 x TAE-Puffer (Kapitel 2.1.4.) verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen mit dem TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst und in die entsprechende Gießvorrichtung gegossen. Nach der Polymerisierung des Agarosegels wurde dieses in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1 x TAE-Puffer (+ 0,02 % Ethidiumbromid) übergossen. Die DNA-Probe wurde mit DNA-Probenpuffer gemischt, aufgetragen und bei 4-8 V/cm aufgetrennt. Durch die UV-

Bestrahlung bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ wurde die DNA sichtbar und die DNA-Fragmentgröße konnte durch Vergleich mit dem ebenfalls aufgetragenen Standard-Größenmarker (1 kb *ladder*, Life Technologies) bestimmt werden.

2.6.6.4. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung und Aufreinigung der DNA-Fragmente (geschnittene plasmidische DNA-Regionen, PCR-Produkte) erfolgte mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers Qiagen. Für Fragmente, die grösser als 10 kb waren, wurde das QiaExII Gel Extraction Kit, ebenfalls von Qiagen, verwendet. Auch hier wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

2.6.6.5. DNA Modifikationen

Fragmentierung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Zur Fragmentierung plasmidischer DNA oder PCR-Produkte wurden die Restriktionsenzyme und die Puffer der Firma New England Biolabs (NEB) verwendet. Der Restriktionsansatz bestand aus der zu fragmentierenden DNA in geeigneter Konzentration, dem Restriktionsenzym puffer und dem Restriktionsenzym. $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ wurde zum Auffüllen des Gesamtvolumens verwendet. Restriktionspuffer und Enzyme wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt und eventuell noch BSA (nach Herstellerangaben) zugesetzt. Zum Abstoppen des Restriktionsendonukleaseverdau wurde der Ansatz hitzeinaktiviert (20 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ oder $80 \text{ }^\circ\text{C}$) oder es erfolgte eine Aufreinigung des Ansatzes über die Agarosegelelektrophorese.

Herstellung glatter Enden mittels Mungbean Nuklease und Klenow-Enzym

Die meisten Restriktionsendonukleasen erzeugen durch ihre enzymatische Aktivität Einzelstrangüberhänge, sogenannte *sticky ends*. Diese können nur dann miteinander ligiert werden, wenn die erzeugten Enden miteinander kompatibel sind. Zur Ligation von nicht-kompatiblen DNA-Enden eines Restriktionsendonukleaseverdau müssen glatte und damit kompatible Enden erzeugt werden. Das Enzym Mungbean Nuklease erkennt DNA/RNA-Einzelstränge, schneidet überhängende Einzelstrang-DNA ab und erzeugt dadurch glatte Enden. Das Klenow-Enzym hingegen, das ebenfalls Einzelstrang-DNA erkennen kann, füllt überhängende 5'-Enden auf und baut überhängende 3'-Enden ab. Beide Enzyme stammten von der Firma NEB und wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Aufreinigung der DNA-Fragmente wurde das QiaQuick Nucleotide Removal Kit nach den Angaben des Herstellers Qiagen verwendet.

Dephosphorylierung von 5'-Enden

Bei der Fragmentierung von plasmidischer DNA mit kompatiblen Enden kommt es immer wieder zur Religation der plasmidischen DNA, wodurch eine normale Ligation verhindert wird. Durch die Dephosphorylierung der 5'-Enden geschnittener DNA wird dieser Prozess verhindert. Zur Dephosphorylierung wurde die *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) der Firma Roche nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde hitzeinaktiviert und dann direkt für die DNA-Ligation verwendet.

2.6.6.7. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der konstruierten Plasmide und cDNA-Gesamtklone erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger. Sie wurde von der Forschungs-und Arbeitsgemeinschaft (AG) Blum oder der Firma Medigenomix durchgeführt. Zur Sequenzierung bei der AG Blum wurden 500 ng DNA in 5 µl H₂O_{dd} gelöst und 1 µl Primer (3 pmol/µl) zugegeben. Für Medigenomix wurden nach Firmenangaben 200 ng DNA in 9 µl H₂O_{dd} gelöst und 1 µl Primer (10 pmol/µl) zugegeben.

2.6.7. Arbeiten mit RNA

Zur Verhinderung des RNA-Abbaus durch RNAsen wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen mit H₂O_{dd} Diethylpyrocarbonat (DEPC) angesetzt. Dazu wurde H₂O_{dd} mit DEPC versetzt und über Nacht bei RT gerührt und anschließend autoklaviert (20 min, 137 °C, 0,5 MPa).

2.6.7.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Virus-infizierten Zellen

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Virus-infizierten Zellen, wurde das RNeasy Kit und das Protokoll des Herstellers Qiagen verwendet. Die konfluenten Zellen einer 35 mm Zellkulturschale wurden mit 350 µl RTL-Puffer überschichtet und lysiert. Das Lysat wurde mit 350 µl 70 % (v/v) Ethanol-DEPC gemischt und auf die Säule gegeben. Nach der Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm und RT in einer Tischzentrifuge wurde der Durchfluß verworfen und die Säule einmal mit RW1- und zweimal mit RPE-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm und RT und der jeweilige Durchfluß wurde verworfen. Zur Entfernung von Pufferrückständen wurde die Säule für 2 min bei 14.000 rpm und RT trocken zentrifugiert. Zur Eluation der RNA wurden 30-60 µl H₂O_{dd} DEPC auf die Säule gegeben und diese für 1 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert.

2.6.7.2. Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz des Glykoproteins des Tollwutvirus-Stammes CVS wurde zunächst die während der Tollwutvirus-Infektion gebildete Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 2.6.7.1.) und mit Hilfe der Reverse Transkriptase (RT), einer RNA-abhängige DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben. Die gebildete cDNA wurde anschließend als Ausgangsmaterial in einer Standard-PCR (Kapitel 2.6.6.1.) verwendet, um die spezifische Sequenz des RV G zu amplifizieren.

Für eine Standard RT-PCR mit einem Gesamtvolumen von 42 µl wurde 1 µg RNA eingesetzt und mit je 3 µl (30 pmol) Reverse-Primer und 0,5 µl RNAsin gemischt. Zum Denaturieren wurde die Probe für 10 min bei 65 °C, zur Hybridisierung für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 2 µl dNTPs (25 µmol), 5 µl 10 x Puffer für die Reverse Transkriptase und 1 µl Reverse Transkriptase zugesetzt. Die Reverse Transkriptase-Reaktion erfolgte für 1 h bei 37 °C mit einem abschließenden Inkubationsschritt für 5 min bei 90 °C.

2.6.8. Arbeiten mit Proteinen

2.6.8.1. Deglykosylierung von Proteinen

Zur Bestimmung der Glykosylierungsform eines Proteins wurden Zelllysate einer Deglykosylierungsreaktion unterzogen.

Denaturierungspuffer

1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

0,5 % (w/v) SDS

Probenaufbereitung

Die Zellen wurden einmal mit 1 x PBS gewaschen und dann mit 1 x PBS 5 mM EDTA von den Zellkulturflasch abgelöst. Durch Zentrifugation für 3 min bei 5.000 rpm und 4 °C in einer Tischzentrifuge wurden die Zellen pelletiert und dann noch zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Denaturierungspuffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis konnten die Proben für verschiedene Deglykosylierungsreaktionen verwendet werden.

Peptid N-Glykosidase F (PNGaseF)-Deglykosylierung

PNGaseF spaltet Zuckerketten, welche an die AS Asparagin angebunden sind. Dabei wird die Verbindung zwischen Asparagin und N-Acetylglukosamin direkt an der AS getrennt. Die Spaltungsreaktion erfolgt dabei unabhängig von dem Aufbau der Zuckerkette.

Die denaturierten Proben wurden mit 10 % Nonidet P40 (NP40) und 10 x Reaktionspuffer G7 des Herstellers NEB nach den Herstellerangaben auf die Reaktionsbedingungen eingestellt. Die Deglykosylierungsreaktion erfolgte für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Proben in SDS-Probenpuffer (Kapitel 2.6.8.2.) aufgenommen und mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 2.6.8.2.).

Endoglykosidase H (EndoH)-Deglykosylierung

EndoH spaltet ebenfalls Zuckerketten von Asparagin ab; jedoch müssen die Zuckerketten in einer bestimmten Form vorliegen. Hauptsächlich werden durch EndoH mannosereiche Zuckerketten und noch einige wenige, hybride Zwischenformen, die als Intermediate bei der Reifung der Glykosylierung auftreten, gespalten.

Für die EndoH-Deglykosylierung wurden die Proben durch Zugabe von 10 x Reaktionspuffer G5 nach den Herstellerangaben von NEB auf die Reaktionsbedingungen eingestellt. Nach der Inkubation der Ansätze für 2 h bei 37 °C wurden die Proben in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

2.6.8.2. Auftrennung von Proteinen mittels denaturierender Polyacrylamidgele (SDS-PAGE)

SDS-Probenpuffer:

2 % (w/v) SDS
62,5 mM Tris-HCl
6 M Harnstoff
10 % (v/v) Glyzerol
5 % (v/v) β -Mercaptoethanol
0,01 % (w/v) Bromphenolblau
0,01 % (w/v) Phenolrot

Sammelgel (4 %):

1,4 ml Acrylamidlösung 40 % (w/v) (29:1)
3,5 ml Gelpuffer (Kapitel 2.1.4.)
9 ml H₂O_{dd}
18 μ l TEMED
116 μ l APS

Trenngele:

(die Mengen beziehen sich auf mittlere (16 x 14 cm) Gele, für große (20 x 20 cm) Gele wurde der 1,5fache Ansatz verwendet)

	10 %	12 %
Gelpuffer	12 ml	12 ml
H ₂ O _{dd}	12,9 ml	11,1 ml
Acrylamidlösung	9 ml	10,8 ml
Glyzerin	2 ml	2 ml
APS	17 µl	17 µl
TEMED	175 µl	175 µl

Zunächst wurden die beiden Glasplatten für die mittleren bzw. großen Gele mit 100 % Aceton gereinigt. Getrennt durch den 1,5 mm Abstandshalter wurden die beiden Glasplatten (für ein Gel) in zwei Gießbeutel verpackt und dann in die Gießvorrichtung eingespannt. Die Trenngellösung wurde mit Hilfe einer Glaspipette zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und die Lösung dann mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 3 bis 4 h hatte sich die Trenngellösung zum Trenngel auspolymerisiert und das Isopropanol konnte abgegossen werden. Nun wurde das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und in die Sammelgellösung der Probenkamm eingesetzt. Nach weiteren 2 h war auch die Sammelgellösung polymerisiert und der Probenkamm konnte entfernt werden. Nach Reinigung der Probenkammtaschen mit H₂O_{dd} wurden die Glasplatten in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt. Die obere Kammer der Apparatur wurde mit Kathodenpuffer, die untere Kammer wurde mit Anodenpuffer befüllt (Kapitel 2.1.4.). Für den Auftrag auf das Polyacrylamidgel wurden die Proben 1:2 mit SDS-Probenpuffer gemischt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden anschließend in die Taschen aufgetragen und die Proteine durch Anlegen einer konstanten Spannung von 30 bis 60 Volt über Nacht im Gel aufgetrennt.

2.6.8.3. Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulose- oder Polyvenyldifluorid (PVDF)-Membranen (Western Blot)

Semidry-Transferpuffer:

48 mM Tris-HCl, pH 8,3

39 mM Glyzin

0,005 % (w/v) SDS

18 % (v/v) Methanol

Waschpuffer:

1 x PBS

0,05 % (v/v) Tween-20

Material und Methoden

Nach der Auftrennung der Proteine in dem Polyacrylamidgel wurde das Gel aus den Glasplatten gelöst und für 15 min in Semidry-Transferpuffer geschwenkt. Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine Nitrozellulose oder eine PVDF-Membran (Schleicher&Schuell). Polyacrylamidgel und Membran wurden zwischen Whatman-Papier in eine Semidry-Transferapparatur (OWL Scientific) eingelegt und die Proteine unter Anlegen einer konstanten Stromstärke von 400 mA innerhalb von 2 h (mittleres Gel) bzw. 3 h (großes Gel) auf die Membran übertragen. Nach der Übertragung der Proteine auf die Membran wurde diese mit Blockierungspuffer (Waschpuffer mit 2,5 % (w/v) Magermilchpulver) inkubiert. Nach drei kurzen Waschschritten mit dem Waschpuffer erfolgte die Inkubation der Membran mit dem 1. Antikörper (1:5.000 bis 1:20.000 in Waschpuffer) über Nacht. Nach dreimaligem Waschen (2 x 20 min, 1 x 5 min) wurde die Membran mit dem 2. Antikörper (1:10.000 bis 1:20.000 in Waschpuffer) für 2 h bei RT inkubiert. Der 2. Antikörper war mit der Meerrettich-Peroxidase (PO) oder den Fluorochromen Alexa488 oder Alexa633 konjugiert und ist gegen die konstante Region (Fc) des 1. Antikörpers gerichtet. Nach erneutem dreimaligen Waschen (2 x 20 min, 1 x 5 min) mit dem Waschpuffer, erfolgte der Nachweis spezifischer Antikörperbindungen. Dazu wurde das *Western Lightning Chemiluminescence* Reagenz (Perkin-Elmer) nach den Herstellerangaben eingesetzt. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde der Hyperfilm von Amersham verwendet. Bei der Verwendung von Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern erfolgte der Nachweis der spezifischen Antikörperbindung mit Hilfe des Phosphoimagers. Eine Quantifizierung der Proteinbandenstärke erfolgte mit Hilfe des Programmes ImageQuant.

3. Ergebnisse

3.1. Die Inkorporation von Glykoproteinen der Lyssaviren Mokola, *Bat* Hamburg und Lagos *Bat* in G-defiziente RV Partikel

Das Tollwutvirus gehört ebenso wie die Tollwut-verwandten Viren Mokola, *Bat* Hamburg und Lagos *Bat* zur Gattung der Lyssaviren. Beim Vergleich der antigenischen Regionen der Proteine der verschiedenen Lyssaviren mit monoklonalen Antikörpern wurden deutliche Unterschiede gefunden (94). Weitere serologische Untersuchungen, die molekulare Charakterisierung der Lyssaviren und Versuche durch Kreuzreaktionen auch Immunität vor verwandten Lyssaviren zu erzielen, haben gezeigt, dass die Unterschiede zwischen Tollwutvirus und Mokolavirus am größten sind (8, 30, 90, 91, 94). So besteht das Glykoprotein des Mokala Virus zwar auch aus einer Signalpeptidsequenz, einer grossen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne, jedoch gibt es kaum Sequenzhomologien zwischen RV und Mokola G in dem Signalpeptid, der Transmembrandomäne oder der zytoplasmatischen Domäne. Zudem ist das Mokolavirus G nur an zwei Stellen glykosyliert (AS-Position 202 und 319), während RV G drei Glykosylierungsmotive (Asn37, Asn247 und Asn319) aufweist. Jedoch besitzen die Glykoproteine aller Lyssaviren eine ähnliche Proteinstruktur und erlauben den Austausch von Tollwut Glykoprotein gegen z.B. Mokolavirus Glykoprotein (94). Ebenso konnte ein RV G/Mokola G Hybrid aus RV G Ektodomäne und Mokola G Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne in Viruspartikel inkorporiert und infektiöse Partikel erzeugt werden. Zur Untersuchung der Inkorporation der Glykoproteine verschiedener Lyssaviren (Kapitel 1.1.2.) wurden pseudotypisierte Viren erzeugt. Dazu wurde eine RV-Deletionsmutante verwendet, welcher das virale Glykoprotein fehlt (SAD Δ G (93)). Da das Glykoprotein für eine RV-Infektion essentiell ist, können SAD Δ G Viren nur dann Zellen infizieren, wenn während der Virusproduktion das fehlende G Protein durch komplementierende Zelllinien (stabil oder transient exprimiert) zur Verfügung gestellt wird. Mit RV G komplementierte Viren (SAD Δ G(RV G)) sind in der Lage, Zellen zu infizieren und in diesen auch zu replizieren. In Abwesenheit des RV G Proteins kommt es dann zu einer verminderten Freisetzung von *spikeless* Virionen, die kein RV G in ihre Virushülle einbauen konnten. Außerdem kommt es zur Akkumulation von viraler RNA und viralen Proteinen in den Virus-infizierten Zellen. Werden nun Zellen, welche die Glykoproteine der Lyssaviren exprimieren, mit SAD Δ G(RV G) infiziert, können diese Proteine – nach dem Transport an

und der Inkorporation in die Zellmembran- in RV Virionen eingebaut werden (*Envelope-switching*). In Abwesenheit des authentischen RV G Proteins bestimmt dann das inkorporierte Protein den Tropismus der komplementierten Virionen. Für eine möglichst effiziente Expression der verschiedenen Glykoproteine wurde das *β -chicken actin* Promotor-kontrollierte System verwendet.

3.2. Die Spezifität für neuronale Zellen wird durch die inkorporierten Glykoproteine der Lyssaviren vermittelt

Bei Verwendung der *β -chicken actin* Promotor-kontrollierten Expressionsplasmide (pCAGGS-16G, pCAGGS-58G, pCAGGS-BH) (Tab. 4), welche für die verschiedenen Glykoproteine der Lyssaviren vom Stamm Mokola, Lagos *Bat* und *Bat* Hamburg (Kapitel 1.1.2.) kodieren, wurden die verwendeten BSR T7/5 Zellen zunächst mit SAD Δ G(RV G) mit einer MOI von 2 infiziert und 48 h nach Infektion mit FuGene6 (Kapitel 2.6.1.4.) bzw. vier Tage nach Infektion mit der Kalziumphosphat Methode (Kapitel 2.6.1.4.) transfiziert. Als Kontrollen wurden die infizierten BSR T7/5 Zellen mit einem RV SAD G oder RV CVS G Expressionsplasmid (pCAGGS-L16, pCAGGS-CVS G) transfiziert. Bei der Verwendung von FuGene6 erfolgten die beiden Ernten zwei Tage und fünf Tage nach der Transfektion. Bei der Kalziumphosphat Methode erfolgte die erste Ernte drei Tage, die zweite fünf Tage nach der Transfektion. Die Inkorporation der verschiedenen Glykoproteine der Lyssaviren in die Hülle der RV-Virionen wurde kontrolliert, indem die erzeugten Viren auf unterschiedlichen Zelllinien titriert wurden. Es zeigte sich, dass alle verwendeten Glykoproteine der Lyssaviren in die Hülle der RV-Virionen inkorporiert wurden. Die infektiösen Titer der erzeugten pseudotypisierten Virionen lagen zwischen $1,0 \times 10^3$ und $1,8 \times 10^7$ Fokus-bildender Einheit (*focus forming unit*) (ffu) pro ml auf BSR T7/5 Zellen (Tab. 8). Um den Tropismus der erzeugten, pseudotypisierten Virionen, zu überprüfen, wurden verschiedene Zelllinien mit den Tollwutviren und den Pseudotypviren infiziert (Tab. 8). Neben den Hamster BSR T7/5 Zellen, wurden neuronale Zelllinien der Maus (NA und NS20Y) und eine Affennieren-Zelllinie (Vero) verwendet (Kapitel 2.5.4., Tab. 7). Pseudotypviren mit dem RV G Protein des Stammes SAD konnten alle getesteten Zellen mit nahezu gleicher Effizienz (erreichte Titer lagen bei $1,8$ bis $9,0 \times 10^7$ ffu/ml) infizieren (Tab. 8). Sie zeigten also keine Präferenz für neuronale Zellen. Bei Verwendung des CVS G reduzierte sich der Titer in den nicht-neuronalen Zelllinien um 1,5 (BSR T7/5) bzw. 2,0 (andere Zellen) Logstufen, während die Differenz in den neuronalen Zelllinien jeweils nur ca. 1,0 Logstufe betrug (Tab. 8), was bedeutet, dass mit CVS G pseudotypisierte Viren eine relativ höhere Präferenz für neuronale

Ergebnisse

Zellen aufweisen. Bei Betrachtung der mit den Glykoproteinen der Lyssaviren Mokola und *Bat* Hamburg pseudotypisierten Viruspartikel zeigte sich eine Reduktion der infektiösen Titer um 2,0 (Mokola) und ca. 3,0 (*Bat* Hamburg) Logstufen in den BSR T7/5 Zellen und eine Abnahme in der Infektiösität um 1,0 (Mokola) und 2,0 (*Bat* Hamburg) Logstufen in den Vero Zellen (Tab. 8). Die Differenz in der Infektiösität der beiden pseudotypisierten Viren im Vergleich zu den Viren mit SAD G betrug in der neuronalen Zelllinie NS20Y jedoch nur 0,5 (Mokola) und 1,0 (*Bat* Hamburg) und bei den neuronalen NA Zellen 1,0 (Mokola) und 1,5 (*Bat* Hamburg) Logstufen (Tab. 8). Der infektiöse Titer der mit Lagos *Bat* G komplementierten Viren war dagegen auf allen Zellen sehr gering. Der höchste Titer wurde auf NA Zellen festgestellt ($2,2 \times 10^4$) (Tab. 8). Die infektiösen Titer der mit den Glykoproteinen von CVS, Mokola und *Bat* Hamburg pseudotypisierten Viren erhöhte sich im Vergleich zu den BSR T7/5 Zellen in den NS20Y Zellen um 1,5 (CVS), 1,0 (Mokola) und 2,0 (*Bat* Hamburg) und in den NA-Zellen um ca. 2,0 Logstufen (Tab. 8). Es kann also *in vitro* ein Neurotropismus für CVS, Mokola und *Bat* Hamburg nachgewiesen werden. Viren mit SAD G können *in vitro* ein breites Spektrum an unterschiedlichen Zelltypen mit nahezu gleicher Effizienz infizieren. Mit CVS G pseudotypisierte Viren hingegen weisen *in vitro* eine hohe Spezifität für neuronale Zelllinien auf (Tab. 8). Daher eignen sich mit CVS G pseudotypisierte Viren am besten, um auch frisch isolierte, embryonale Zellen zu infizieren. Diese Zellen wurden auch als neuronale *Tracer* zur Untersuchung von neuronalen Netzwerken verwendet (Kapitel 3.3., Abb. 3).

Virus	Titer BSR T7/5	Titer Vero	Titer NA	Titer NS20Y
SAD ΔG eGFP(SAD G)	$1,8 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$
SAD ΔG eGFP(CVS G)	$4,5 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$
SAD ΔG eGFP(Mokola G)	$1,7 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$
SAD ΔG eGFP(<i>Bat</i> Hamburg G)	$3,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
SAD ΔG eGFP(Lagos <i>Bat</i> G)	$1,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$

Tab. 8: Inkorporation der Lyssaviren Glykoproteine erzeugte eine hohe neuronale Spezifität

Das G-defiziente RV SAD ΔG wurde zur Infektion von BSR T7/5 Zellen verwendet. Zwei bis vier Tage nach Infektion wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden transfiziert, welche die entsprechenden Glykoproteine der Lyssaviren exprimieren. Die Bestimmung der neuronalen Spezifität der erzeugten Viren, welche die verschiedenen Glykoproteine der Lyssaviren oder der Tollwutvirusstämme SAD oder CVS in die Virushülle inkorporiert haben, erfolgte durch Titration der Virusüberstände auf den verschiedenen Zelllinien. Im Vergleich zu BSR T7/5 Zellen wurde eine Erhöhung der Titer um 2,0 Logstufen (bei Mokola und *Bat* Hamburg) bzw. 1,0 Logstufe (Lagos *Bat*) in den neuronalen NA Zellen erreicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inkorporation der Glykoproteine von Mokola und *Bat* Hamburg zu einer Erhöhung der Titer um eine Logstufe auf den Vero Zellen führte.

3.3. Die Inkorporation des EnvA-Fusionsproteins (EnvARGCD) in G-defiziente RV Partikel ermöglicht eine hohe Zelltypspezifität

Durch den neurotrophen Charakter der Tollwutviren, welcher sich in einer effizienten Expression von Virusproteinen in Neuronen und einem sehr schwach ausgeprägten zytopathischen Effekt der Tollwutvirus-infizierten Zellen zeigt, eignen sich Tollwutviren sehr gut als neuronale Marker, um die Funktionen und die Morphologie von Neuronen zu analysieren (37, 38, 79). Bislang wurde zur Identifizierung von Neuronen, die monosynaptisch mit einer Zellgruppe oder einer einzelnen Zelle verknüpft sind, sogenannte konventionelle oder auch virale *Tracer* (11, 26, 84, 169) verwendet. Diese konnten bisher jedoch nicht zwischen starken, indirekten und sehr schwachen, direkten Verknüpfungen unterscheiden. Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften der Tollwutviren eignen sich diese besonders gut als *Tracer* zur Analyse des synaptischen Mechanismus. Um einen Tropismus der Tollwutviren zu erzeugen, der es ermöglicht gezielt bestimmte neuronale Zellen zu infizieren, wurde das EnvA-Oberflächenprotein/TVA-Rezeptor System verwendet. Durch die Inkorporation des Glykoproteins EnvA des Vogelvirus ASLV in die Tollwutvirushülle ändert sich der Zelltropismus. Die generierten Viren können nun Zellen infizieren, welche den Rezeptor TVA des Vogelvirus exprimieren, jedoch keine normalen Säugetierzellen mehr. Um eine Inkorporation des EnvA Proteins in die Tollwutvirushülle zu ermöglichen, wurde das Protein (EnvA) an die zytoplasmatische Domäne (CD) des Tollwutvirus Glykoproteins (RG) fusioniert (EnvARGCD) (159). Zur Herstellung von rekombinanten Tollwutviren mit dem EnvARGCD-Fusionsprotein in der Virushülle wurden BHK-EnvARGCD Zellen (159), welche das EnvARGCD-Fusionsprotein stabil und konstitutiv exprimieren, mit G-defizienten, eGFP exprimierenden Viren infiziert (MOI=0,1). Neben den eGFP-exprimierenden Viren wurden G-defiziente Tollwutviren hergestellt und mit gleicher MOI verwendet, welche das fluoreszierende Protein mCherry exprimierten (SAD ΔG mCherry) (Tab. 6). Dazu wurde aus der Gesamtklon cDNA pSAD L16 (Tab. 4) der RV G ORF deletiert und der ORF des mCherry hinter die N/P Gengrenze an die Genomposition des RV G inseriert (S. Finke, unveröffentlicht). Zwei und vier Tage nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand geerntet und die Viruspartikel durch Zentrifugation von den Zellbestandteilen getrennt. Zur Überprüfung der Inkorporationseffizienz wurden die Viren anschließend auf BSR T7/5 Zellen (Negativkontrolle) und auf 293T TVA800 Zellen titriert, welche den EnvA Rezeptor TVA800 konstitutiv exprimieren (104). Die erreichten Titer von 1,0 bis $3,6 \times 10^6$ ffu/ml entsprechen den Titern, die auch bei der Inkorporation von RV G Proteinen in die Virushülle G-defizienter Viren erzeugt werden (Tab. 8). Es konnte also

Ergebnisse

gezeigt werden, dass eine gute Inkorporation des EnvARGCD-Fusionsproteins stattfindet und das während des Infektionsvorganges weder die Virusbindung an die Zellmembran noch die Membranfusion durch die Inkorporation des EnvARGCD Fusionsproteins negativ beeinflusst wird. In einem ersten Versuch wurden embryonale Mausneuronen (E14) mit einem Expressionsplasmid transfiziert (B. Berninger und M. Götz, unveröffentlicht), welches den EnvA Rezeptor TVA800 exprimiert, und anschließend mit CVS G oder EnvARGCD pseudotypisierten SAD ΔG eGFP Viren infiziert (MOI=0,1 bis 3,0). 24 h nach Infektion wurden die Virus-infizierten Zellen im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 3). Die Pseudotypviren mit inkorporierten EnvARGCD infizierten fast ausschließlich die Zellen, welche auch den TVA800 Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Es wurden jedoch auch sehr vereinzelt Zellen infiziert, welche TVA800 nicht auf der Oberfläche exprimieren. Wahrscheinlich waren noch einige wenige Virionen vorhanden gewesen, die noch das zur Infektion der komplementierenden Zelllinie benötigte RV G besitzen (*Inputviren*). Diese können noch unterschiedliche, neuronalen Zellen infizieren, wie an den Ansätzen der SASD G (Tab. 9) oder CVS G (Abb. 3) komplementierten SAD ΔG eGFP Virionen nachgewiesen werden konnte (Tab. 9, Abb. 3). Diese Viren infizierten sowohl Zellen, welche TVA 800 exprimieren, als auch Zellen ohne TVA800 auf der Zelloberfläche. Zur Vermeidung von Restinfektiösität durch die Inputviren wurde die erste Ernte der nachfolgenden Virusproduktionen nicht verwendet. Weitere Alternativen wären eine Infektion der Zellen in Suspension mit anschließendem Austausch des Zellmediums oder ein weiterer Waschschrift vor der ersten Ernte. Durch die Verwendung EnvARGCD pseudotypisierter Tollwutviren konnte eine sehr hohe Spezifität der Virusinfektion erzielt werden, da der Rezeptor des EnvA Proteins TVA800 ausschließlich von Vogelzellen exprimiert wird und daher auf natürlichen, neuronalen Säugetierzellen nicht vorhanden ist.

Virus	Ernte	293T TVA800 Zellen	BSR T7/5 Zellen
SAD ΔG eGFP(RV G)	2	$4,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$
SAD ΔG eGFP(EnvARGCD)	1	$7,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$
SAD ΔG eGFP(EnvARGCD)	2	$2,4 \times 10^6$	$5,5 \times 10^1$
SAD ΔG mCherry(EnvARGCD)	1	$5,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$
SAD ΔG mCherry(EnvARGCD)	2	$1,0 \times 10^6$	n.d.

Tab. 9: Infektiöse Titer der G-defizienten, mit EnvARGCD pseudotypisierten Viren

EnvARGCD konstitutiv exprimierende BHK Zellen wurden mit SAD ΔG eGFP oder SAD ΔG mCherry infiziert. Zwei und vier Tage nach Infektion wurden die Pseudotypviren durch Zentrifugation von den Zellbestandteilen getrennt und die Inkorporation von EnvARGCD anhand der Titration der Virusüberstände auf BSR T7/5 Zellen (Negativkontrolle) und 293T TVA800 Zellen überprüft. EnvARGCD wurde in die Virushülle integriert, wobei die erreichten Titer den Titern von RV G komplementierten SAD ΔG Viren entsprachen.

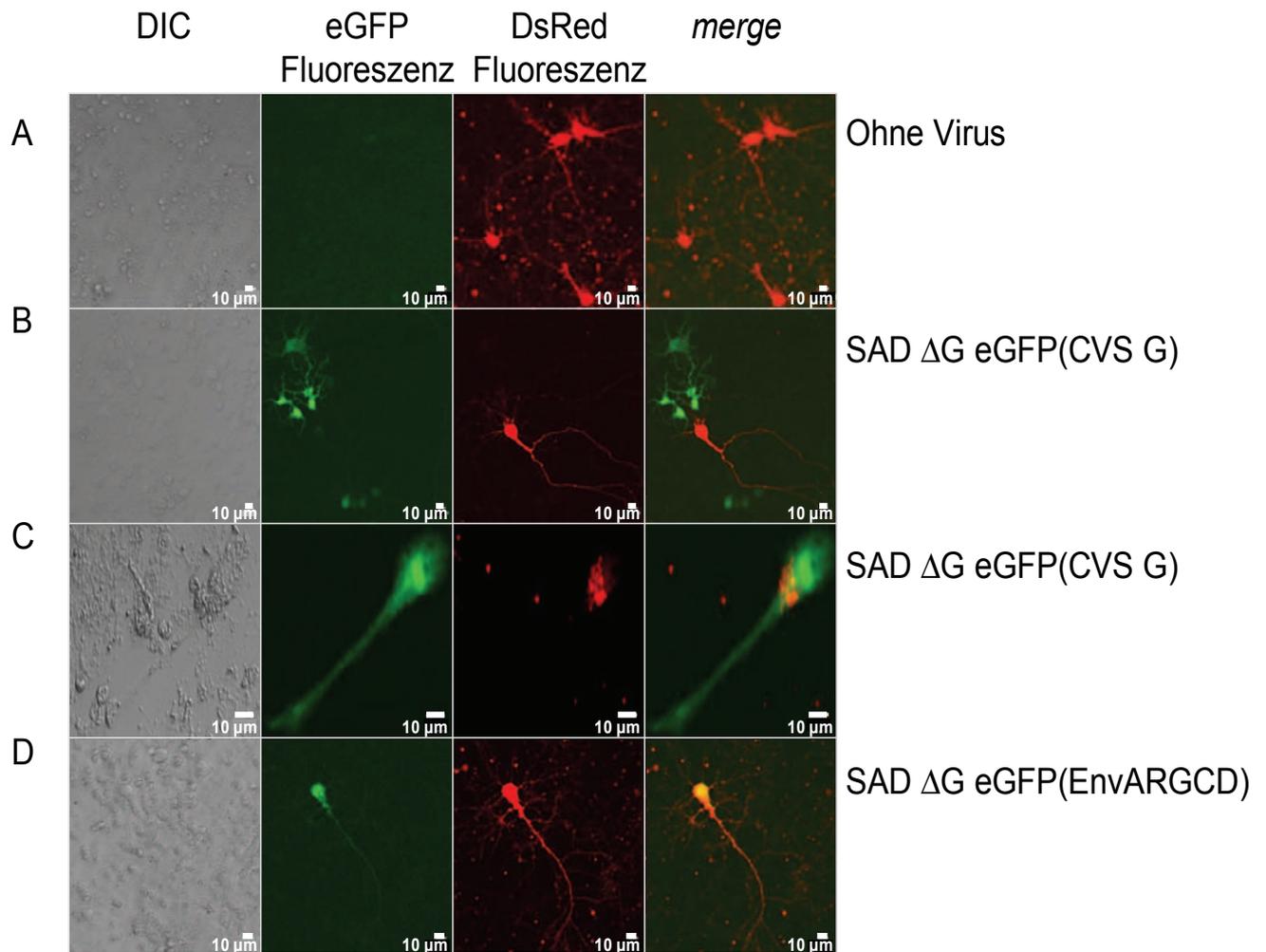


Abb. 3: Herstellung und Verwendung der EnvARGCD pseudotypisierten SAD ΔG Virionen

Nach Cotransfektion der TVA800- und DsRed exprimierenden Plasmide in die embryonalen Mausneuronen (E14) (B. Berninger und M. Götz, unveröffentlicht) wurden diese mit CVS G oder EnvARGCD pseudotypisierten SAD ΔG eGFP Viren infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Virus-infizierten Zellen im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert. Die gespeicherten Bilder jedes Kanals (grün: für die Detektion des eGFP, rot: Detektion des tm-RFP und grau: DIC) wurden mit dem Programm ImageJ geöffnet und in allen Kanälen wurde der Hintergrund minimiert; hierbei wurden der rote und der grüne Kanal in etwa gleich behandelt. Danach wurden die Bilder wieder zu einem einzigen Bild zusammengefügt (Ausführliche Beschreibung siehe Kapitel 2.6.3.2.). (A) Nicht-infizierte, TVA800- und DsRed-exprimierende Zellen (rot). (B) SAD ΔG eGFP(CVS G) infizierte Zellen, welche TVA800 nicht exprimieren (grün). (C) Infektion von TVA800 exprimierenden Zellen mit SAD ΔG eGFP(CVS G) (rot + grün). (D) Infektion durch SAD ΔG eGFP(EnvARGCD) wurde fast ausschließlich in TVA800 exprimierenden Zellen detektiert. Der Skalierungsbalken präsentiert 10 μm.

3.4. Die Herstellung des RFP-Fusionsproteins als synthetisches Typ I Transmembranprotein

Die Expression des eGFP Proteins vom Virusgenom des SAD Δ G eGFP Virus erlaubt schon die direkte Visualisierung Virus-infizierter, lebender Zellen und neuronaler Netzwerke mittels der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie. Um jedoch auch den retrograden Transport von Viruspartikeln in lebenden Neuronen verfolgen zu können, ist eine Anfärbung des RNPs oder der Virushülle nötig. Fluoreszierende Tollwutvirus RNPs wurden schon durch die Fusion von eGFP an das RV Phosphoprotein (eGFP-P) im Virus SAD eGFP-P (39) erzeugt. Zur Klärung der Frage, ob umhüllte Viruspartikel oder nur die RNPs transportiert werden, sind jedoch auch Viren mit einer fluoreszierenden Virushülle nötig. Die Herstellung einer fluoreszierenden Virushülle erwies sich als kompliziert, da es keine fluoreszierenden Typ I Transmembranproteine gibt. Ein Fusionsprotein aus einem fluoreszierenden Marker und dem gesamten RV Glykoprotein wie es für VSV hergestellt und in *Live cell imaging* Experimenten bereits verwendet worden ist (80, 113, 129), konnte für das Tollwutvirus nicht konstruiert werden (S. Finke, unveröffentlicht). Zur Visualisierung der Virushülle wurde deshalb ein Fusionsprotein aus einem fluoreszierenden Protein und einem möglichst kurzen C-terminalen Bereich des RV G Proteins hergestellt (74). Um auch doppelt markierte Viren herstellen zu können, wurde nicht eGFP, sondern das rot-fluoreszierende DsRed Protein ausgewählt. Es wurde die Variante tdtomato (136) verwendet, da sie eine bessere Stabilität bei niedrigem pH-Wert aufweist als eGFP und keine intermolekularen Aggregationen wie bei DsRed zu beobachten sind (136). Um das lösliche tdtomato Protein in ein Typ I Transmembranprotein zu verändern, wurde ein Fusionsprotein aus der Sequenz des tdtomato und Sequenzabschnitten des RV G Proteins hergestellt. Um die Inkorporation des tdtomato zu ermöglichen, wurden Konstrukte hergestellt, in denen die Sequenzen für einen kurzen Abschnitt der Ektodomäne (AS 410 bis 458), der Transmembran (AS 459 bis 480)- und der zytoplasmatischen-Domäne (AS 481 bis 524) des RV G Proteins (17) („G-tm-Anker“) an den C-Terminus von tdtomato fusioniert sind. Zusätzlich wurde die N-terminale Signalsequenz des RV G für die Sekretion in das ER anfusioniert (tm-RFP) (Kapitel 2.2. und Abb. 4) (74). Um einen möglichst effizienten Transport an die Zelloberfläche zu erreichen, wo *Virusbudding* stattfindet, wurden zusätzlich Konstrukte mit N-Glykosylierungsmotiven kloniert. Bei dem Fusionsprotein tm-RFP(Asn) wurde eine synthetische N-Glykosylierungsstelle (NGT) am N-Terminus der tdtomato Region eingefügt (Kapitel 2.2. und Abb. 4) (74). Ein weiteres Fusionsprotein (tm-RFP(Asn319)) zur Verbesserung des Oberflächentransportes wurde konstruiert, indem die Aminosäuresequenz der Membran-

proximalen Region des RV G Proteins um 75 AS verlängert wurde, um eine der drei authentischen N-Glykosylierungsstellen (Asn319) des RV G Proteins zu integrieren (Kapitel 2.2. und Abb. 4) (74). Alle Fusionsproteinsequenzen wurden hinter den CMV-Promotor in das Expressionsplasmid pCR3 eingefügt. Die entstandenen Expressionsplasmide pCR3 tm-RFP, pCR3 tm-RFP(Asn) und pCR3 tm-RFP(Asn319) wurden in Kapitel 2.4.2. ausführlich beschrieben (74). Der CMV-Promotor erlaubte anschließend die Expression der Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen.

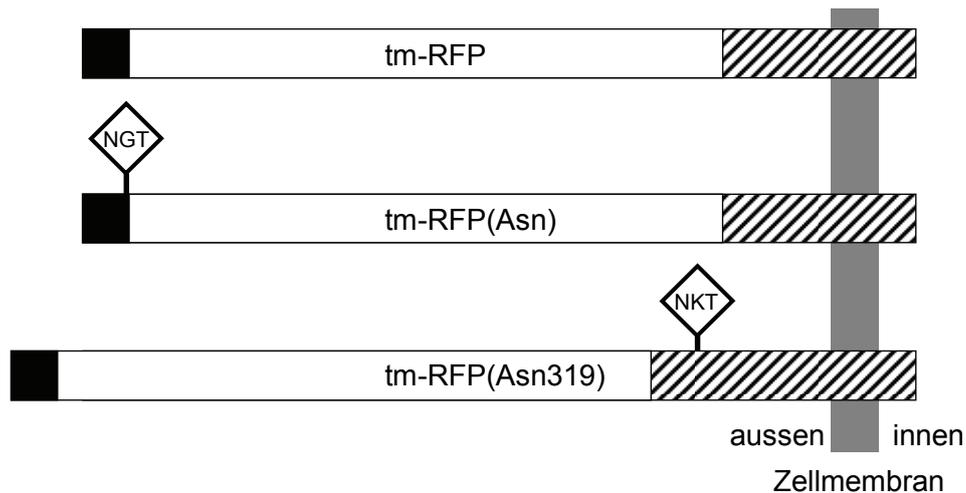


Abb. 4: Schematische Darstellung der chimären RFP/RV G Konstrukte

Um eine Expression des löslichen RFP Derivates tdtomato (136) auf der Zelloberfläche und eine Inkorporation in die Viruspartikel zu ermöglichen, wurde das Protein N-terminal an das RV G Signalpeptid (schwarzer Kasten) und C-terminal an den C-terminalen Bereich von RV G, welcher die intrazelluläre Zytoplasmadomäne, die hydrophobe Transmembrandomäne (tm) und den Membran-proximal gelegenen Teil der RV G Ektodomäne umfasst (schattierter Kasten), anfusioniert (Kapitel 2.2.). Das Signalpeptid ist hier zwar schematisch noch im Konstrukt vorhanden, wird jedoch vor Inkorporation des Proteins in die Zellmembran abgespalten. Vorhandene Glykosylierungsstellen sind als Karos mit den entsprechenden Glykosylierungsmotiven dargestellt. tm-RFP: keine Glykosylierungsstelle vorhanden, tm-RFP(Asn): besitzt eine synthetische Glykosylierungsstelle (NGT) zwischen dem RV G Signalpeptid und tdtomato, tm-RFP(Asn319): umfasst die RV Ektodomäne bis AS 316 und besitzt eine authentische Glykosylierungsstelle (NKT) bei AS Position 319 (Asn319).

3.4.1. Die Überprüfung der Glykosylierungsstellen in tm-RFP(Asn) und tm-RFP(Asn319)

Um den Einbau von Fremdproteinen in die Virushülle von RV Partikeln zu ermöglichen, müssen die Fremdproteine möglichst effizient an die Zelloberfläche transportiert werden, wo das *Virusbudding* stattfindet. Dazu wurden zwei tm-RFP Konstrukte mit N-Glykosylierungsstellen kloniert (Kapitel 2.4.2. und Kapitel 3.4., Abb. 4). Die verschiedenen tm-RFP Varianten wurden in das Genom vom Tollwutvirus integriert (Kapitel 3.6.1., Abb. 10) und BSR T7/5 Zellen mit den unterschiedlichen Viren und dem *wt* SAD L16 mit einer MOI von 1 infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und mit PNGaseF verdaut (Kapitel 2.6.8.1.). Dadurch wird die Verbindung zwischen Asparagin und N-Acetylglukosamin direkt an der AS getrennt, wobei die Spaltungsreaktion unabhängig von dem Aufbau der Zuckerkette erfolgt. Anschließend wurden die Proteinbanden der tm-RFP Varianten ohne und mit PNGaseF-Behandlung im Western Blot verglichen und dafür der DsRed-spezifische Antikörper (α DsRed) und der Antikörper, welcher die zytoplasmatische Domäne des RV G erkennt (α RV Gtail), verwendet. Bei den beiden Varianten mit Glykosylierungsmotiv tm-RFP(Asn) und tm-RFP(Asn319) sieht man bei Vergleich der Ansätze ohne und mit PNGaseF einen schönen *Shift* der Banden, was auf die Deglykosylierung durch die PNGaseF zurückzuführen ist (Abb. 5). Diesen *Shift* sieht man bei tm-RFP nicht, da diese Variante keine Glykosylierungsstelle aufweist. Bei Verwendung des α -RV Gtail Antikörpers sieht man einen entsprechenden *Shift* nicht nur der tm-RFP Banden, sondern auch der RV G Proteinbanden, da ja RV G selbst auch drei Glykosylierungsmotive aufweist. Dieses Deglykosylierungsexperiment zeigt, dass beide Konstrukte tm-RFP(Asn) und tm-RFP(Asn319) die gewünschten Glykosylierungsstellen aufweisen und tm-RFP kein Glykosylierungsmotiv besitzt.

Ergebnisse

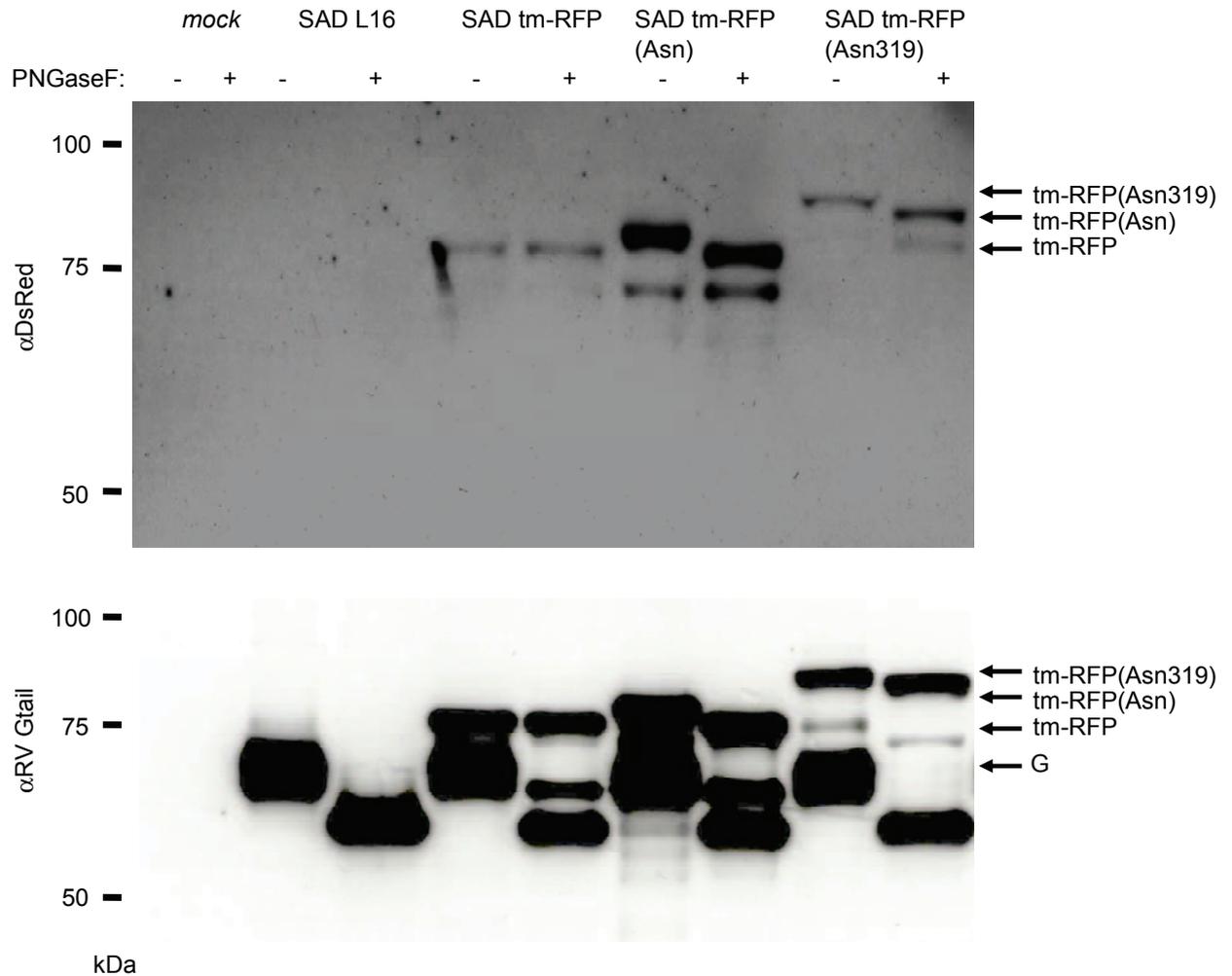


Abb. 5: Überprüfung der Glykosylierungsstellen von tm-RFP(Asn) und tm-RFP(Asn319)

BSR T7/5 Zellen wurden mit Tollwutviren, welche die tm-RFP Varianten tm-RFP, tm-RFP(Asn) oder tm-RFP(Asn319) exprimieren (Kapitel 3.6.1., Abb. 10), und mit *wt* SAD L16 mit einer MOI von 1 infiziert und die Zellen 48 h nach Infektion lysiert. Jeweils die Hälfte eines jeden Zelllysates wurde mit PNGaseF verdaut (Kapitel 2.6.8.1.); der Rest blieb unbehandelt. Nach der Deglykosylierungsreaktion durch die PNGaseF wurden die Proteinbanden der tm-RFP Varianten ohne und mit PNGaseF-Behandlung im Western Blot mit dem α DsRed Antikörper und dem α RV Gtail Antikörper analysiert.

3.5. Die Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der RFP-Fusionsproteine

Die Voraussetzung für den Einbau von Fremdproteinen in die Hülle von RV Partikeln ist die Anwesenheit mindestens der zytoplasmatischen Domäne des RV Glykoproteins, der Transport an und die Inkorporation dieser Proteine in die Zellmembran.

3.5.1. Die Oberflächenexpression der RFP-Fusionsproteine

Um die Lokalisation der verschiedenen Varianten des RFP-Fusionsproteins zu bestimmen, wurden BSR T7/5 Zellen und die Neuroblastoma Zelllinie NA mit den verschiedenen tm-RFP Expressionsplasmiden (pCR3 tm-RFP, pCR3 tm-RFP(Asn) und pCR3 tm-RFP(Asn319)) (Kapitel 2.4.2. und Tab. 4) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert. In beiden Zelltypen wurde eine gute Expression mit innerzellulärer Lokalisation der tm-RFP Varianten beobachtet (Abb. 6). Neben der intrazellulären Lokalisation konnte eine gute Oberflächenexpression des unglykosylierten tm-RFPs und von tm-RFP(Asn) mit einer synthetischen N-Glykosylierungsstelle (Kapitel 3.4., Abb. 4 und Kapitel 3.4.1. Abb. 5) beobachtet werden. Dabei wurde in beiden Zelllinien das nicht-glykosylierte tm-RFP am besten an die Oberfläche transportiert (74). Interessanterweise wurde das Konstrukt tm-RFP(Asn319) mit der natürlichen N-Glykosylierungsstelle Asn319 zwar gut in beiden Zelltypen exprimiert, jedoch nicht an die Zelloberfläche transportiert (74).

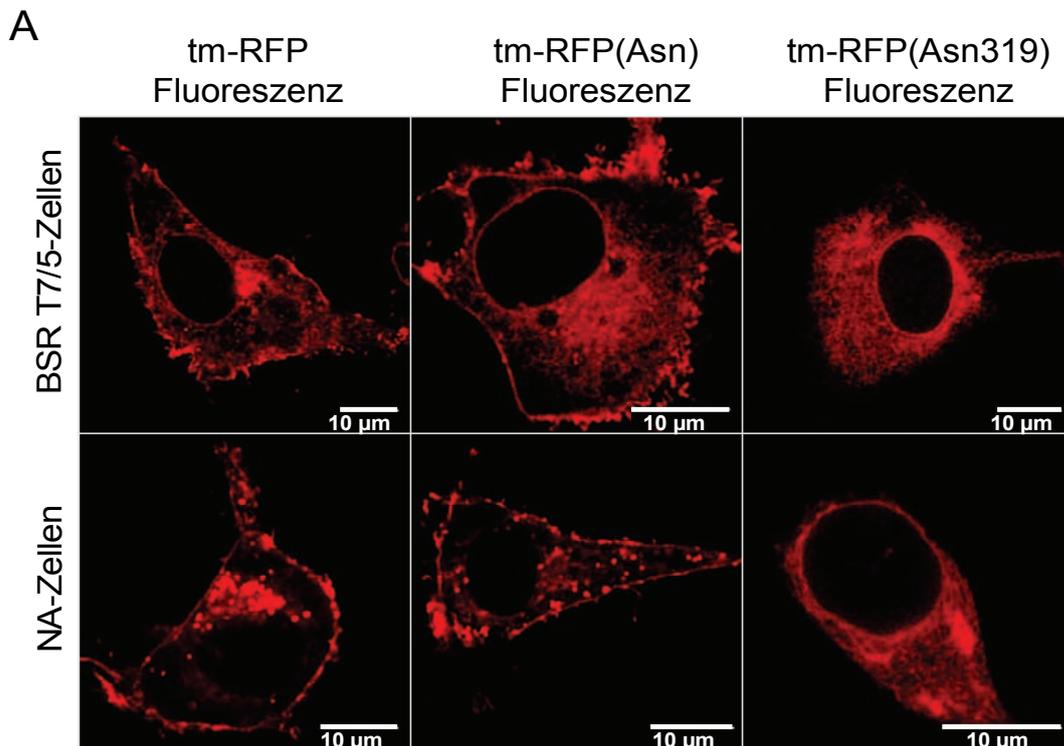


Abb. 6: Oberflächenexpression der chimären RFP/RV G Proteine

Die Expressionsplasmide, welche die in Abb. 4 beschriebenen RFP-Konstrukte unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, wurden in BSR T7/5 Zellen und in die Neuroblastoma Zelllinie NA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert und die RFP-Eigenfluoreszenz im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert (Beschreibung: Kapitel 3.6.3.1. und 3.6.3.2.). Skalierungsbalken: 10 μ m.

3.5.2. Die Herstellung und Analyse von tm-RFP exprimierenden Zelllinien

Um die Inkorporation von tm-RFP als Transmembran-verankertes Oberflächenprotein in die Virushülle von Virionen in Abwesenheit des authentischen RV G Proteins untersuchen zu können, sollten G-defiziente, mit tm-RFP pseudotypisierte Viren, erzeugt werden. Die Komplementierung der Viren muss hierbei *in trans* entweder von einem Expressionsplasmid aus erfolgen oder wird von Zellen, welche das Protein stabil exprimieren, zur Verfügung gestellt. Um die Komplementierung zu erleichtern, wurden Zellen hergestellt, die tm-RFP stabil vom Genom aus exprimieren. Es wurde die unglykosylierte Proteinvariante tm-RFP und als Ausgangszelllinie die Hamsterzelllinie BSR T7/5 ausgewählt, da bei dieser Kombination eine gute tm-RFP Expression sowie guter Oberflächentransport zu beobachten war (Abb. 6). Neben den BSR T7/5 Zellen wurde noch die Neuroblastoma Zelllinie (NA) ausgewählt, um tm-RFP- Expression und Oberflächentransport in den beiden Zelllinien vergleichen zu können. Zur Integration des tm-RFP ORF unter der Kontrolle des CMV- Promotors in das Wirtsgenom wurden je 5 µg der Plasmide pCR3 tm-RFP und pTRE2Hyg (bei den BSR T7/5 Zellen) bzw. nur je 5 µg pCR3 tm-RFP (NA Zellen) mit Hilfe der Kalziumphosphat-Transfektionsmethode transfiziert. Hygromycin wurde zur Selektion der BSR T7/5 tm-RFP Zellen und G418 als Selektionsantibiotika für die NA tm-RFP Zellen verwendet. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in 96-Loch Platten mit 1 bis 2 Zellen pro Loch ausgesät. Nach 10 Tagen Kultivierung mit den entsprechenden Selektionsantibiotika exprimierten die ersten Zellen das rekombinante Protein RFP/RV G stabil vom Genom und erschienen daher aufgrund der tm-RFP Autofluoreszenz im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop rot (nicht gezeigt). Es erfolgte die Analyse der stabilen Zellklone im Western Blot mit den Antikörpern α DsRed und α RV Gtail. Die Analyse des Western Blots ergab grosse Unterschiede in der tm-RFP Expression der unterschiedlichen BSR T7/5 tm-RFP- und NA tm-RFP-Klone. Neben stabilen Zellklonen, welche tm-RFP sehr gut exprimierten wie BSR T7/5 tm-RFP Klon 79 und NA tm-RFP Klon 67, wurden auch Zellklone gefunden, die kein tm-RFP (z.B. NA tm-RFP Klon 163) oder nur sehr geringe Mengen an tm-RFP exprimierten (Abb. 7A). Beim Vergleich von BSR T7/5 tm-RFP Klon 79 und NA tm-RFP Klon 67 wurden im Western Blot in etwa gleiche Mengen an tm-RFP Protein detektiert. In der Immunfluoreszenz einzelner Zellen konnte jedoch festgestellt werden, dass im Gegensatz zu den NA Zellen in den BSR T7/5 Zellen weniger tm-RFP an der Zellmembran und mehr im Zytoplasma detektierbar war und ein Rücktransport von tm-RFP von der Zellmembran zurück ins Zytoplasma erfolgte. In den NA Zellen hingegen wurde hauptsächlich Transport innerhalb des Zytoplasmas detektiert (siehe Pfeile in Abb. 7B).

Ergebnisse

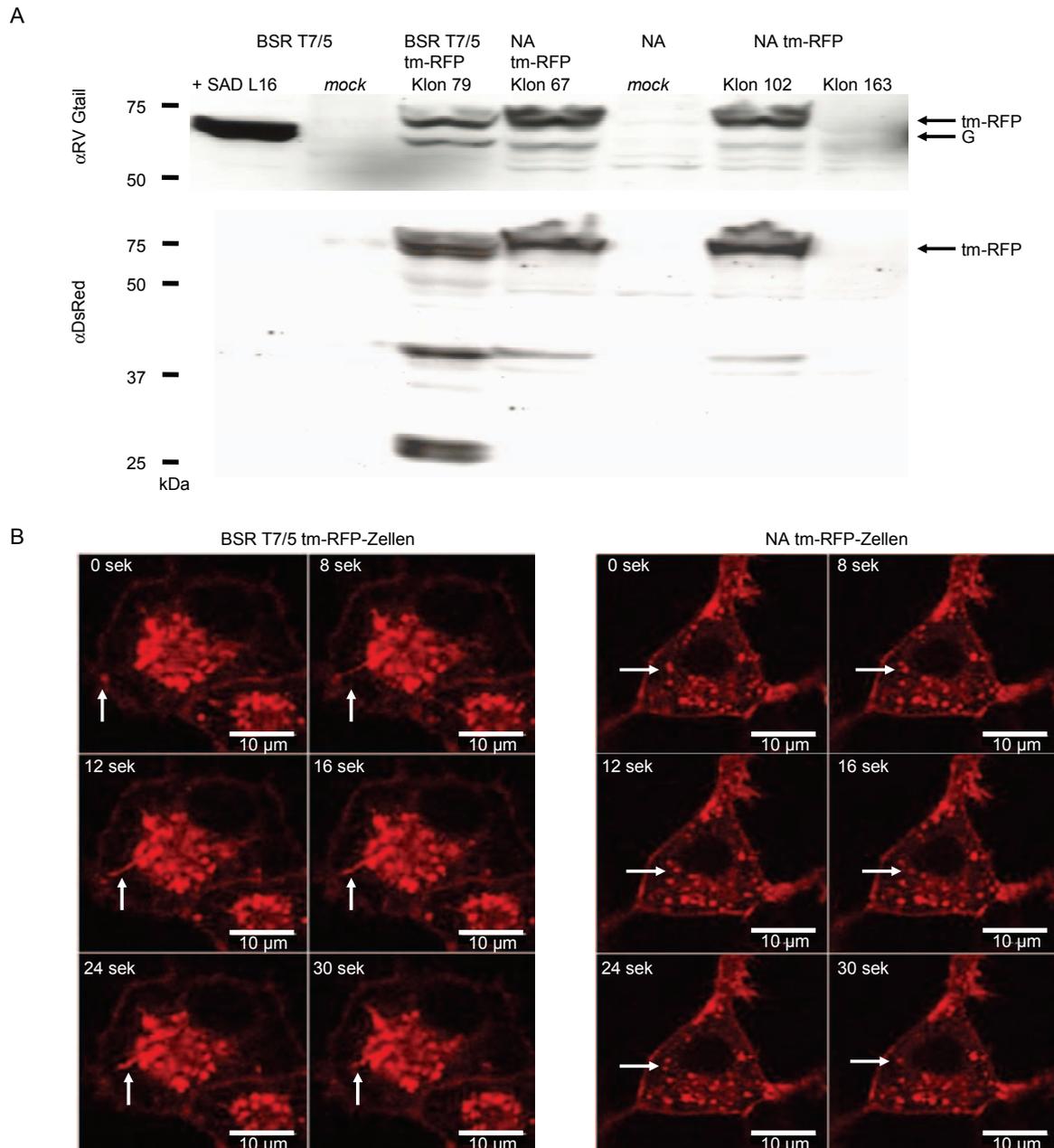


Abb. 7: tm-RFP Expression und Transport in den stabilen Zelllinien BSR T7/5 tm-RFP und NA tm-RFP

Je 5 μg des tm-RFP kodierenden Expressionsplasmid pCR3 tm-RFP und je 5 μg pTRE2Hyg (bei BSR T7/5) bzw. nur 5 μg pCR3 tm-RFP (NA Zellen) wurden in die entsprechende Zelllinie transfiziert und fünf Stunden nach Transfektion in 96-Loch-Platten (1 bis 2 Zellen/Loch) ausgesät. Zur Selektion stabiler BSR T7/5 tm-RFP Klone wurde Hygromycin, bei den transfizierten NA Zellen G418 verwendet. Nach etwa 10 Tagen Antibiotikaselektion konnten die ersten tm-RFP exprimierenden Zellen im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop anhand der tm-RFP Autofluoreszenz detektiert werden. (A) Die tm-RFP Expression verschiedener BSR T7/5 tm-RFP und NA tm-RFP Zellklone konnte im Western Blot mit den Antikörpern αDsRed und $\alpha\text{RV Gtail}$ nachgewiesen werden. (B) Mit Hilfe der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie erfolgte eine weitere Analyse einzelner BSR T7/5 tm-RFP und NA tm-RFP Zellen (Kapitel 3.6.3.1. und 3.6.3.2). Der Skalierungsbalken repräsentiert 10 μm .

3.5.3. Die Kolokalisation von tm-RFP mit RV G und RV M

Die Inkorporation von Proteinen in die Virushülle setzt eine Expression der Proteine an der Region der Zellmembran voraus, an der die Virionen-Bildung (*Assembly*) und – Ausschleusung (*Budding*) erfolgt. Zur Untersuchung der Frage, ob tm-RFP und RV G zu gleichen Regionen der Zellmembran transportiert werden, wurde die Kolokalisation von tm-RFP und RV G nach Koexpression mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die tm-RFP Expressionsplasmide (tm-RFP, tm-RFP(Asn) und tm-RFP(Asn319)) wurden zusammen mit dem RV G Expressionsplasmid (pTIT-G) in BSR T7/5 Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurden auch die oben genannten Expressionsplasmide einzeln transfiziert. Zur Bestimmung der Lokalisation von RV G wurden die transfizierten Zellen mit dem monoklonalen Antikörper E559, der einen Teil von RV G erkennt, welcher in tm-RFP nicht vorhanden ist, mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Die Lokalisation der exprimierten RFP-Fusionsproteine wurde direkt anhand der RFP-Eigenfluoreszenz bestimmt. RV G zeigte in der Immunfluoreszenz eine leichte perinukleare und granuläre Färbung, und eine starke Anfärbung der Zellmembran, die anzeigt, dass der Großteil der Proteine an der Zellmembran akkumuliert (Abb. 8A). Perinukleare und granuläre Färbung weisen auf die Synthese des Proteins im ER und den Transport des Proteins in Vesikeln an die Zellmembran hin. Bei den Zellen, welche mit RV G und tm-RFP (Abb. 8B, C) oder mit tm-RFP(Asn) (nicht gezeigt) transfiziert wurden, konnte Kolokalisation der beiden Proteine an der Zytoplasmamembran und auch im Zytoplasma der transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 8C) (74). Keine Kolokalisation konnte hingegen mit dem Konstrukt tm-RFP(Asn319) gezeigt werden, welches nicht an die Zelloberfläche transportiert wird (nicht gezeigt). Keine G-Färbung konnte in Zellen nachgewiesen werden, die nur mit tm-RFP transfiziert wurden (Abb. 8B). Dieses Ergebnis zeigt, dass weder eine Kreuz-Reaktion vorkommt, noch die Expression von RV G alleine zu einer roten Fluoreszenz führt. Da das RV M Protein eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung der RNPs und dem RV G Protein an die Region der Zellmembran, an der *Virusbudding* stattfindet, spielt, wurde auch die Kolokalisation von RV M und tm-RFP in transfizierten BSR T7/5 Zellen untersucht. Eine Kolokalisation von RV M und tm-RFP konnte nur an der Zellmembran beobachtet werden (Abb. 8E) und war vergleichbar mit der Kolokalisation von RV M und RV G (nicht gezeigt) (74). Bei diesem Ansatz konnte in Abwesenheit von RFP ebenfalls keine Antikörper Kreuz-Reaktion oder rote Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 8D).

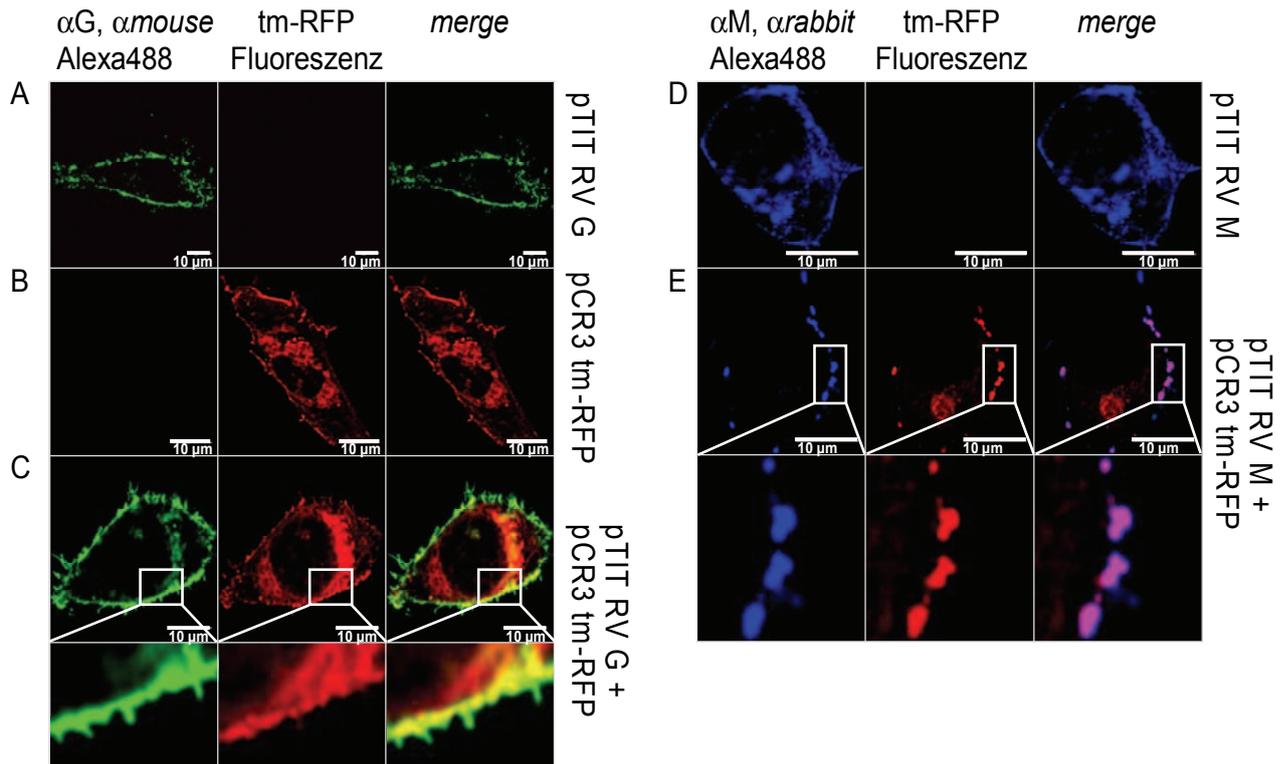


Abb. 8: tm-RFP kolokalisiert mit den RV Proteinen G und M

Nach Transfektion in BSR T7/5 Zellen, wurden tm-RFP und die RV Proteine G und M von den entsprechenden Plasmiden exprimiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PFA fixiert, permeabilisiert und die RV Proteine G und M mit den entsprechenden Antikörpern mittels indirekter Immunfärbung detektiert. (A) Nach Transfektion der RV G cDNA konnte keine tm-RFP Autofluoreszenz nachgewiesen werden. (B) Die Transfektion von tm-RFP führte zu keiner G-spezifischen Immunfärbung. (C) Kolokalisation von RV G und tm-RFP konnte hauptsächlich an der Zytoplasmamembran detektiert werden. (D) Eine Transfektion mit der RV M cDNA alleine führte zu keiner tm-RFP Autofluoreszenz. (E) RV M und tm-RFP zeigten eine Kolokalisation an der Zellmembran. Die Aufnahmen mittels des konfokalen Laserfluoreszenzmikroskops und die Bildverarbeitung erfolgten wie in Kapitel 3.6.3.2. und 3.6.3.1. beschrieben. Der Skalierungsbalken präsentiert 10 μm .

3.5.4. Die Inkorporation von tm-RFP in G-defiziente RV Partikel

Zur Untersuchung der Inkorporation von tm-RFP als Transmembran-verankertes Oberflächenprotein in die Virushülle von Virionen in Abwesenheit des authentischen RV G Proteins, wurden pseudotypisierte Viren erzeugt. Dazu wurde die RV-Deletionsmutante SAD Δ G (93) verwendet. Für diese Komplementierung wurden konstitutiv exprimierende Zellen benutzt. Für die Komplementation in NA Zellen, welche die unglykosylierte Variante tm-RFP konstitutiv exprimieren (NA tm-RFP Zellen), wurden die Zellen mit einer MOI=1 mit SAD Δ G(RV G) infiziert und 48 h nach Infektion der Zellkulturüberstand der infizierten Zellen gesammelt. Die im Zellkulturüberstand vorhandenen Viren wurden zunächst über Millipore Säulen aufgereinigt und dann mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (Kapitel 2.6.4.8.) gereinigt und aufkonzentriert. Ein Teil dieser aufgereinigten Viren wurde 1:1 mit grün fluoreszierenden Viruspartikeln (39), welche von SAD eGFP-P infizierten Zellen stammten, gemischt und auf Deckgläschen mit PFA fixiert. Mittels der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass das unglykosylierte tm-RFP und das synthetisch glykosylierte tm-RFP(Asn) in die Virionen inkorporiert wurden (Abb. 9, 11C) (74).

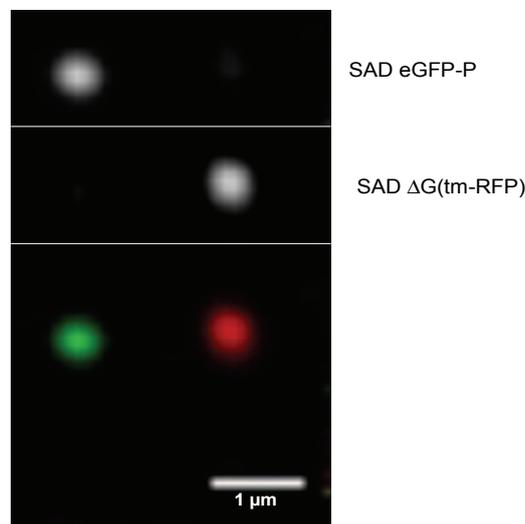


Abb. 9: Inkorporation von tm-RFP in die Virushülle der G-defizienten SAD Δ G Virionen

NA tm-RFP Zellen, welche tm-RFP konstitutiv exprimieren, wurden mit SAD Δ G infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und die Virionen über eine Dichtegradienten-Zentrifugation aufkonzentriert. Die aufgereinigten Virionen wurden mit eGFP-markierten RV Virionen gemischt und auf Deckgläschen mit PFA fixiert. Mittels der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie (Kapitel 3.6.3.2. und 3.6.3.1.) konnten die rot und die grün fluoreszierenden Virionen detektiert werden. Der Skalierungsbalken präsentiert 1 μ m.

3.6. Die Konstruktion von rekombinanten Tollwutviren, welche ein Fremdgen vom Genom exprimieren

3.6.1. Die tm-RFP exprimierenden, infektiösen Viren

Durch das Fehlen des Rezeptor-bindenden RV G sind die oben beschriebenen, *in trans* erzeugten Virionen (Abb. 9), nicht infektiös. Für die Untersuchung von Transportprozessen werden aber infektiöse Virionen benötigt, die neben dem fluoreszierenden Fusionsprotein tm-RFP auch authentisches RV G in die Virushülle inkorporiert haben. Dazu wurden verschiedene, rekombinante Viren konstruiert, welche die unterschiedlichen RFP-Varianten zusätzlich zum authentischen G Protein exprimieren (Abb. 10) (74). Die tm-RFP Varianten wurden von einem zusätzlichen Gen exprimiert, das mit einer N/P Gengrenze versehen zwischen die RV G und RV L Transkriptionseinheiten eingebaut wurde.

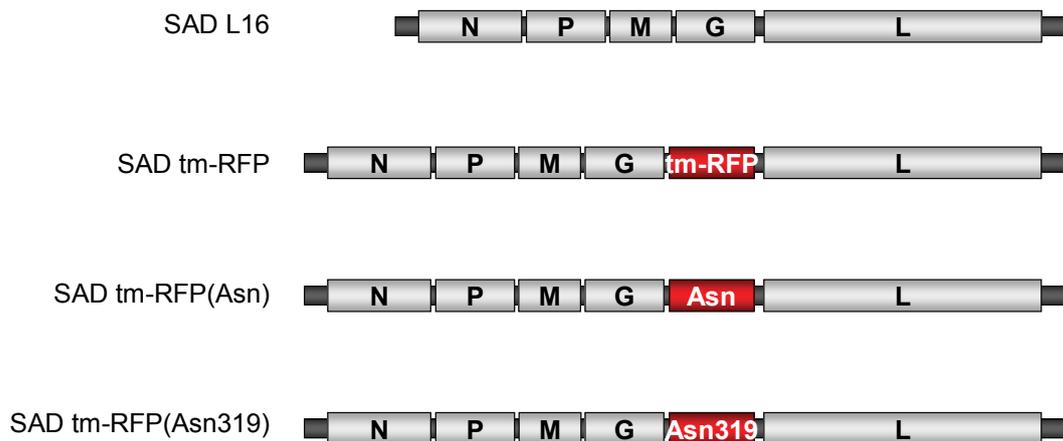


Abb. 10: Schematische Darstellung der rekombinanten, tm-RFP exprimierenden Viren

Die verschiedenen tm-RFP Konstrukte wurden als zusätzliche Transkriptionseinheit mit eigener N/P Gengrenze zwischen die ORFs für L und G in das Virusgenom inseriert.

3.6.2. Die Rekombinanten, infektiösen Viren: Koinkorporation von tm-RFP oder tm-RFP(Asn) und RV G in Virionen

Zur Beantwortung der Frage, ob die Inkorporation eines zusätzlichen Oberflächenproteins neben dem authentischen RV G überhaupt möglich ist, sollte aus den beschriebenen Gesamtklon cDNAs (Kapitel 2.5.3., Tab. 6 und Kapitel 3.6.1., Abb. 10) mit Hilfe des reversen genetischen Systems (133) infektiöse Viren hergestellt werden. Von allen, oben beschriebenen Gesamtklon cDNAs konnten Viren hergestellt werden. Zur Bestimmung der Infektiosität wurde von den Viren SAD tm-RFP, SAD tm-RFP(Asn) und von *wt* SAD L16 als Kontrollvirus Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden BSR T7/5 Zellen mit den verschiedenen Viren mit einer MOI von 0,01 infiziert und nach 2 h Virusüberstände als Nullwert abgenommen. Anschließend wurde bis zum Zeitpunkt 72 h nach Infektion alle 12 h Virusüberstände abgenommen. Die abgenommenene Virusüberstände wurden dann alle an einem Tag auf BSR T7/5 Zellen titriert (Kapitel 2.6.4.9.). Die Auswertung der Wachstumskurve ergab, dass die Titer der tm-RFP exprimierenden Viren im Vergleich mit *wt* SAD L16 um eine halbe Logstufe reduziert sind (Abb. 11A) (74). SAD tm-RFP(Asn) zeigte, um Vergleich zu SAD tm-RFP im Verlauf der Wachstumskurve immer niedrigere Titer, erreichte nach 72 h jedoch den gleichen Titer wie SAD tm-RFP. Anschließend wurde im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop die tm-RFP Expression und der Oberflächentransport in Virus-infizierten BSR T7/5 Zellen beobachtet und analysiert, ob überhaupt eine Inkorporation von tm-RFP in einzelne Viruspartikel stattgefunden hat (Abb. 11B). Dazu wurden BSR T7/5 Zellen mit einer MOI von 1 mit den unterschiedlichen Viren infiziert und 24 h nach der Infektion die Zellen mit PFA fixiert, permeabilisiert und RV G oder RV N mit den Primärantikörpern E559 (Maus α G) oder W239 (Maus α N) und dem Sekundärantikörper α mouse Alexa488 angefärbt. tm-RFP wurde anhand seiner Autofluoreszenz detektiert. Die beiden Proteine RV G und tm-RFP bzw. tm-RFP(Asn) wurden mit etwa gleicher Effizienz zur Zellmembran transportiert und in die Zellmembran inkorporiert (Abb. 11B) (74). Wie schon zuvor in den transfizierten Zellen gezeigt (Kapitel 3.5.3., Abb. 8), konnte ebenfalls eine Kolokalisation von tm-RFP und von tm-RFP(Asn) mit RV G nachgewiesen werden, während die tm-RFP Variante tm-RFP(Asn319) nicht zur Zellmembran transportiert wurde und daher auch nicht mit RV G kolokalisiert (Abb. 11B) (74). RV N konnte bei den Viren SAD tm-RFP und SAD tm-RFP(Asn) in sogenannten *Inclusionbodies* unterhalb der Regionen der Zellmembran detektiert werden, in denen auch die Proteine tm-RFP bzw. tm-RFP(Asn) in die Zellmembran inkorporiert vorgefunden wurden (nicht gezeigt). Bei SAD tm-RFP(Asn319)

infizierten Zellen wurden RV N *Inclusionbodies* und das Protein tm-RFP(Asn319) nur im Zytoplasma gemeinsam gefunden. Es konnte keine Lokalisation von RV N und tm-RFP(Asn319) an gleichen Bereichen der Zellmembran detektiert werden (nicht gezeigt).

Für den Nachweis der Inkorporation von tm-RFP und RV G in Virionen wurden Zellüberstände von infizierten BSR T7/5 Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt, aufkonzentriert, auf Deckgläschen ausgesät, mit PFA fixiert und permeabilisiert. Die rekombinanten Viren, welche das unglykosylierte tm-RFP oder das synthetisch glykosylierte tm-RFP(Asn) exprimierten, zeigten eine effiziente rote Fluoreszenz (Abb. 11C). Die Anwesenheit von RV G in den Virionen, die ebenfalls tm-RFP oder tm-RFP(Asn) in ihre Virushülle inkorporiert hatten, wurde mittels Immunfärbung mit den Antikörpern E559 und *mouse* Alexa488 (grün) nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass tm-RFP und tm-RFP(Asn) auch in Abwesenheit des authentischen RV G Proteins in die Virionen inkorporiert wurden. Koinkorporation beider Proteine führte zu „Mosaikviren“ welche die Rezeptorerkennungseigenschaften des G Proteins und gleichzeitig eine RFP-markierte Hülle besaßen. Neben den Mosaikviren wurden auch Virionen gefunden, welche keine oder nur eine sehr geringe RFP Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 11C) (74). Dies deutet darauf hin, dass die Inkorporation von RFP nicht immer gleich effizient erfolgte und so eine stärkere Variabilität an RFP-Gehalt in der Virushülle zu beobachten war (Kapitel 3.7.1., Abb. 14). Bei den Viren, die zusätzlich tm-RFP(Asn319) exprimierten, konnten keine Viren mit roter Fluoreszenz im Zellkulturüberstand gefunden werden, d.h. die tm-RFP(Asn319) in die Virushülle inkorporiert hatten. Dies zeigt, dass ein effizienter Oberflächentransport des Fusionsproteins Voraussetzung für die Inkorporation in die Virushülle ist und dass RV G und tm-RFP gemeinsam in die Virushülle inkorporiert werden.

Der erzielte Titer von $5,5 \times 10^7$ ffu/ml (Abb. 11A) und der Nachweis der gleichzeitigen Inkorporation von RV G und tm-RFP in die Virushülle einzelner Virionen (Abb. 11C) zeigen, dass die Entstehung infektiöser Partikel durch die Anwesenheit von tm-RFP nicht schwerwiegend beeinflusst wird. Die wichtigen RV G-abhängigen Prozesse wie Virusbindung an die Zellmembran, Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Membranfusion werden anscheinend durch tm-RFP nur in gerigem Maße behindert.

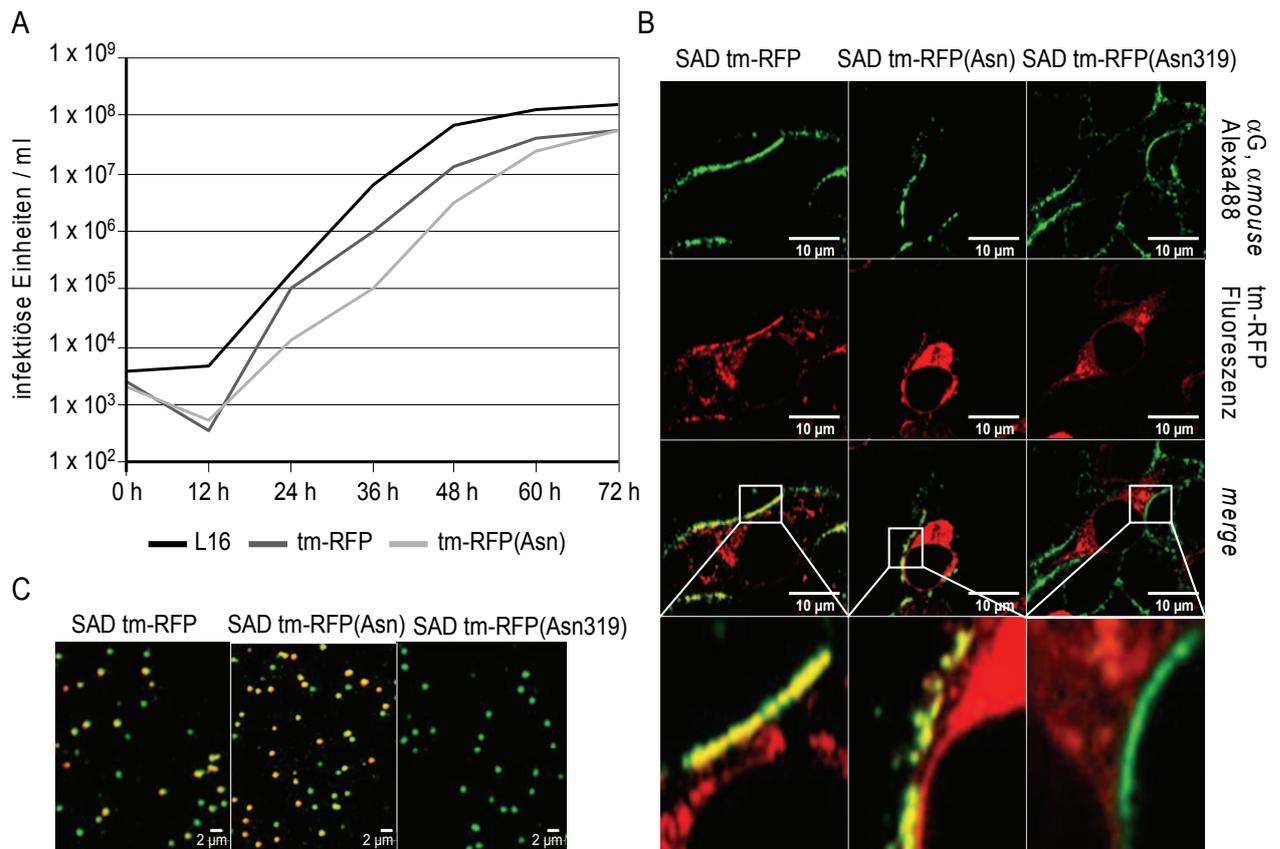


Abb. 11: Analyse der tm-RFP und RV G exprimierenden Viren

(A) Wachstumskurve der Viren SAD L16, SAD tm-RFP und SAD tm-RFP(Asn). Infiziert wurden BSR T7/5 Zellen mit einer MOI von 0,01. Bis 72 h nach Infektion wurden alle 12 h Virusüberstände genommen und anschließend alle Virusüberstände am selben Tag auf BSR T7/5 Zellen titriert. (B) Oberflächenexpression der chimären RFP/RV G Proteine in Virus-infizierten Zellen. 24 h nach Infektion der BSR T7/5 Zellen mit den angegebenen Viren wurden die Zellen mit PFA fixiert und RV G mit dem G-spezifischen monoklonalen Antikörper E559 gefärbt. In SAD tm-RFP oder SAD tm-RFP(Asn) infizierten Zellen konnte eine Kolokalisation von RV G und tm-RFP bzw. tm-RFP(Asn) an der Zellmembran gezeigt werden. In SAD tm-RFP(Asn319) infizierten Zellen hingegen konnte keine Kolokalisation von RV G und tm-RFP(Asn319) nachgewiesen werden. (C) Inkorporation von tm-RFP in RV Partikel. Virionen aus dem Zellkulturüberstand infizierter BSR T7/5 Zellen wurden mit der Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt und mit PFA auf Deckgläschen fixiert. RV G wurde mit dem G-spezifischen Antikörper E559 gefärbt und ein Alexa488 gekoppelter Sekundäntikörper (grün) verwendet. Die Viruspartikel wurden mit der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie (Kapitel 3.6.3.2. und 3.6.3.1.) detektiert. Die Skalierungsbalken präsentieren 10 (Abb. A) und 2 (Abb. C) μ m.

3.6.3. Die Infektiösität der Mosaikviren mit RV G und tm-RFP, tm-RFP(Asn) oder tm-RFP(Asn319)

Eine weitere Analyse der Protein-Zusammensetzung in der Virushülle der Mosaikviren erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurden BSR T7/5 Zellen mit den Viren SAD tm-RFP, SAD tm-RFP(Asn), SAD tm-RFP(Asn319) und SAD L16 (Positivkontrolle) infiziert. Der Zellkulturüberstand der Virus-infizierten BSR T7/5 Zellen wurde mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt und aufkonzentriert. Die Gradienten wurden nach der Zentrifugation in 12 Fraktionen geteilt und *Aliquots* der Fraktionen im SDS-Page aufgetrennt und im Western Blot und mittels des quantitativen *Fluoroimaging* (nicht gezeigt) analysiert. Neben den aufgereinigten Virionen wurden auch die Zelllysate von Virus-infizierten Zellen analysiert. Mit dem Peptidantikörper α RV Gtail konnten RV G, tm-RFP, tm-RFP(Asn) und tm-RFP(Asn319) im Western Blot detektiert werden (Abb. 12A). Um zu testen, ob der Einbau eines zusätzlichen Oberflächenproteins neben RV G in die Virushülle zu einer Reduktion der Infektiösität führt, wurde auch der infektiöse Titer der einzelnen Gradientenfraktionen bestimmt und mit dem Proteingehalt der entsprechenden Gradientenfraktion verglichen (Abb. 12B). Im Western Blot zeigten die Virionen aus den aufgereinigten Zellkulturüberständen von SAD L16 infizierten Zellen ein typisches Verteilungsmuster im Gradienten. Dabei fanden sich in den Fraktionen 4, 5 und 6 des Gradienten die viralen Proteine RV N, P, M und G mit dem höchsten Proteingehalt in Fraktion 5 (Abb. 12A). Eine Titerbestimmung der einzelnen Fraktionen zeigte, dass in der Fraktion 5 mit dem höchsten Proteingehalt auch der höchste infektiöse Titer vorhanden war (Abb. 12B). Die Virionen aus SAD tm-RFP infizierten Zellen zeigten dasselbe Verteilungsmuster im Dichtegradienten und bei der Titerbestimmung wie die Viruspartikel von SAD L16 infizierten Zellen. Bei den Virionen der SAD tm-RFP(Asn) infizierten Zellen fanden sich in den Fraktionen 3, 4 und 5 des Gradienten die viralen Proteine RV N, P, M und G mit dem höchsten Proteingehalt in Fraktion 4. Bei beiden Viren befand sich auch die höchste Menge an tm-RFP in der Gradientenfraktion mit dem größten Gehalt an RV N, P, M und G. Die Kolo-kalisation der viralen Proteine in den Fraktionen, die Kolo-kalisation von tm-RFP bzw. tm-RFP(Asn) mit RV N, P, M und G und die Bestimmung der Virustiter der einzelnen Fraktionen zeigten, dass wie auch bei SAD L16 intakte Viren vorlagen. Jedoch wurde eine geringere Menge an tm-RFP bzw. tm-RFP(Asn) im Vergleich zu RV G in die Virionen inkorporiert. Dies steht im Kontrast zu der Proteinzusammensetzung in den Zelllysaten von infizierten Zellen; hier entsprach der Proteingehalt zumindest von tm-RFP(Asn) in etwa dem von RV G (Abb. 12A). Bei der Inkorporation der Proteine in die Virushülle wurde also RV G gegenüber tm-RFP bzw. tm-RFP(Asn) bevorzugt eingebaut. Ein

3.7. RFP und eGFP markierte Tollwutviren

Mit den RFP-markierten Viren konnte gezeigt werden, dass sich einzelne Viruspartikel fluoreszenzmikroskopisch nachweisen lassen (Kapitel 3.5.4. Abb. 9 und Kapitel 3.6.2., Abb. 11C). Um in späteren *Live tracking* Experimenten zwischen umhüllten Viren und in das Zytoplasma freigesetzten RNPs differenzieren zu können, wurden in einem weiteren Schritt Viren generiert, deren RNP durch ein eGFP-P Fusionsprotein (39) und deren Virushülle mit tm-RFP markiert ist (74). Das Fusionsprotein tm-RFP wurde von einem zusätzlichen Gen exprimiert, das mit einer N/P Gengrenze versehen wurde und zwischen die RV G und RV L Transkriptionseinheiten in den cDNA Gesamtklon SAD eGFP-P eingebaut wurde (Abb. 13). Des Weiteren wurden zweifarbige Viren generiert, welche anstelle des Glykoproteins des Stammes SAD, das Glykoprotein des neuropathogeneren Stammes CVS besitzen (SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP). Die rekombinanten Viren SAD eGFP-P tm-RFP und SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP konnten von der cDNA hergestellt werden und erreichten ähnliche Titer wie SAD eGFP-P.

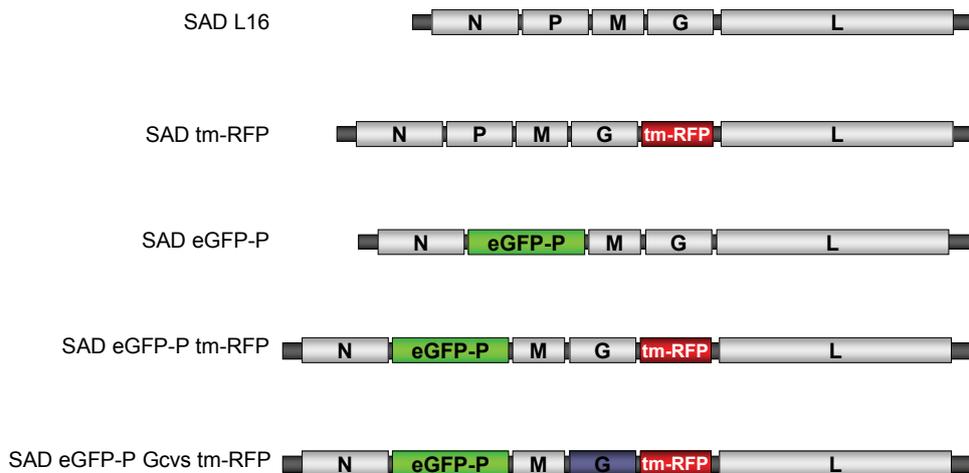


Abb. 13: Schematische Darstellung der hergestellten zweifarbigen Viren

Genomorganisation des Kontrollvirus *wt* SAD L16, der einfarbigen Viren SAD tm-RFP und SAD eGFP-P und der doppelt-markierten Viren SAD eGFP-P tm-RFP und SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP. SAD eGFP-P tm-RFP wurde hergestellt, indem die cDNA Plasmide, welche für SAD tm-RFP und das schon früher beschriebene Virus SAD eGFP-P kodieren (39), kombiniert wurden. SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP besitzt das Glykoprotein des Tollwutvirusstammes CVS.

3.7.1. Die Analyse der tm-RFP und eGFP markierten Tollwutviren

Virionen wurden aus dem Zellkulturüberstand von BSR T7/5 Zellen infiziert mit SAD eGFP-P tm-RFP oder SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt, auf Deckgläschen mit PFA fixiert und im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert. Es konnte eine Koinkorporation der beiden Fluoreszenzproteine in die Viruspartikel nachgewiesen werden, da die resultierenden Viren zum größten Teil eine „zweifarbige“ Markierung, mit einer RFP-Hülle und einem eGFP-RNP aufwiesen (Abb. 14). Daneben waren Partikel/Vesikel mit einfacher eGFP Markierung nachweisbar, die wenig oder kein RFP enthielten. Einzelne RFP-markierte Partikel sind vermutlich auf leere, Membran-umhüllte Vesikel zurückzuführen. Der eGFP- und RFP-Gehalt von 93 Viruspartikeln wurde im Detail mit Hilfe des Programmes ImageJ analysiert. Dazu wurden fünf zufällig ausgewählte Aufnahmen eines Präparates von SAD eGFP-P tm-RFP Viruspartikeln verwendet. Zunächst wurden beide Kanäle geöffnet und die Funktion *Process>Smooth* und *Image>Adjust* (hier nicht über 250) verwendet. Anschließend wurde nur der „grüne“ Kanal betrachtet und zunächst eine geeignete Vergrößerung und über *Analyze>Set Measurements* die Funktion *Min & Max, Mean Gray Value* ausgewählt. Mit Hilfe des Kreissymbol es wurde das erste grüne Viruspartikel markiert und über die Funktion *Plugins>ROI>Multi Measure>Add<Sp>* die Koordinaten gespeichert. Das zweite Viruspartikel wurde markiert, indem das Symbol A verwendet wurde und der Kreis um das nächsten Viruspartikel gelegt wurde und die Koordinaten über *Plugins>ROI>Multi Measure>Add<Sp>* gespeichert wurden. Pro Aufnahme wurden so jeweils zwischen 15 und 30 grüne Viruspartikel gleicher Größe und in etwa gleicher eGFP-Fluoreszenzstärke und zusätzlich vier Bereiche gleicher Größe wie die Partikel als Negativgebiete markiert. Zum Schluß wurden alle aufgezeichneten Koordinaten in der *Multi Measure* Liste markiert und über den Befehl *Measure* die *Min & Max* Werte errechnet. Da nur die Kanäle aufgesplittet wurden und es sich bei den meisten Viruspartikeln ja um zweifarbige Viren handelte, gibt das Programm ImageJ nicht nur die eGFP-Fluoreszenzstärke der markierten „grünen“ Partikel an, sondern auch die RFP-Fluoreszenzstärke der im grünen Kanal markierten und im roten Kanal auch fluoreszierenden gleichen Viruspartikel. Dazu wurde nun das Bild des roten Kanals aktiviert und über den Befehl *Measure* die *Min & Max* Werte errechnet. Die *Min & Max* Werte wurden in Excel kopiert, der Hintergrund (die Negativgebiete) subtrahiert, Mittelwert und Standardabweichung berechnet und die Fluoreszenzintensitäten graphisch dargestellt. Nun konnte man erkennen, welche Viruspartikel, die im grünen Kanal markiert wurden waren,

auch im roten Kanal fluoreszieren und daher sowohl eGFP als auch tm-RFP inkorporiert hatten und in welcher Fluoreszenzstärke (Abb. 14B). Die Analyse der Viruspartikel zeigte, dass im Gegensatz zu eGFP die RFP Fluoreszenzintensität niedriger war und zudem auch stärker variierte (74). Dies ist wahrscheinlich auf eine teilweise, kompetitive Hemmung der tm-RFP-Inkorporation durch RV G zurückzuführen (Kapitel 4.1.).

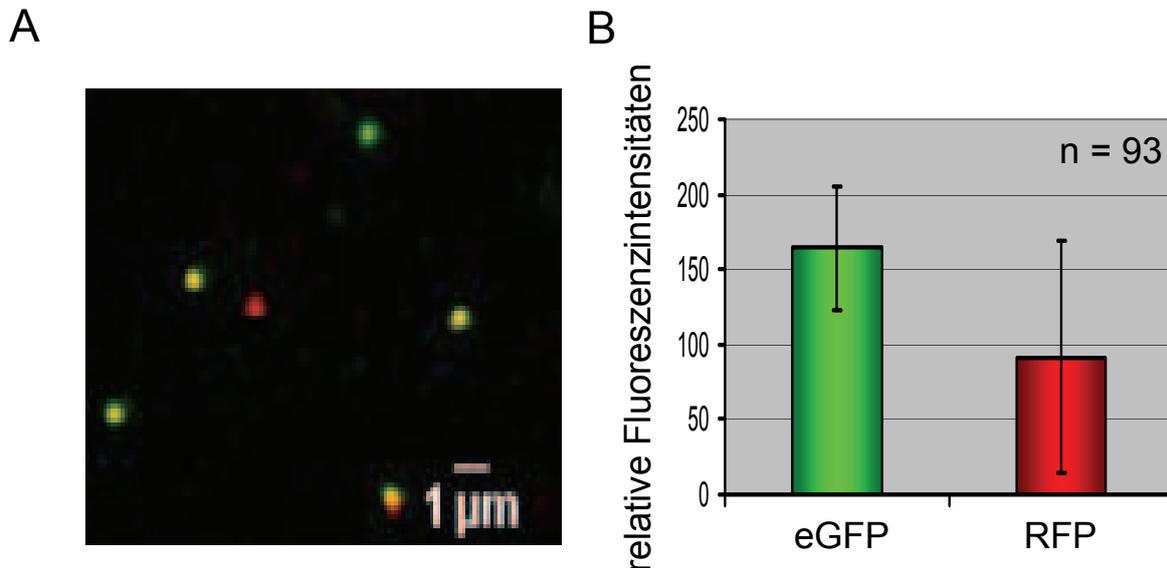


Abb. 14: Herstellung der zweifarbig-markierten RV

(A) Virionen von SAD eGFP-P tm-RFP infizierten BSR T7/5 Zellen wurden mit der Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und mit PFA auf Deckgläschen fixiert. Die Viruspartikel konnten anhand der RFP und eGFP Eigenfluoreszenz mit der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Kapitel 3.6.3.2). (A) Zwei- und einfarbige Viruspartikel konnten detektiert werden. (B) Der eGFP- und RFP-Gehalt von 93 Viruspartikeln wurde im Detail mit Hilfe des Programmes ImageJ (siehe oben und Kapitel 3.6.3.2) analysiert.

3.8. *Live-imaging* Experimente mit fluoreszierenden Viruspartikeln

In einem ersten *live-tracking* Experiment wurden BSR T7/5 Zellen mit 2,5 µg des eGFP-Expressionsplasmides pEGFP-N3 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit dem tm-RFP markierten Virus SAD tm-RFP mit einer MOI von 1 auf Eis oder bei RT infiziert. Die bei RT infizierten Zellen wurden direkt im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop in einer Inkubationskammer unter *Live cell* Bedingungen (37 °C und 5 % CO₂) beobachtet (Abb. 15A). Die auf Eis infizierten Zellen wurden für 1 h bei 4 °C inkubiert. Bei 4 °C können sich die Viruspartikel zwar an die Zellmembran binden, jedoch findet noch keine Rezeptor-vermittelte Aufnahme des Virus in die Zelle statt. Nach der Inkubation wurde durch Zugabe von 50 mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl) die Ansäuerung der

Ergebnisse

Endosomen blockiert. Dadurch wurde der pH-abhängige Schritt der RV G-vermittelten Membranfusion und die RNP-Freisetzung (*Uncoating*) gehemmt und es kam zu einer Anreicherung an intakten Virionen mit RFP-markierter Virushülle in den Endosomen. Nach NH_4Cl -Zugabe wurden auch diese Zellen unter *Live cell* Bedingungen im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 15B und C). Etwa 25 min nach der Infektion bei RT wurden die ersten Viruspartikel in den Endosomen der infizierten Zellen nachgewiesen (Abb. 15A orange Bereiche) und es konnten noch an die Zellmembran gebundene Viruspartikel beobachtet werden (Abb. 15A, Pfeil). 3,5 h nach Zugabe des Ammoniumchlorides zu den auf Eis infizierten Zellen konnte die Anreicherung der intakten Virionen in den Endosomen beobachtet werden (Abb. 15B, Pfeil). 30 h nach Zugabe des Ammoniumchlorides wurden sehr viele Endosomen voller Viruspartikel detektiert (Abb. 15C, Pfeil). In einem nächsten Schritt wurden die zweifarbigen Viren untersucht. Dazu wurden BSR T7/5 Zellen mit SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP infiziert und in *Live tracking* Versuchen in der Inkubationskammer mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskop analysiert. Kurze Zeit nach Infektion der Zellen konnten die ersten Virionen an der Zellmembran gebunden vorgefunden werden (nicht gezeigt). Nach etwa 3 h konnten dann die zweifarbigen Viruspartikel in großen vesikulären Strukturen, also im endosomalen Kompartiment nachgewiesen werden (Abb. 15D). Wie schon zuvor für die einfarbigen Viren SAD eGFP-P beschrieben (39), bewegten sich auch die zweifarbigen Viren in den Endosomen, blieben aber immer - auch über einen längeren Beobachtungszeitraum - mit der Vesikelmembran verbunden. Auch konnten in den Endosomen bislang nur zweifarbige, das heißt umhüllte Virionen nachgewiesen werden (74). Diese befinden sich also in einem Stadium vor dem Prozess des *Uncoating*.

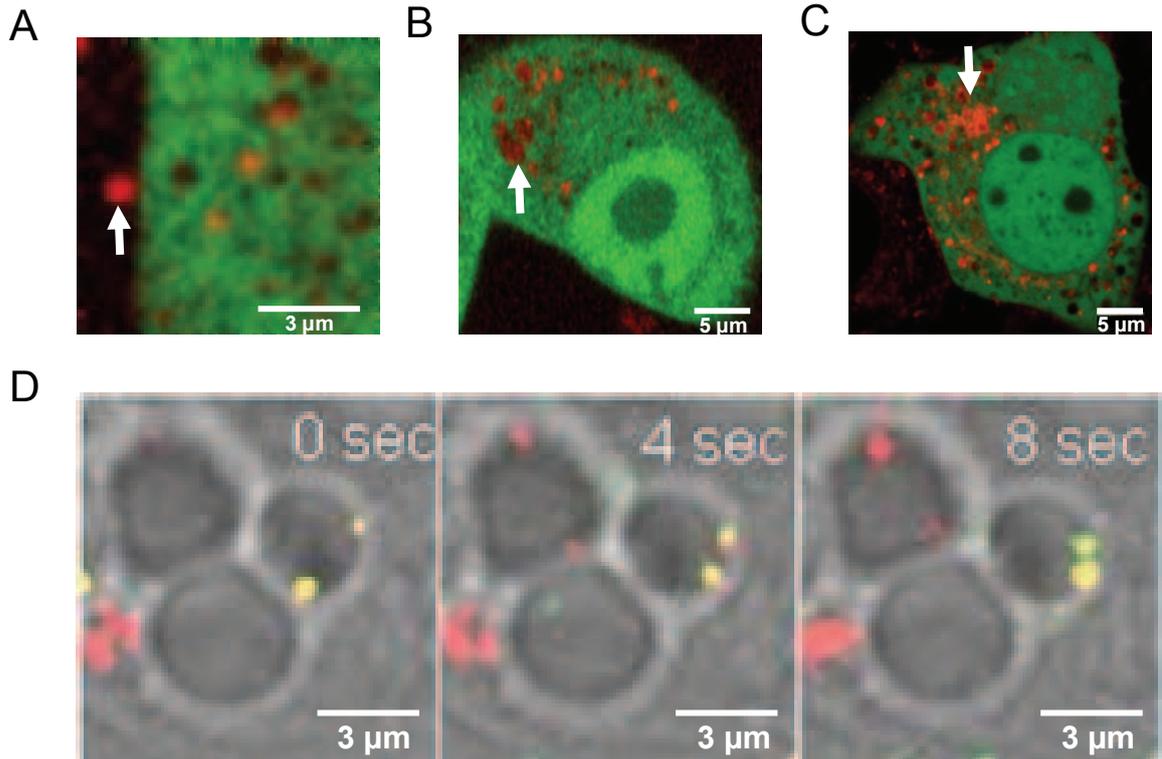


Abb. 15: Detektion der fluoreszenz-markierten RV Partikel in lebenden Zellen

(A) bis (C) Zur besseren Detektion der zellulären Strukturen wurden eGFP-exprimierende BSR T7/5 Zellen verwendet und mit dem RFP-markierten Virus SAD tm-RFP bei RT und auf Eis infiziert. (A) An die Zellmembran gebundene Virionen (Pfeil), 25 min nach Infektion bei RT. (B) 3,5 h nach NH_4Cl -Zugabe zu den auf Eis infizierten und bei 4°C inkubierten Zellen wurde eine erste Anreicherung der Viruspartikel in den Endosomen (Pfeil) beobachtet. (C) Die Anreicherung (Pfeil) erreichte ca. 30 h nach NH_4Cl -Zugabe ihren Höhepunkt. (D) Detektion der zweifarbig-markierten SAD eGFP-P tm-RFP Virionen in den Endosomen lebender BSR T7/5 Zellen 3 h nach Infektion. Die konfokalen Laserfluoreszenzbilder wurden in (D) mit nicht-konfokalen DIC Bildern unterlegt und die Skalierungsbalken repräsentieren 5 bzw. 3 μm .

3.8.1. Die umhüllten Viren werden in den axonalen Ausläufern von ausdifferenzierten NS20Y Zellen und primären Nervenzellen transportiert

Nachdem die zweifarbig markierten Viren in Endosomen von lebenden Zellen nachgewiesen werden konnten, sollten diese Viren nun verwendet werden, um die Frage zu beantworten, ob der Transport von Viruspartikeln in Vesikeln oder als nackte RNPs erfolgte. Um den Transportprozess der zweifarbig markierten Viren über eine längere Strecke innerhalb von Transportvesikeln untersuchen zu können, wurden möglichst typische, neuronale Zellen mit gut ausgebildeten Ausläufern benötigt. Die humane Zelllinie Ntera2 und die murinen Neuroblastoma Zellen NS20Y wurden als neuronale Zelllinien diskutiert. Da sich jedoch die

Ntera2 Zellen in unseren Händen nicht zu Zellen mit gut ausgebildeten neuronalen Ausläufern ausdifferenzieren liessen (A. Marschalek, unveröffentlicht), wurden die NS20Y Zellen ausgewählt.

3.8.1.1. Die Ausdifferenzierung der NS20Y Zellen

Die Ausdifferenzierung der Neuroblastoma Zellen zu nicht-teilenden Zellen mit neuronalen Ausläufern erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Grouse et al. (55). Frische NS20Y Zellen wurden in *Live cell imaging* geeignete *Slides* ausgesät (Abb. 16A). Hatte die Zelldichte eine Konfluenz von 70 % erreicht, wurde die Ausdifferenzierung durch Verringerung der Konzentration des Wachstumsfaktor FKS im Medium und der Zugabe von 1mM Butyryl-cAMP eingeleitet. Sieben Tage nach Start der Butyryl-cAMP Behandlung wurde diese beendet und das Zellkulturmedium mit 50 μM AraC und 300 μM Uridin versetzt. Die Ausdifferenzierung war sieben Tage später abgeschlossen; nur noch wenige Zellen, welche gut ausgebildete, neuronale Ausläufer aufwiesen, verblieben in den *Slides* und wurden für die Untersuchung des RV Transportes verwendet (Abb. 16B).

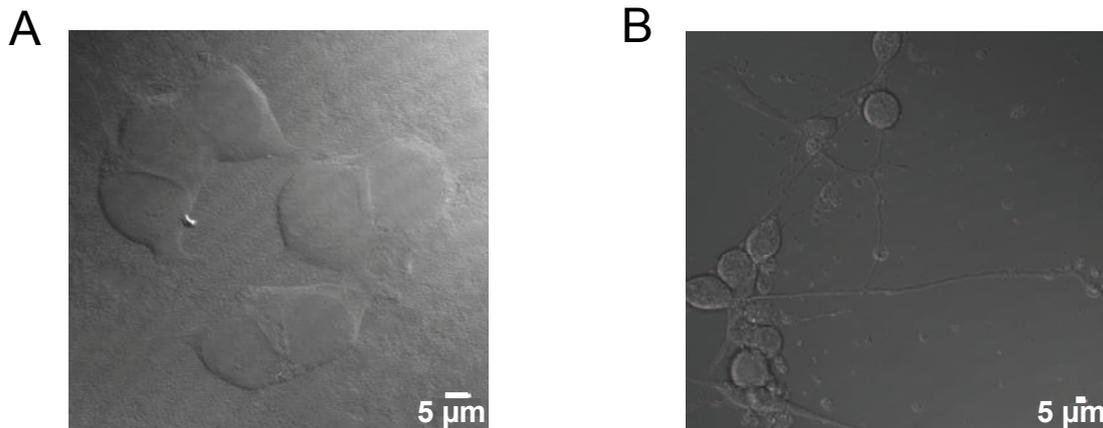


Abb. 16: Morphologie der NS20Y Zellen

(A) Die murinen NS20Y Zellen besitzen im nicht-differenzierten Zustand eine rundliche Struktur und es sind nur sehr wenige Zellen zu finden, welche Ausläufer ausbilden. (B) Nach der Ausdifferenzierung der NS20Y Zellen bildeten diese gut strukturierte Ausläufer und teilten sich nicht mehr.

3.8.1.2. Die RV Partikelbewegungen in den ausdifferenzierten NS20Y Zellen

Die ausdifferenzierten Zellen wurden mit unterschiedlichen Viren infiziert (Abb. 17A) und das Verhalten der Viren während der ersten vier bis sieben Stunden der Infektion in *Live imaging* Experimenten mit Hilfe der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie untersucht. Zur Beobachtung der lebenden, Virus-infizierten Zellen wurde eine Heizkammer mit einer Temperatur von 37 °C und einer Zufuhr von 5 % CO₂ verwendet.

Zur Detektion der Viruspartikel wurden 63 x/1.4 Öl und Fluar 40 x/1.3 Öl Objektive und Laser-Anregungswellenlängen von 488 nm (für eGFP) und 543 nm (tm-RFP) benutzt. Die Fluoreszenzemission wurde unter Verwendung des *band pass* Filters 505-530 nm (eGFP) und der *long pass* Filter >585 und >560 nm für tm-RFP detektiert. Die infizierten Zellen wurden pro Versuchstag ca. vier bis sieben Stunden lang unter *Live cell* Bedingungen beobachtet und jeweils Aufnahmen von ca. 10 bis 20 min Länge gemacht. Es wurden pro Aufnahme drei Ebenen aufgenommen und meist eine Geschwindigkeit von ca. sechs Sekunden pro Bild gewählt. Die drei Ebenen wurden für die Auswertung der Partikelbewegungen auf eine Ebene gebündelt (Befehl: Projektion), um eine bessere Detektion zu ermöglichen. Die Unterlegung der konfokalen Laserfluoreszenzbilder mit nicht-konfokalen DIC Bildern der NS20Y Zellen ermöglichte die Bestimmung der Viruspartikelposition innerhalb der neuronalen Ausläufer. Mit dem Programm ImageJ (Kapitel 2.6.3.2.) wurden die Bilder bearbeitet. Die Bilder des grünen (für die Detektion des eGFP), roten (Detektion des tm-RFP) und grauen (DIC) Kanals wurden geöffnet und in allen Kanälen wurde der Hintergrund minimiert und die Kontraste zwischen eigentlichen Viruspartikeln und unspezifischem Hintergrund verstärkt (Befehle: *Image>Adjust>Brightness/Contrast, Process>Smooth*). Hierbei wurden der rote und der grüne Kanal in etwa gleich behandelt. Dann wurden die Bilder wieder zu einem einzigen Bild zusammengefügt (*Plugins>Color functions>RGB Gray Merge*). Die Bewegungsmuster der Viren wurden ohne Automatisierung *per Hand* ausgezählt. Als Transport wurden Bewegungsmuster definiert, die eine deutliche Bewegung über ca. zwei bis drei Bildaufnahmen in eine Richtung aufwiesen. Die Richtung des Transportes wurde bestimmt, indem die Zelle angeschaut wurde; erfolgte der Transport zum Zellsoma hin, wurde er als anterograd definiert und umgekehrt. Bei einigen Bildern konnte nicht mehr definiert werden, wo sich der Zellkörper befindet; diese Aufnahmen wurden nur als Transport bezeichnet. Bei den *Trajectories* (Abb. 17B) wurde mit dem Programm ImageJ die Positionen des Viruspartikel in den Einzelbildern bestimmt (*Plugins>Particle counting>Point Picker>Point list*) und die räumliche Bewegung in X- und Y-Achse über die Zeit mit Hilfe des Programmes Excel berechnet. Bei allen verwendeten Viren konnten verschiedene Formen der Bewegung

gezeigt werden (Abb. 17A). Zunächst befanden sich alle detektierbaren Viruspartikel im extrazellulären Bereich zwischen den Zellen (nicht gezeigt). Nach kurzer Zeit begannen die ersten Viruspartikel mit der Bindung an die Zellmembran, bevorzugt an den Spitzen der neuronalen Ausläufer oder an den Ausläufern selber und nur sehr selten direkt am Zellkörper. Ungefähr die Hälfte der detektierten Viruspartikel aller verwendeten Viren verblieben gebunden an der Zellmembran (Abb. 17A und C), die restlichen 50 % konnten ca. 30 min nach Infektion innerhalb der Zellausläufer detektiert werden. Anscheinend kommt es häufig zu einer unproduktiven Bindung an die Zellmembran, ohne dass eine Rezeptor-vermittelte Endozytose stattfindet. Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose konnten wiederum verschiedene Bewegungsmuster innerhalb der axonalen Ausläufer beobachtet werden. Etwa 40 % der nachgewiesenen Viruspartikel zeigten keine oder nur eine geringe Bewegung innerhalb der Ausläufer (Abb. 17A und D). Diese schienen nicht an die Transportmaschinerie gebunden zu sein. Bei den Tollwutviren, welche mit dem Glykoprotein des Mokolavirus pseudotypisiert wurden waren, konnte kein Transport detektiert werden. Ebenfalls sehr schlecht transportiert wurden Tollwutviren mit dem SAD Glykoprotein (Abb. 17A). Die Verwendung des CVS Glykoproteins konnte die Transporthäufigkeit erhöhen. Einige Virionen wurden in die anterograde Richtung transportiert, wobei der Transportvorgang durch häufige Pausen unterbrochen wurde und selten ein Transport über eine größere Distanz beobachtet werden konnte (Abb. 17A, B und E). Diese Transportform konnte vor allem bei Tollwutviren beobachtet werden, die ein Fusionsprotein aus dem Glykoprotein des VSV und einem RV G-Anker in ihre Virushülle inkorporiert hatten (Abb. 17A, B). Viruspartikel mit CVS Glykoprotein wurden hingegen verstärkt retrograd transportiert (Abb. 17A, B und F). Viruspartikel, welche sich in retrograder Richtung bewegten, wurden über weite Strecken und mit einer gleichmäßigen Geschwindigkeit ohne Pausen transportiert (Abb. 17A, B und F) (74). Um die Geschwindigkeit der Viruspartikelbewegungen der unterschiedlichen Viren zu bestimmen, wurden wie für die *Trajectories* mit ImageJ die Positionen der Viruspartikel in den einzelnen Bildaufnahmen bestimmt und mit der Zeit/Bildaufnahme in Excel verrechnet. Insgesamt wurden 34 Transportereignisse analysiert und daraus ergab sich eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,1 $\mu\text{m}/\text{sek}$ über eine durchschnittliche Strecke von 25 μm . Die *Trajectories* (Abb. 17B) zeigten für den retrograden Transport der Viren SAD eGFP-P Gcvs (grün) und SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP (rot) sehr gleichmäßige Bewegungen. Die *Trajectories* der anterograd transportierten Viren SAD tm-RFP(Asn) (schwarz) und SAD eGFP-P Gsad tm-RFP (hellblau) sind dagegen nicht ganz so gleichförmig. Bei den Viren mit eGFP-markiertem RNP und tm-RFP-markierter Virushülle konnten bis auf wenige

Ergebnisse

Ausnahmen nur zweifarbige Viruspartikel bei einem retrograden Transport beobachtet werden (74). Dies zeigt, dass der Transport der Tollwutviren innerhalb der axonalen Ausläufer von Neuronen vor dem Prozess des *Uncoating* stattfindet. Dabei werden die umhüllten Viren über die spezifische Bindung des RV G an den Rezeptor in spezifische Transportvesikel dirigiert, welche dann über den Dynein-Motorkomplex zum Zellkörper transportiert werden. Das RV Glykoprotein ist hierbei entscheidend. So werden Viruspartikel mit dem Glykoprotein des CVS Stammes besser transportiert als der weniger neurotrope SAD Stamm. Eine Erklärung für die Unterschiede in dem Neurotropismus der beiden Stämme wäre, dass die beiden Stämme unterschiedliche Rezeptoren verwenden, die zur Aufnahme der Viren in unterschiedliche Transportvesikeln führt. Gezeigt werden konnte, dass die in dieser Arbeit konstruierten, zweifarbigen Viren gut geeignet sind, um intrazelluläre Vorgänge wie Transport, *Uncoating* oder auch Viruseintritt zu beobachten (74).

Ergebnisse

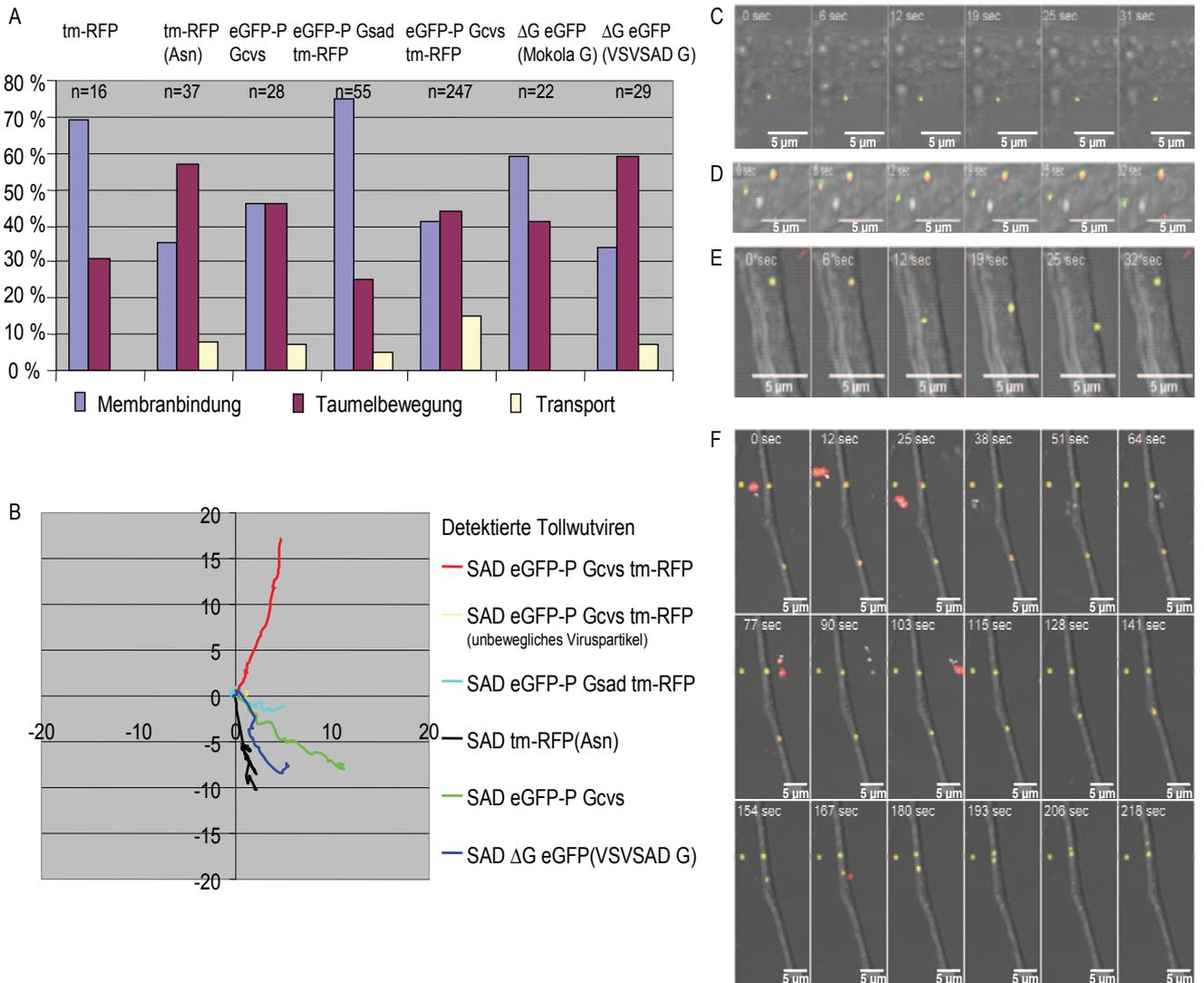


Abb. 17: RV Partikelbewegungen in axon-ähnlichen Strukturen von NS20Y Zellen

Die ausdifferenzierten Zellen wurden mit den Tollwutviren SAD tm-RFP, SAD tm-RFP(Asn), SAD eGFP-P Gcvs, SAD eGFP-P Gsad tm-RFP, SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP, SAD Δ G eGFP(Mokola G) und SAD Δ G eGFP(VSVSAD G) infiziert und die unterschiedlichen Partikelbewegungen in den lebenden Zellen im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert. (A) Zusammenfassung der Partikelbewegungen aller analysierten Viruspartikel. (B) *Trajectories* von einigen der Viruspartikeltransportbewegungen (C) Anhaftung der Viruspartikel an neuronale Ausläufer mit keiner oder nur geringer Partikelbewegung. (D) Virionen, welche leichte Bewegungen in verschiedene Richtungen durchführten. (E) Bewegung von umhüllten, zweifarbigem Virionen in die anterograde Richtung (von oben nach unten). (F) Retrograder Transport der zweifarbig-markierten RV Partikel in NS20Y Zellen 6 h nach Infektion. Die konfokalen Laserfluoreszenzbilder wurden mit nicht-konfokalen DIC Bildern der NS20Y Zellen unterlegt. In D erfolgte die Bildaufnahme für 218 sek mit 6,4 sek/Bild.

3.8.1.3. Die RV Partikelbewegungen in primären Zellen

Um den Transport der Viren in einem System zu untersuchen, welches der *in vivo* Situation näher kommt, wurden *Dorsal Root Ganglien* (DRG) benutzt. Dazu wurden die DRGs von Mäusen verwendet und in Kooperation mit Frank Bradke vom Max-Planck-Institut für Neurobiologie nach einem modifizierten Protokoll von Malin et al. (81) isoliert. Der Rückenbereich mit dem spinalen Rückenmarksstrang einer getöteten Maus wurde freigelegt. Die dorsalen Hauptganglien sind sehr kurz und befinden sich dicht an dem spinalen Rückenmarksstrang. Die Ganglien sind segmental angeordnet mit den Lumbalganglien L3 bis L5. Für die Isolierung der Zellen wurde der L3 Strang isoliert, in Medium überführt, die Zellen daraus freigesetzt und für 24 h in Medium inkubiert. Die Infektion der Zellen erfolgte mit den Viren SAD eGFP-P Gcvs oder SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP mit einer MOI von 1. Die RV Partikelbewegung wurde anschließend unter *Live cell* Bedingungen im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop untersucht. Es wurden die Laserfluoreszenzmikroskopeinstellungen verwendet, die auch zur Detektion der RV Partikeln in NS20Y Zellen verwendet wurden. Auch die Auswertung der Bilder erfolgte wie in Kapitel 3.8.1.2. beschrieben. Es wurden alle in Kapitel 3.8.1.2. beschriebenen Partikelbewegungen auch bei Verwendung der DRGs detektiert. Gut konnte die Membranbindung, die Taumelbewegungen der Partikel innerhalb der axonalen Ausläufer und die Transportbewegungen (Abb. 20A und B) beobachtet werden. Aufgrund der starken Vernetzung der axonalen Ausläufer konnte jedoch keine Transportrichtung mehr bestimmt werden. Insgesamt eignen sich die DRGs sehr gut zur Beobachtung und Analyse der Transportmechanismen der Tollwutviren und können in weiteren Experimenten verwendet werden.

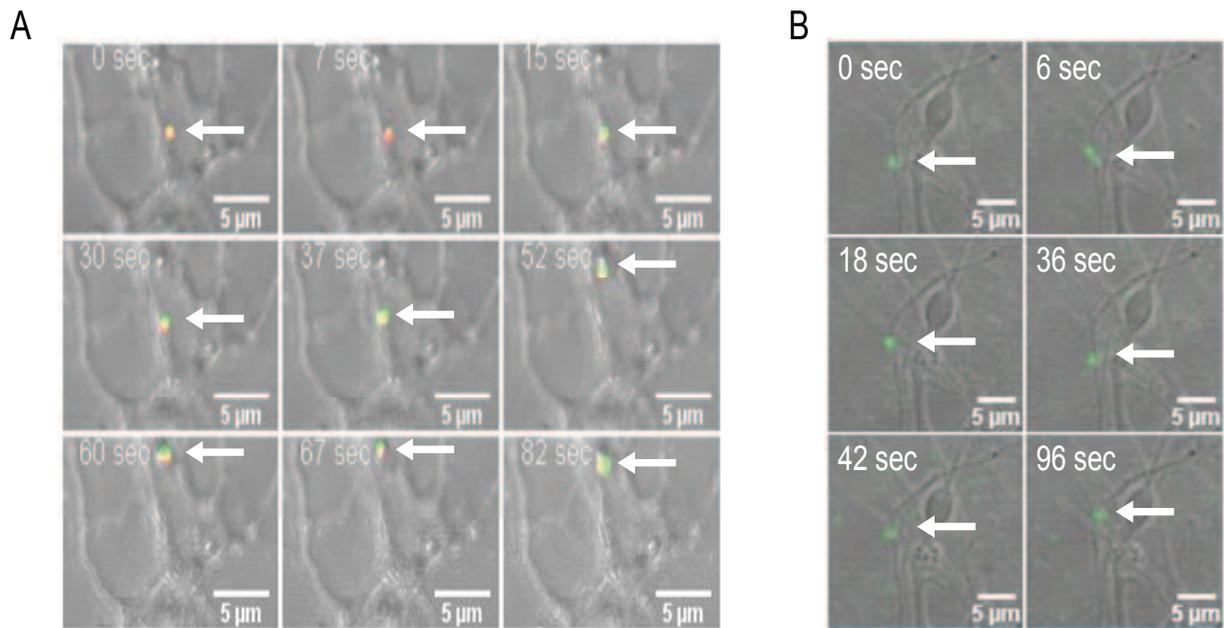


Abb. 18: RV Partikelbewegungen in DRGs

Die isolierten DRGs wurden mit den Viren SAD eGFP-P Gcvs und SAD eGFP-P Gcvs tm-RFP infiziert (MOI=1) und nach der Infektion im *Live imaging* Ansatz im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert. (A) Transport der zweifarbigen Viren entlang der axonalen Ausläufer. (B) Partikelbewegungen der grünen, RNP-markierten Viren innerhalb der Ausläufer. Die konfokalen Laserfluoreszenzbilder wurden mit nicht-konfokalen DIC unterlegt. In A erfolgte die Bildaufnahme für 82 sek mit 7,0 sek/Bild und in B mit 6,0 sek/Bild über einen Zeitraum von 96 sek. Der Skalierungsbalken repräsentiert jeweils 5 µm.

3.9. Das PrP^C-Fusionsprotein

Die Pseudotypisierung mit natürlichen und artifiziellen, fluoreszierenden Typ I Membranproteinen war erfolgreich und erlaubt nun das Studium dieser Viren.

Um die Möglichkeit der Inkorporation eines neuronalen Glykoproteins, welches normalerweise einen GPI-Anker besitzt, zu untersuchen, wurde das murine PrP^C gewählt. Murines PrP^C besteht aus 231 AS, einschließlich des 23 AS langen Signalpeptides für den Transport in das ER. Im ER wird das PrP^C posttranslational modifiziert. Das N-terminale Signalpeptid und ein Teil des C-Terminus werden abgespalten und der GPI-Anker inkorporiert. Zudem werden an den Positionen Asn181 und/oder Asn197 Oligosaccharideketten angefügt, so dass PrP^C in unglykosylierter, monoglykosylierter und diglykosylierter Form vorliegen kann (155).

Zur Konstruktion von Pseudotypviren, welche ein PrP^C-Fusionsprotein in die Virushülle inkorporiert haben, wurde ein G und M deletiertes Tollwutvirus verwendet. Um PrP^C in der Virushülle zu verankern, wurde ein PrP^C-Fusionsprotein aus murinem *wt* PrP^C (155), einschließlich des authentischen Signalpeptides von PrP^C und RVG-Anker hergestellt (Kapitel 2.3.). Der verwendete RVG-Anker (AS 415 bis 524) besitzt im Vergleich zu dem RVG-Anker, der zur Herstellung von tm-RFP verwendet wurde, lediglich eine um 5 AS verkürzte Ektodomäne (Kapitel 2.2. und Kapitel 2.3.). Eine Alternative stellte der sogenannte BDV-Anker dar. Gunther Walliser konnte in seiner Arbeit zeigen, dass ein BDV-Anker die Inkorporation von Fremdproteinen in die Virushülle ebenfalls unterstützt (G. Walliser, unveröffentlicht). Der in dieser Arbeit verwendete BDV-Anker (Kapitel 2.3.) besteht aus 39 AS der Ektodomäne (AS 429 bis 468) und der Transmembrandomäne (AS 463 bis 485) des BDV Glykoproteins (119), fusioniert an die zytoplasmatische Domäne (AS 481 bis 524) des RV G (17). Manche der Fusionsproteine enthielten zudem zusätzliche Antikörperepitope (3f4 und/oder Flag23) oder besaßen zwei Kopien der *wt* PrP^C-Sequenz, getrennt durch eine Linkersequenz. Daneben wurde ein verkürztes PrP^C-Konstrukt mit einer Deletion der AS 25 bis 120 des *wt* PrP^C analysiert.

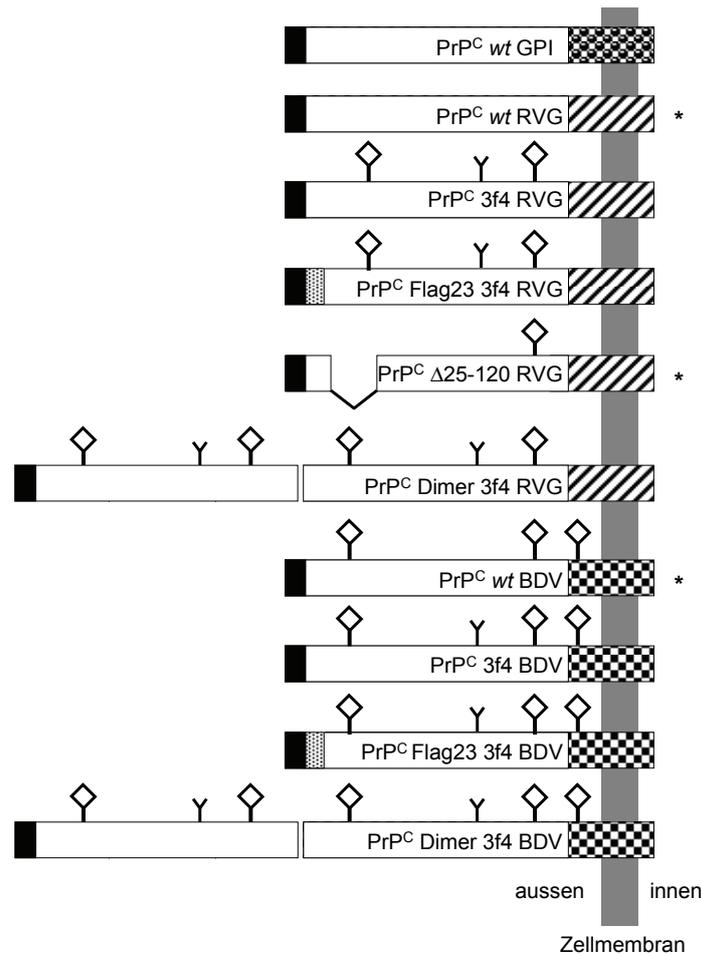


Abb. 19: Schematische Darstellung der PrP^C-Fusionskonstrukte

Um das murine *wt* PrP^C (oberstes Konstrukt) mit GPI-Anker (Kasten mit schwarzen Kugeln) in die Virushülle inkorporieren zu können, wurde die murine *wt* PrP^C Sequenz einschließlich des N-terminalem Signalpeptides an den RVG-Anker, welcher die hydrophobe Transmembrandomäne (tm) und den Membran-proximal gelegenen Teil der RV G Ektodomäne umfasst (schwarz schattierter Kasten), fusioniert. Alternativ wurde anstelle des RVG-Ankers ein BDV-Anker, bestehend aus der Ektodomäne und der Transmembrandomäne des BDV G und der zytoplasmatischen Domäne des RV G, verwendet (Schachbrettmuster). Folgende Sequenzen wurden in den Schemata extra hervorgehoben: Flag-Epitop (Gepunkteter Kasten), 3f4-Epitop (Y), Sequenzdeletion (V) und Glykosylierungsstelle (Karo). PrP^C *wt* RVG/ PrP^C *wt* BDV: *wt* PrP^C Protein, PrP^C 3f4 RVG/ PrP^C 3f4 BDV: mit 3f4-Epitop, PrP^C Flag23 3f4 RVG/ PrP^C Flag23 3f4 BDV: mit den Antikörperepitopen 3f4 und Flag23, PrP^C Dimer 3f4 RVG/ PrP^C Dimer 3f4 BDV: besitzen zwei Kopien von PrP^C, getrennt durch eine Linkersequenz, PrP^C Δ25-120 RVG: Deletion der PrP^C-AS 25 bis 120. Ergebnisse mit den mit Sternchen markierten PrP^C-Konstrukten sind im folgenden beschrieben.

3.9.1. PrP^C exprimierende, M- und G-defiziente Tollwutviren

Um PrP^C zusammen mit den RV Proteinen exprimieren zu können, wurden M und G-defiziente Viren konstruiert, welche die unterschiedlichen PrP^C-Varianten exprimieren. Dabei wurde der ORF der PrP^C Varianten anstelle des RV M ORFs eingebaut und das RV G Protein

gegen eGFP ausgetauscht. In SAD NP PrP^C wt BDV-Anker wurde das PrP^C Konstrukt mit murinem wt PrP^C und BDV-Anker verwendet. SAD NP PrP^C RVG Δ25-120 RVG exprimiert ein verkürztes PrP^C mit RVG-Anker. Die Viren mit den verschiedenen PrP^C Konstrukten konnten mit Hilfe der Zelllinie BSR 136MGon von der cDNA erzeugt werden.

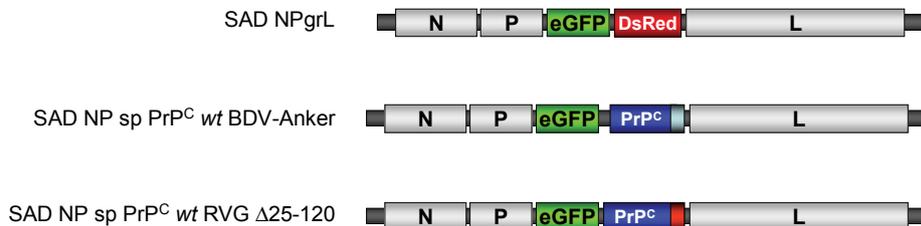


Abb. 20: Schematische Darstellung der PrP^C-exprimierenden, M- und G-defizienten Viren

Die verschiedenen PrP^C Varianten wurden anstelle des DsRed in die cDNA von SAD NP_{grL} kloniert.

3.9.2. Keine Inkorporation des verkürzten PrP^C mit RVG-Anker in G-defiziente RV Partikel

Neben tm-RFP als Transmembran-verankertes Oberflächenprotein, sollte auch die Inkorporation des neuronalen PrP^C-Glykoproteins, welches ursprünglich mit Hilfe eines GPI-Ankers in die Zellmembran verankert wird, in G-defiziente Tollwut Virionen untersucht werden. Wie bei der Inkorporation von tm-RFP wurde die RV-Deletionsmutante SAD ΔG (93) mit einer MOI von 1 eingesetzt und das verkürzte PrP^C-Konstrukt mit dem RVG-Anker (PrP^C Δ25-120 RVG) (Abb. 19, 5.Konstrukt von oben) verwendet. Jedoch wurde für die Transkomplementierung das PrP^C-Fusionsprotein von einem Expressionsplasmid mit T7 Promotor aus exprimiert. 5 µg des entsprechenden Expressionsplasmides wurden transfiziert und zur Verstärkung der Expression vom T7-Promotor wurden 3,5 h nach der Transfektion die Zellen zusätzlich noch mit dem T7-Promotor exprimierenden Stamm MVA-T7 bzw. vTF7-3 des Vaccinia Viruses infiziert (MOI=3). 48 h nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand der infizierten Zellen gesammelt und die im Zellkulturüberstand vorhandenen Viren mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt und aufkonzentriert. Eine Analyse der Gradientenfraktionen erfolgte mittels Western Blot (Abb. 21). Mit verschiedenen Antikörpern, welche RV N-, P-, M- und PrP^C erkennen, konnten die Proteine im Western Blot detektiert werden. Die viralen Proteine RV N und M konnten in den Fraktionen 2 bis 5 und 8 bis 10 des Gradienten detektiert werden (Abb. 21). Bei Betrachtung der Proteine N und P wurden zwei Viruspeaks mit sehr hohem Proteingehalt gefunden. Der erste Peak befand sich in Fraktion 4, in der auch der höchste Gehalt an Matrixprotein

Ergebnisse

detektiert werden konnte. Der zweite Peak konnte in Fraktion 9 detektiert werden. In dieser Fraktion war jedoch kein Matrixprotein nachweisbar. In der Fraktion 4 befanden sich die intakten, umhüllten Viruspartikel, während in Fraktion 9 die nackten RNPs detektiert werden konnten. Das PrP^C-Fusionsprotein zeigte eine andere Verteilung im Gradienten. Es konnte in den Fraktionen 1 bis 4 in seiner nichtglykosylierten (25 kDa), monoglykosylierten und diglykosylierten Form nachgewiesen werden. Nur eine geringe Menge an PrP^C-Fusionsprotein wurde in denselben Fraktionen wie die Virionen nachgewiesen. Das PrP^C-Fusionsprotein kam hauptsächlich in Membran-umhüllten Vesikeln der Fraktionen 1 bis 3 vor.

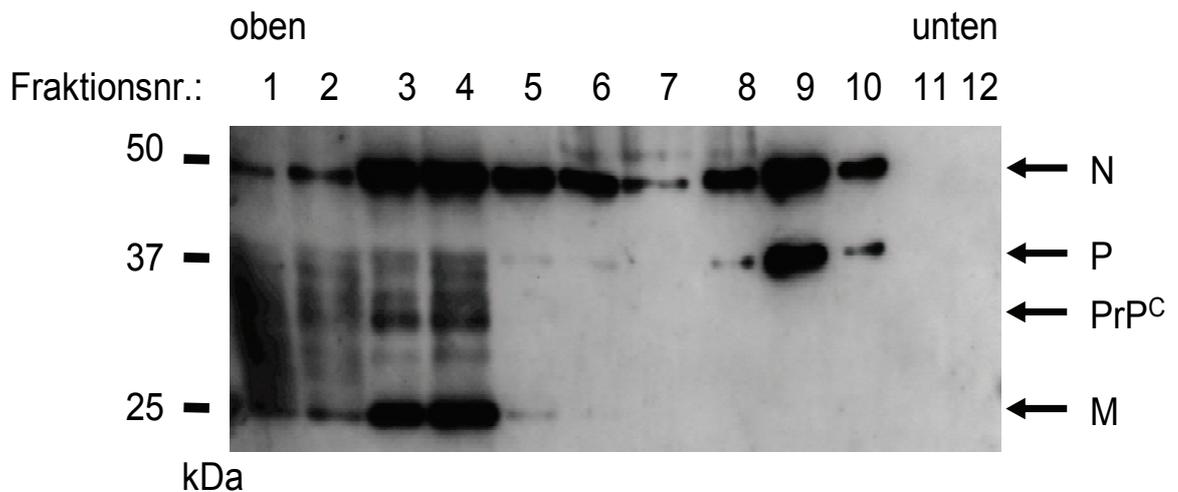


Abb. 21: Das verkürzte PrP^C mit RVG-Anker wird nicht in G-defiziente Viruspartikel inkorporiert

BSR T7/5 Zellen wurden mit SAD Δ G infiziert und 24 h später mit dem PrP^C-Fusionsprotein PrP^C Δ 25-120 RVG exprimierenden Vektor transfiziert und die Expression vom T7-Promotor durch die Infektion mit dem T7-Promotor exprimierenden Vaccinia Virus Stamm MVA-T7 bzw. vTF7-3 verstärkt. 48 h nach der Transfektion wurden die Viruspartikel mit der Dichtegradienten-Zentrifugation aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und die Proteinzusammensetzung der Virionen im Western Blot analysiert. Die RV Proteine wurden mittels RV N-, P-, und M-spezifischer Antikörper detektiert. PrP^C wurde mit einem Prion-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Während die RV Proteine sich in den Fraktionen mit intakten Virionen oder nackten RNPs befinden, konnte das PrP^C-Fusionsprotein hauptsächlich in Membran-umhüllten Vesikeln der Fraktionen 1 bis 3 detektiert werden.

3.9.3. Die Verwendung verschiedener Komplementierungssysteme und Bedingungen führten zu keiner Inkorporation von PrP^C in RV Partikel

Im Gegensatz zu den Glykoproteinen der verschiedenen Lyssaviren, dem EnvARGCD-Fusionsprotein und tm-RFP konnte eine Inkorporation des PrP^C in die G-defizienten Viruspartikel trotz RVG-Anker nicht nachgewiesen werden. Um die Inkorporation von PrP^C

in G-defiziente oder *wt* RV Partikel zu ermöglichen, wurden verschiedene weitere Komplementierungssysteme und Bedingungen ausgetestet.

Die Verwendung von nicht-glykosyliertem PrP^C

Da das PrP^C in der Zelle posttranslational glykosyliert wird, wurde in einem weiteren Versuch getestet, ob diese Glykosylierung für die Hemmung der Inkorporation des PrP^C in die RV Partikel verantwortlich ist. Dazu wurde die *in vivo* Glykosylierung in den verwendeten BSR T7/5 Zellen durch die Zugabe von Tunicamycin (15 µg/ml) zum Zellkulturmedium blockiert und der Versuch wie in Kapitel 3.9.2. beschrieben durchgeführt (Abb. 22A).

Die SAD ΔG-Infektion einer PrP^C exprimierenden BSR Teton Zelllinie mit und ohne zusätzlicher RVG- oder BDV-Anker Expression

Für eine effizientere Expression und eine eventuell verbesserte Inkorporation des PrP^C zu erreichen, wurden eine BSR Teton Zelllinie, welche das *wt* PrP^C mit RVG-Anker Doxycyclin-abhängig exprimiert (532-136), hergestellt (nicht gezeigt) und mit einer MOI von 1 mit SAD ΔG infiziert. Um zu versuchen, das chimäre PrP^C mit Hilfe von zusätzlichen Membranankern in die RV-Hülle zu inkorporieren, wurden in einem weiteren Versuch die PrP^C-exprimierenden Zellen mit SAD ΔG (MOI=3) und einem RVG-Anker-exprimierenden Virus (SAD NP-eGFP-Gan-L), einem BDV-Anker-exprimierenden Virus (SAD NP-eGFP-BDVan-L) (jeweils MOI=1) oder SAD L16 infiziert. 48 h (bei den Zweifach-Infektionen) bzw. 72 h nach Infektion wurde die Expression des PrP^C-Fusionsproteins durch Doxycyclinzugabe (10 µg/ml) induziert. 48 h nach der Doxycyclininduktion wurde der Zellkulturüberstand der infizierten Zellen geerntet, abzentrifugiert, aliquotiert und bei -70 °C gelagert (1.Ernte). 48 h nach der Zugabe des neuen, serumfreien Mediums mit Doxycyclin wurde zum zweiten Mal der Zellkulturüberstand der infizierten Zellen abgenommen, abzentrifugiert, portioniert und bei -70 °C gelagert (2.Ernte).

Die Infektion von RV M und G produzierenden Zellen mit PrP^C exprimierenden Viren

Auch eine Infektion einer BSR Teton Zelllinie, welche das RV M und RV G Doxycyclin-abhängig exprimiert (BSR 136MGon), mit den PrP^C-exprimierenden Viren SAD NP PrP^C *wt* BDV und SAD NP PrP^C Δ25-120 RVG oder SAD ΔG (Positivkontrolle) mit einer MOI von 1 wurde getestet. Die infizierten Zellen wurden zunächst einmal gesplittet und 24 h später die Produktion von RV M und G durch Doxycyclinzugabe induziert. 24 h nach der Doxycyclininduktion wurde der Zellkulturüberstand der mit SAD ΔG infizierten BSR

136MGon Zellen geerntet. Die mit den PrP^C Viren infizierten BSR 136MGon Zellen wurden zunächst erneut gesplittet, 24 h später mit Doxycyclin induziert und 48 h nach der Induktion erfolgte die 1. Ernte. Der 1. Ernte folgte 48 h nach der Zugabe des neuen, serumfreien Mediums mit Doxycyclin noch eine weitere Ernte. Die jeweils zusammengehörigen Ernten wurden vereinigt.

Die im Zellkulturüberstand vorhandenen Viren aller Ansätze wurden mittels Zentrifugation durch eine Millipore Säule aufkonzentriert und danach mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt und aufkonzentriert. Die infizierten Zellen wurden einmal mit 1 x PBS gewaschen, mit 1 x PBS/EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst, durch Zentrifugation pelletiert und anschließend in Lysepuffer aufgenommen.

Die Analyse der Gradientenfractionen und der Zellysate erfolgte mittels Western Blot. Mit Antikörpern, welche RV N, P, M, G und das PrP^C-Fusionsprotein erkennen, konnten die Proteine detektiert werden. Die Komplementierung von SAD Δ G auf den RV G exprimierenden Zellen (Positivkontrolle) (Abb. 22B, oberer Blot) zeigte für die Proteine RV G und M eine normale Proteinverteilung im Gradienten mit einem Proteinpeak in den Fraktionen 3 und 4. Die RV Proteine N und P konnten zwar in allen Fraktionen nachgewiesen werden, zeigten jedoch deutliche Proteinpeaks in den Fraktionen 2 bis 5 und 8 bis 10. Der erste Proteinpeak bei Fraktion 3 stellte die intakten, umhüllten Virionen dar, während sich im zweiten Proteinpeak (Fraktion 9) die nackten RNPs befanden. Die Blockade der *in vivo* Glykosylierung des PrP^C durch Tunicamycin führte zur Bildung des 25 kDa grossen, unglykosylierten PrP^C, welches nicht nur in den Fraktionen 1 bis 4, sondern nun auch in den Fraktionen 5 bis 9 nachgewiesen werden konnte (Abb. 22A).

In allen Ansätzen, in denen PrP^C vorhanden war (Abb. 22), wurde eine sehr ungewöhnliche Verteilung der RV Proteine N und P gefunden. Sie konnten in allen Fraktionen nachgewiesen werden. Nur das RV M Protein zeigte zumindest einen Proteinpeak in den Fraktionen 3 und 4. Die Betrachtung der Verteilung des RV M Proteins lässt vermuten, dass sich in der Fraktion 3 und 4 die kompletten Viruspartikel zu befinden, während der Anteil an nackten RNPs (Fraktion 9 bis 11) sehr hoch zu sein scheint. Das PrP^C-Fusionsprotein konnte ebenfalls in den meisten Fraktionen nachgewiesen werden. Es zeigte jedoch den höchsten Proteingehalt in den Fraktionen 1 bis 4, in denen auch RV G gefunden wurde. Das PrP^C-Fusionsprotein selbst kommt, wie schon in Kapitel 3.9.2. beschrieben, hauptsächlich in Membran-umhüllten Vesikeln der Fraktionen 1 bis 3 vor. Die Anwesenheit des PrP^C-Fusionsproteins verhinderte in allen Experimenten die effiziente Bildung intakter, umhüllter Viruspartikel. Stattdessen

konnte die stark erhöhte Entstehung von nackten RNPs detektiert werden. Weder die Verwendung von deglykosyliertem PrP^C (Abb. 22A), noch die SAD Δ G-Infektion der PrP^C-exprimierenden Zellen (532-136) alleine (Abb. 22B) oder mit der zusätzlichen Expression des BDV- oder des RVG-Ankers (Abb. 22C), die Infektion PrP^C-exprimierender Zellen mit *wt* RV SAD L16 (Abb. 22C) oder die Infektion RV M und G produzierender Zellen (BSR 136MGon) mit PrP^C exprimierenden Viren (Abb. 22D) führte zu einer guten Inkorporation des PrP^C in die RV Partikel. Bei dem verkürzten und deglykosylierten PrP^C-Konstrukt (Abb. 22A) konnte in sehr geringem Ausmaße eine Inkorporation von PrP^C in Tollwutviruspartikel beobachtet werden. In allen anderen Ansätzen konnte PrP^C nur in Membran-umhüllten Vesikeln vorgefunden werden. Zudem führte die Anwesenheit von PrP^C gleichgültig in welchem Kontext immer zur Hemmung der Bildung von intakten, umhüllten RV Virionen.

Ergebnisse

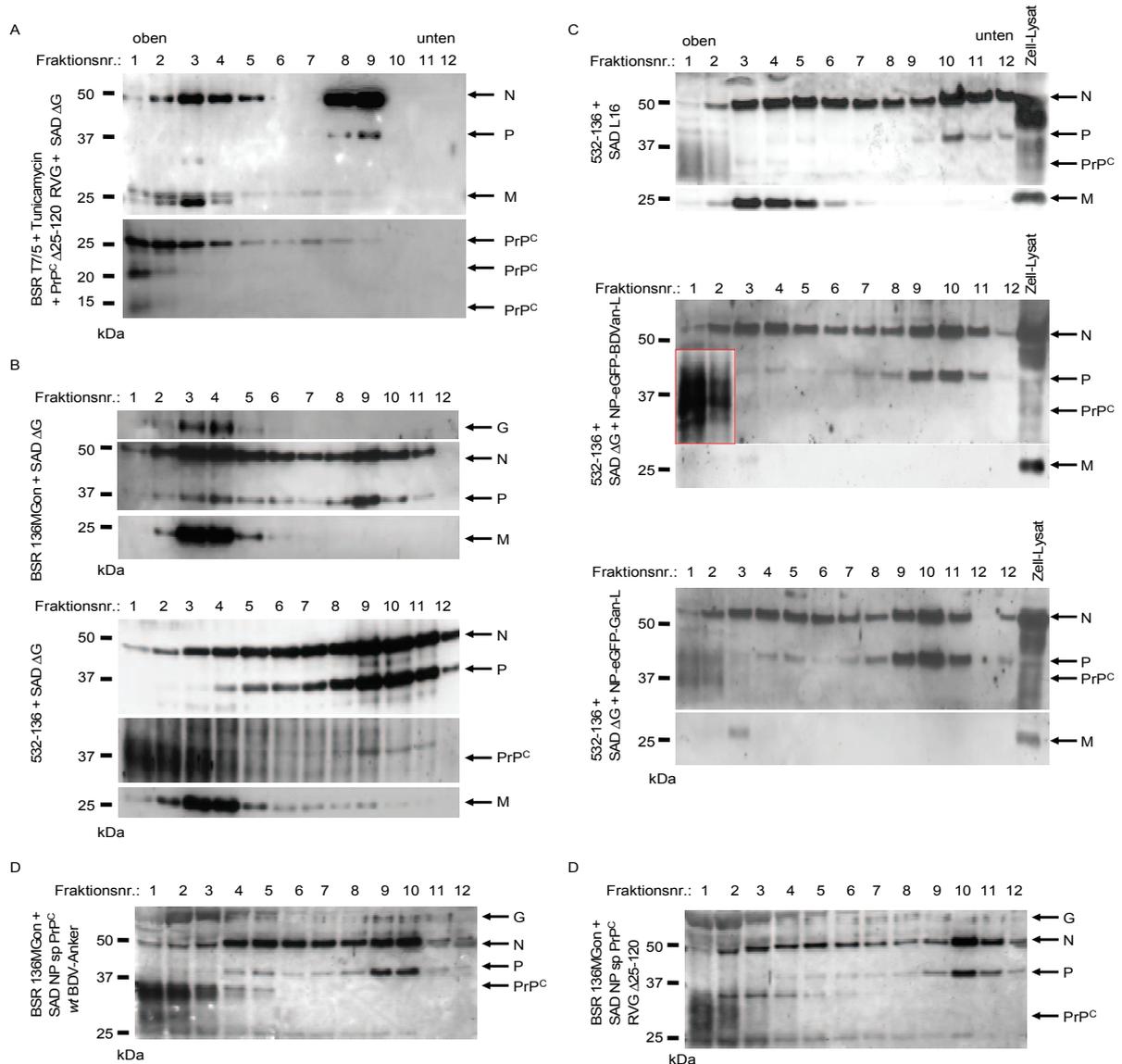


Abb. 22: PrP^C hemmt die Bildung von intakten, umhüllten RV Partikeln

(A) BSR T7/5 Zellen wurden mit dem PrP^C-Expressionsplasmid transfiziert, die *in vivo* Glykosylierung durch Zugabe von Tunicamycin gehemmt und mit SAD ΔG (MOI=1) und Vaccinia Virus MVA-T7 bzw. vTF7-3 (MOI=3) infiziert. (B) Die induzierbare Zelllinie 532-136, welche das PrP^C mit RV G Anker exprimiert und RV M und G-exprimierende, induzierbare Zellen (BSR 136MGon) wurden mit einer MOI von 1 mit SAD ΔG infiziert und die Proteinproduktion der Zellen durch Doxycyclin induziert. (C) 532-136, Zellen wurden mit SAD ΔG (MOI=1) und mit RVG-Anker oder BDV-Anker exprimierenden Tollwutviren (SAD NP-eGFP-Gan-L und SAD NP-eGFP-BDVan-L) mit einer MOI von 1 infiziert und die PrP^C Produktion durch Doxycyclin induziert (D) BSR 136MGon Zellen wurden mit den PrP^C-exprimierenden Viren (SAD NP PrP^C wt BDV und SAD NP PrP^C Δ25-120 RVG) (MOI=1) infiziert und die Proteinproduktion der Zellen mit Doxycyclin induziert. Die Virusüberstände aller Ansätze wurden über Millipore Säulen und Dichtegradienten-Zentrifugation aufkonzentriert und die Gradientenfractionen mittels Western Blot analysiert. PrP^C wurde nicht in die RV Partikel inkorporiert, sondern konnte in Membran-umhüllten Vesikeln detektiert werden. Zudem führte die PrP^C-Expression es zu einer Blockade der RV Virionen Formation.

3.9.4. PrP^C und RV G zeigten eine ähnliche Verteilung innerhalb der Zelle

Um eine Erklärung für die fehlende Inkorporation zu finden, wurde die Lokalisation der Proteine PrP^C und RV G im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert. Dazu wurden entweder BSR 136MGon Zellen mit den unterschiedlichen PrP^C-exprimierenden Viren (SAD NP PrP^C *wt* BDV bzw. SAD NP PrP^C Δ 25-120 RVG) mit einer MOI von 1 infiziert und die Zellen mit Doxycyclin zur Expression von RV G und RV M angeregt. Die Zellen wurden 24 h nach Doxycyclininduktion mit PFA fixiert, und permeabilisiert. Zur Bestimmung der Lokalisation von RV G und den verschiedenen PrP^C-Fusionsproteinen (PrP^C *wt* BDV bzw. PrP^C Δ 25-120 RVG) wurden die infizierten Zellen mit Primärantikörpern gegen RV G (Maus α G) und PrP^C (Kaninchen A7) oder mit der Primärantikörperkombination α G/A7 mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Die verwendeten Sekundärantikörper besaßen eine Cy5 (*mouse* Cy5) und eine Cy3 (*rabbit* Cy3)-Markierung. Infizierte Zellen wurden zusätzlich anhand der eGFP-Expression vom Virusgenom detektiert. RV G wurde in die Zellmembran inkorporiert gefunden (Abb. 23, bei beiden Bildern A, C, E, 2. und 4. Spalte). Das PrP^C-Fusionsprotein konnte in der Einzelfärbung innerhalb der Zelle im Zytoplasma und, stark konzentriert, im ER gefunden werden (Abb. 23, bei beiden Bildern D und E, 3. und 4. Spalte). Ein geringer Teil des Proteins wurde auch an der Zellmembran detektiert und zwar in deutlich geringerer Menge als RV G (Abb. 23, bei beiden Bildern E, 4. Spalte). Die Analyse der Lokalisation von RV G und PrP^C-Fusionsprotein ergab, dass RV G und PrP^C ähnliche Bereiche in der Zellmembran einnehmen können, jedoch gab es auch Zellmembranabschnitte, in denen nur PrP^C oder RV G detektiert werden konnten.

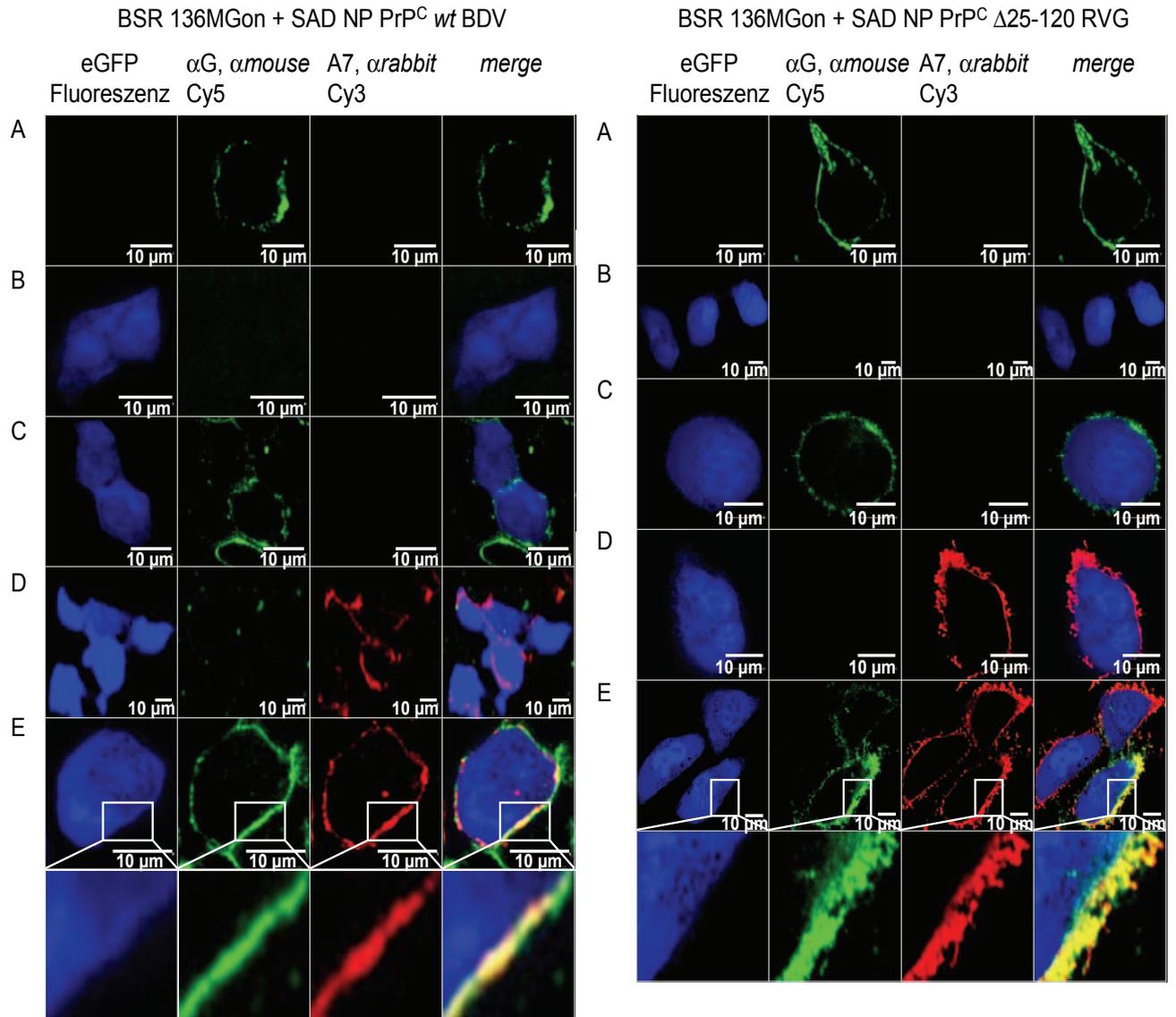


Abb. 23: PrP^C und RV G zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster in infizierten BSR 136MGon Zellen

Nach Infektion der BSR 136MGon Zellen und Doxycyclininduktion wurden PrP^C und eGFP vom Virusgenom und RV G von der Wirtszelle exprimiert. 48 h nach der Doxycyclininduktion wurden die Zellen mit PFA fixiert, permeabilisiert und RV G und PrP^C mit entsprechenden Antikörpern mittels indirekter Immunfärbung detektiert. (A) Nach Doxycyclininduktion konnte RV G, jedoch weder PrP^C noch eine eGFP Autofluoreszenz nachgewiesen werden. (B) Die Infektion mit den entsprechenden Viren führte zu einer guten eGFP-Expression vom Virusgenom (blau). (C) Die Antikörperdetektion von RV G zeigte auch in Virus-infizierten Zellen keine Kreuzreaktion mit PrP^C. (D) Der PrP^C Antikörper bindet nur spezifisch an PrP^C. (E) RV G und PrP^C zeigten eine ähnliche Verteilung innerhalb der Zelle. Der Skalierungsbalken präsentiert 10 µm.

3.9.5. Keine Kollokalisierung von PrP^C und RV M innerhalb der Zelle

Die Lokalisation der Proteine PrP^C und RV M wurde ebenfalls im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 24). Die PrP^C-exprimierenden Zellen 532-136 wurden mit *wt* SAD L16 (MOI=1) infiziert, die PrP^C-Produktion mit Doxycyclin induziert und die Zellen mit PFA fixiert und permeabilisiert. Zur Anfärbung von RV G wurden die in Kapitel 3.9.4. verwendeten Primärantikörper benutzt. Zur Detektion von PrP^C wurde der murine Primärantikörper 4H11 verwendet. RV M wurde mit dem Primärantikörper Kaninchen M2D4 nachgewiesen. Für die Zweifachfärbungen wurden die Primärantikörperkombinationen M2D4/4H11 und E559/M2D4 eingesetzt. Es wurden α rabbit Alexa488 und α mouse Alexa633-konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Die Einzelfärbungen von RV M und G zeigten die typische Verteilung der beiden Proteine (Abb. 24, linkes Bild). RV G konnte an der Zellmembran und RV M direkt unterhalb der Bereiche der Zellmembran, an denen auch das RV G Protein in die Zellmembran inkorporiert gefunden wurde und auch im Zytoplasma der Zelle detektiert werden (Abb. 24A-D). Die Lokalisation von PrP^C und RV G bei der gleichzeitigen Färbung beider Proteine wurde schon in Kapitel 3.9.4., Abb. 23 beschrieben. Die Zweifachfärbung von RV M und PrP^C-Fusionsprotein ergab, das PrP^C-Fusionsprotein und RV M nur in Einstülpungen im Zytoplasma infizierter Zellen gemeinsam vorkommen (Abb. 24H). Damit konnte keine Lokalisation von RV M und PrP^C-Fusionsprotein an gleichen Bereichen der Zellmembran detektiert werden (Abb. 24G). Da RV M eine entscheidende Rolle bei der Inkorporation von Fremdproteinen in die RV Virionen spielt und keine Lokalisation von RV M und PrP^C-Fusionsprotein an der gleichen Region der Zellmembran beobachtet werden konnte, erklärt dies die Tatsache, dass PrP^C nicht in die Virushülle der RV Partikel inkorporiert wurde (Kapitel 3.9.2., Abb. 21 und 3.9.3., Abb. 22).

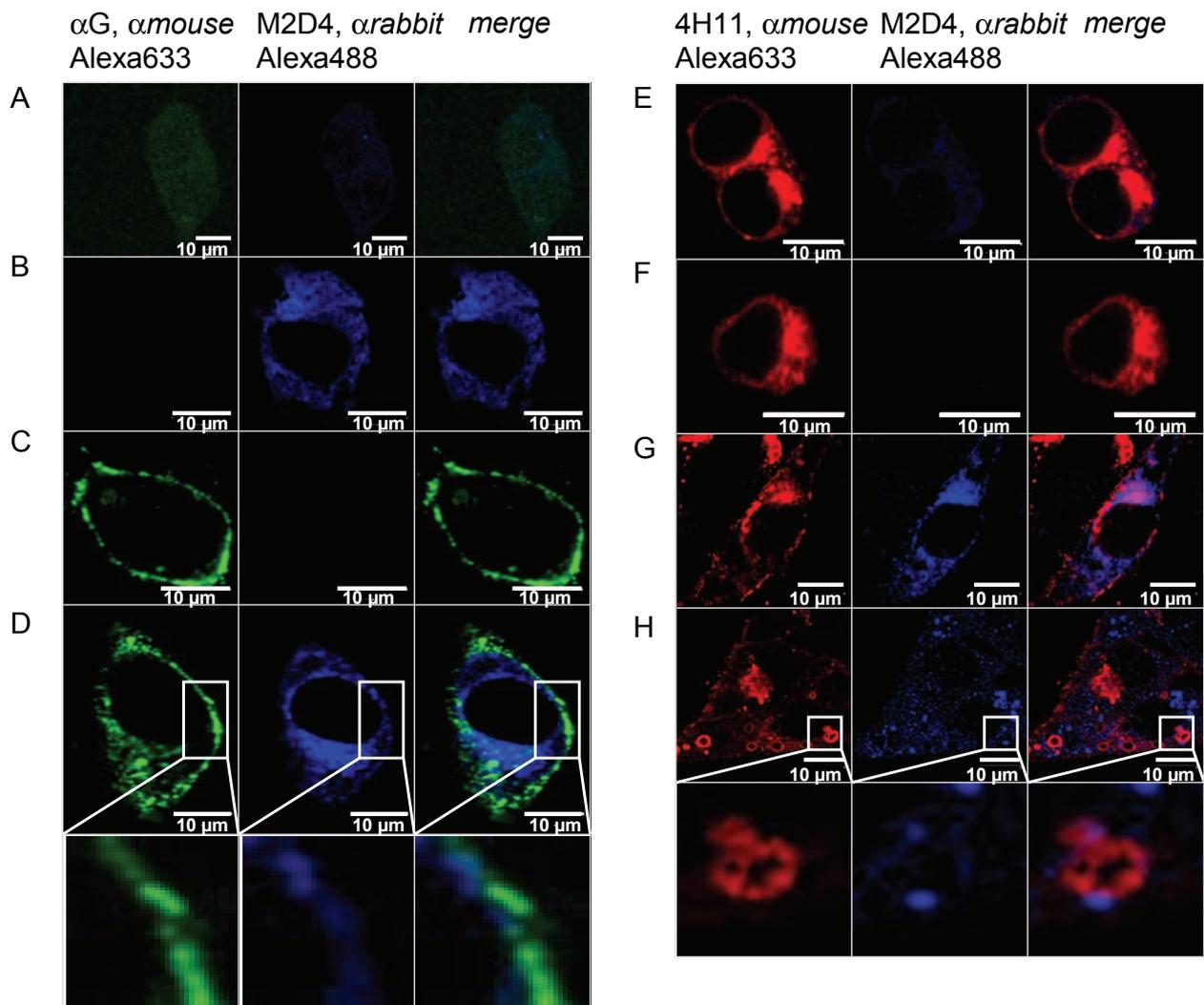


Abb. 24: Lokalisation von PrP^C und RV M in virus-infizierten 532-136 Zellen

Nach Infektion der 532-136 Zellen und Doxycyclininduktion wurden RV G und M vom Virusgenom und PrP^C von der Wirtszelle exprimiert. Die Zellen wurden mit PFA fixiert, permeabilisiert und RV G, M und PrP^C mit entsprechenden Antikörpern mittels indirekter Immunfärbung detektiert. (A) In nicht-infizierten Zellen konnten keine RV Proteine nachgewiesen werden. (B) Nach Infektion mit *wt* SAD L16 konnte RV M in den Zellen detektiert werden. (C) In Virus-infizierten Zellen ist eine gute RV G Expression zu beobachten. Bei (B) und (C) kommt es zu keiner Kreuzreaktion mit dem jeweils anderen RV Protein. (D) RV M wurde unterhalb der Zellmembranbereiche detektiert, an denen auch in die Zellmembran inkorporiertes RV G nachgewiesen wurde. (E) Eine basale Aktivität des Promotors konnte auch ohne Doxycyclininduktion festgestellt werden. (F) Die Antikörperbindung erfolgte spezifisch an PrP^C ohne Kreuzreaktion mit RV M. (G) RV M und PrP^C zeigten keine Kolokalisation an der Zellmembran. (H) Nur in Einstülpungen im Zytoplasma konnte eine Kolokalisation von RV M und PrP^C detektiert werden. Der Skalierungsbalken präsentiert 10 μ m.

4. Diskussion

Neben den Retroviren erlauben die *Mononegavirales* den Austausch der viralen Oberflächenproteine und die Herstellung von Pseudotyp-Partikeln. Die Möglichkeit des sogenannten *Envelope-switching* kann in vielfältiger Weise ausgenutzt werden. Pseudotypisierte Viren können zur Untersuchung der Funktion der inkorporierten Proteine verwendet werden. So können z.B. Protein-Rezeptor-Interaktionen studiert werden. Ebenso kann durch die Verwendung der Glykoproteine verschiedener Tollwutvirusstämme der Einfluß des Tollwutglykoproteins selbst auf die Pathogenität und den Virustransport der verschiedenen Virusstämme untersucht werden. Die Möglichkeit, Fremdproteine in Tollwutviren zu inkorporieren, ermöglicht auch die Markierung der Tollwutvirionen selber. So können mit Hilfe der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie und der Methode des *live cell imaging* alle wichtigen Stationen im Lebenszyklus der Tollwutviren wie Virus-Zell-Interaktionen, der *Uncoating*- und der *Assembly*-Prozess usw. innerhalb lebender Zellen analysiert werden. Durch den Austausch des Tollwutglykoproteins gegen ein anderes Glykoprotein kann natürlich auch z.B. der Tropismus der mit den Tollwutviren verwandten Lyssaviren untersucht werden. Auch eine Spezialisierung der pseudotypisierten Virionen auf nur bestimmte Zellen oder Zelltypen kann ermöglicht werden, wenn anstelle des Tollwutvirus Glykoproteins ein Oberflächenprotein verwendet wird, dessen Rezeptor nur auf ganz bestimmten Zellen oder Zelltypen vorkommt. So kann eine Beschränkung der Tollwutvirusinfektion durch Verwendung des EnvA Proteins, dessen Rezeptor TVA nur auf Vogelzellen vorkommt, nur auf Vogelzellen oder auf Zellen, welche den Rezeptor exprimieren, erfolgen. Die Beschränkung der Virusinfektion nur auf bestimmte Zellen kann verwendet werden, um neuronale Netzwerke und Verbindungen in Säugetierzellen zu analysieren, in denen, einzelne, bestimmte Zellen den TVA Rezeptor von einem Expressionsplasmid aus exprimieren und nur diese direkt infiziert werden können. Werden dann noch weitere Zellen infiziert, kann die Fortschreitung der Infektion nur durch transsynaptischen Transport der Tollwutviren erfolgt sein und entsprechend müssen diese Zellen direkt mit einander vernetzt sein (neuronales *Tracing*).

4.1. Inkorporation von Fremdproteinen in RV Virionen

Innerhalb der *Mononegavirales* sind die Rhabdoviren bezüglich Pseudotypbildung und Inkorporation von heterologen Proteinen am besten untersucht. Im Gegensatz zu VSV, in denen die Inkorporation von Fremdproteinen sehr unspezifisch erfolgt, müssen für RV

definierte strukturelle Voraussetzungen erfüllt sein. RV Virionen entstehen durch den *Budding*-Prozess an der Zellmembran. Dafür ist die Anwesenheit von Glykoproteinen nicht unbedingt erforderlich (93, 123); diese führen aber zu einer höheren Partikelanzahl im Überstand. RV G kann gegen ein anderes Glyko- oder auch Transmembranprotein ausgetauscht werden. Der Einbau von Glykoproteinen erfolgt durch eine spezifische Interaktion der zytoplasmatischen Domäne des Glykoproteins mit dem Matrixprotein. Nur Proteine, die an der Zelloberfläche präsent sind, können in Virionen eingebaut werden. Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.3.) beschrieben, stellt die Anwesenheit einer vom RV G abgeleiteten zytoplasmatischen Domäne die minimale Voraussetzung für die Inkorporation von Proteinen in RV Partikel dar. Da in Abwesenheit des authentischen RV G Proteins das inkorporierte Protein den Tropismus der komplementierten Virionen bestimmt, wurde der Mechanismus des *Re-targeting* benutzt, um den Tropismus anderer Lyssaviren wie Mokola, Lagos *Bat* und *Bat* Hamburg *in vitro* zu untersuchen. Wie bei den Tollwutviren bestimmt auch bei den anderen untersuchten Lyssaviren das Oberflächenglykoprotein den Tropismus. Die Titration der Viren auf den verschiedenen Zelllinien ergab, dass sich je nach inkorporiertem Lyssavirus Glykoprotein, die Permissivität für eine bestimmte Zelllinie änderte (Tab. 8). Hierbei zeigten die Glykoproteine der Lyssaviren Mokola, Lagos *Bat* und *Bat* Hamburg, aber auch Tollwutviren des Stammes CVS deutlich einen spezifischen Neurotropismus im Vergleich zum Glykoprotein des Tollwutvirus SAD, das durch die lange Anpassung an die Endothelialzellen der Zellkultur seinen Tropismus erweitern konnte, aber seinen neurotrophen Charakter teilweise verloren hat (Tab. 8). In Anlehnung an frühere, erfolgreiche Ansätze zum *Envelope-switching* und *Re-targeting* (42, 89, 92) wurden hier erstmals fluoreszierende Typ I Transmembranproteine hergestellt, welche während des *Budding*-Prozesses in ähnlicher Weise wie das authentische RV G Protein in die Virushülle inkorporiert wurde. Da frühere Arbeiten mit den Glykoproteinen von RV und VSV gezeigt hatten, dass ein kurzer Bereich des RV G Proteins ausreicht, um den Transport an die Zellmembran, die Assoziation mit der RV M Schicht und die Inkorporation in die Virushülle zu ermöglichen (120), wurden Fusionsproteine mit dem essentiellen RV G Bereich hergestellt (Abb. 4). Die chimären Fusionsproteine wurden in unterschiedlichen Expressionssystemen analysiert. Neben der Verwendung eines auf DNA-beruhenden Vektorsystems (CMV-Promotor) und eines auf Rhabdoviren basierendem Systems wurden zwei Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs (BSR T7/5 und NA Zellen) generiert, welche das tm-RFP Fusionsprotein konstitutiv exprimieren (Abb. 7A und B). Als Fremdprotein wurde das fluoreszierende Protein tdTomato verwendet und an die Membran-proximal gelegenen 49AS

der Ektodomäne, der Transmembrandomäne und des zytoplasmatischen Bereich des RV G Proteins fusioniert (Abb. 4). Die Analyse der tm-RFP Fusionsproteine, sowohl transient exprimiert, als auch im Viruskontext ergab, dass alle Fusionsproteine gut exprimiert (Kapitel 3.5.1., Abb. 6, Kapitel 3.5.2., Abb. 7C, Kapitel 3.5.3., Abb. 8 und Kapitel 3.6.2., Abb. 11) und an die Zelloberfläche transportiert wurden und zudem eine gute Kolokalisation mit RV G oder M detektiert werden konnte (Abb. 6, 8 und 11) (74). Bei Verwendung der tm-RFP exprimierenden Zelllinien konnte beobachtet werden, dass auch die verwendeten Zellen einen Einfluss auf den Oberflächentransport des tm-RFP hatte. So konnte in BSR T7/5 Zellen weniger tm-RFP an der Zelloberfläche detektiert und zudem ein vermehrter Rücktransport von tm-RFP von der Zelloberfläche ins Zytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 7C). Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Glykosylierungsstelle Asn319 den Transport des RV Glykoproteins an die Zelloberfläche unterstützt (135), konnte durch die Anwesenheit einer synthetischen N-Glykosylierungsstelle in dem Konstrukt tm-RFP(Asn) keine Verbesserung des Proteintransports von tm-RFP an die Zellmembran erzielt werden. Eine Verlängerung der RV G Ektodomäne bis hinter die Membran-proximal gelegene N-Glykosylierungsstelle (Asn319) des RV G Proteins in dem Proteinkonstrukt tm-RFP(Asn319), wurde überraschenderweise gar nicht an die Zellmembran transportiert (Abb. 6) (74). Diese Proteinvariante scheint inhibitorische Strukturen zu enthalten. Interessanterweise konnte ein ähnlicher, inhibitorischer Effekt auch bei der Herstellung eines chimären RV G Proteins für Immunisierungsexperimente beobachtet werden, welches für das anthraxschützende Antigen kodierte (141). Neben den einfarbigen Tollwutviren mit deletiertem (Kapitel 3.5.4., Abb. 9) oder authentischem RV G (Kapitel 3.6.1. bis 3.6.3., Abb. 10 bis 12) und tm-RFP markierter Virushülle wurden zweifarbige Viren hergestellt, welche neben der tm-RFP-markierten Virushülle ein eGFP-markiertes RNP besitzen (Kapitel 3.7., Abb. 13 und Kapitel 3.7.1., Abb. 14). In den einfarbigen und den zweifarbigen Viren wurde auch in Gegenwart von authentischem RV G eine ausreichende Menge an dem tm-RFP Fusionsprotein in die Virushülle einbaut. Jedoch variiert in den zweifarbigen Viruspartikeln die Menge an tm-RFP im Vergleich zu eGFP, welches von den eGFP-markierten RNPs stammt (Kapitel 3.7.1., Abb. 14) (74). Die unterschiedliche Inkorporation beider Fluoreszenzmarkierungen kann durch die zufällige Verteilung und Inkorporation von RV G und tm-RFP an der Zellmembran und an der limitierten Inkorporationskapazität für die Oberflächenproteine erklärt werden. Des Weiteren erfolgte die eGFP-Markierung an das essentielle RV P Protein (eGFP-P Fusionsprotein), welches vermutlich in genau definierter Anzahl in den RNP Komplex eingebaut wird und ohne das keine intakten Viruspartikel gebildet werden können. Dies zeigt

auch, dass im Gegensatz zu den Paramyxoviren, welche häufig mehrere RNPs in einem Virion besitzen (115), in die Rhabdovirionen nur ein einziges RNP verpackt wird. Die Inkorporation des zusätzlichen und nichtfunktionalen Oberflächenproteins tm-RFP in die Virushülle führte in den tm-RFP und RV G exprimierenden Viren im Vergleich zu *wt* RV zu einer 10fachen Reduktion der spezifischen Infektiösität der Virionen (Kapitel 3.6.3., Abb. 12) (74). Ursächlich dafür könnten mehrere Faktoren sein. Es könnte zu einer verringerten Menge an RV G Protein, zu einer Behinderung oder Blockierung der Bindung des RV G Proteins an seinen Rezeptor oder zur Beeinträchtigung der RV G Funktionen während Membranfusion und RNP Freisetzung kommen. Obgleich eine verringerte Rezeptorbindung der Virionen nicht ausgeschlossen werden kann, deutet die Beobachtung von zweifarbigen, Membran-assoziierten Viruspartikeln in endosomalen Vesikeln (Abb. 15) (74) darauf hin, dass der Schritt der Rezeptorbindung nicht schwerwiegend gestört sein kann. Eine andere Möglichkeit für die reduzierte Infektiösität stellt die Behinderung der Membranfusion dar. Eine bestimmte Anzahl an G Trimeren, vermutlich in einer genau definierten Anordnung, sind erforderlich, um eine Membranfusionspore zu formen (121). Sowohl die Anordnung, als auch die Konformationsänderungen der RV G Proteine in der Virushülle könnten durch die zusätzliche Anwesenheit der tm-RFP Proteine behindert werden. Ausserdem kann die Formation von heterotrimerischen Oberflächenkomplexen aus tm-RFP und RV G, welche nicht länger fähig sind die Konformationsänderungen, die für die pH-abhängige Membranfusion erforderlich sind, durchzuführen, nicht ausgeschlossen werden. Die nur sehr geringe Reduktion in der spezifischen Infektiösität deutet jedoch darauf hin, dass kein Schritt des RV Lebenszyklus schwerwiegend beeinflusst worden ist. Der für den *Budding*-Prozess benötigte essentielle Bereich der RV G Sequenz ist also in der verwendeten RV G Sequenz der tm-RFP Fusionsproteine enthalten. Mit der Inkorporation von tm-RFP und tm-RFP(Asn) alleine und zusammen mit RV G in Viruspartikel konnte gezeigt werden, dass das System dazu geeignet ist, Tollwutvirus Pseudotypen mit heterologen Oberflächenproteine zu studieren (74).

Die Inkorporation einer ganzen Reihe von unterschiedlichen Proteinen wie z.B. der HCV Glykoproteine (15, 139), das transmembrane HIV-Env Protein (89) oder der CD4/CXCR4-Komplex (92) (Kapitel 1.3., Abb. 2, Kapitel 1.4. und siehe oben) in die Virushülle von Tollwutvirionen führte zu der These, dass die Anwesenheit einer vom RV G abgeleiteten zytoplasmatischen Domäne für eine Inkorporation von Fremdproteinen in die Virushülle ausreicht. Diese Aussage kann ich in meiner Doktorarbeit nicht bestätigen. Neben den tm-RFP-Fusionsproteinen wurden PrP^C-Fusionsproteine aus murinem *wt* PrP^C und RVG- oder

Diskussion

BDV-Anker hergestellt. Der RVG-Anker des PrP^C-Fusionsproteins besitzt im Vergleich zum tm-RFP Fusionsprotein nur eine um 5 AS verkürzte Ektodomäne (Kapitel 2.2. und 2.3.). Für den BDV-Anker, der aus den 39 AS der Ektodomäne (AS 429 bis 468) und der Transmembrandomäne (AS 463 bis 485) des BDV Glykoproteins (119) und der zytoplasmatischen Domäne (AS 481 bis 524) des RV G (17) besteht, konnte Gunther Walliser in seiner Arbeit zeigen, dass ein BDV-Anker die Inkorporation von Fremdproteinen ebenfalls unterstützt (G. Walliser, unveröffentlicht). Die PrP^C-Fusionsproteine wurden in unterschiedlichen Expressionssystemen analysiert, einem auf T7-DNA-Polymerase basierenden System mit und ohne rekombinantem Vaccinia Virus vTF7-3 und einem auf Rhabdoviren basierenden Vektorsystem (Kapitel 3.9.2. bis 3.9.5. und Abb. 21 bis 24). Daneben wurden für zwei PrP^C-Fusionsproteine durch Doxycyclin-induzierbare Zelllinien hergestellt, die sich von den BSR Zellen ableiten (nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine gut exprimiert und auch an die Oberfläche transportiert wurden. Sowohl in transienten Versuchen als auch im Viruskontext konnte eine gute Kolokalisation mit RV G beobachtet werden (Kapitel 3.9.4., Abb. 23 und Kapitel 3.9.5., Abb. 24), jedoch wurden die PrP^C-Fusionsproteine im Gegensatz zu tm-RFP nicht nachweisbar in G-defiziente RV Partikel inkorporiert, sondern bildeten stattdessen Membran-umhüllte Partikel (Kapitel 3.9.2., Abb. 21, Kapitel 3.9.3, Abb. 22). Zudem schienen die PrP^C-Fusionsproteine in der Zellmembran den normalen *Budding*-Prozess der Tollwutvirionen zu behindern; anstelle intakter Virionen konnten sehr viele nackte RNPs, RV G-haltige und auch RV G- und PrP^C-Fusionsprotein-haltige Membran-Vesikel nachgewiesen werden (Kapitel 3.9.2., Abb. 21, und Kapitel 3.9.3, Abb. 22). Ein wichtiger Aspekt hierbei stellte die Beobachtung dar, dass das für den *Budding*-Prozess essentielle RV M nicht in den gleichen Zellmembranregionen nachgewiesen werden konnte, in denen sich auch das PrP^C-Fusionsprotein befand. Der Vergleich mit tm-RFP lässt vermuten, dass für die veränderte Lokalisation der PrP^C-Fusionskonstrukte die PrP^C-Ektodomäne und nicht die RV G Proteinabschnitte verantwortlich ist.

Der Ort des *Budding*-Prozesses verschiedener, umhüllter Viren ist schon beschrieben. So findet das *Virusbudding* des Tollwutvirus-verwandten VSV in polaren Zellen an basolateralen Membrandomänen statt, wohin auch die VSV Glyko- und Matrixproteine transportiert werden (Übersichtsartikel: (66, 66)). Der zytoplasmatische Bereich des VSV G scheint hierbei ein basolaterales Sortierungssignal zu kodieren (102). Bei VSV bestimmt die Lokalisation des Glykoproteins den Ort des *Virusbudding*; es gibt jedoch auch andere umhüllte Viren, bei denen andere Faktoren für den Ort des *Budding*-Prozesses verantwortlich sein müssen

(Übersichtsartikel: (66)). So ist beim Masernvirus das Matrixprotein für die Proteinsortierung und die apikale Freisetzung der Viruspartikel in Epithelzellen verantwortlich (66, 103). In der Plasmamembran sind die meisten viralen Glykoproteine in spezifischen Membrandomänen lokalisiert, welche durch bestimmte Lipid- und Proteinkombination gekennzeichnet sind. Eine der am besten untersuchten Mikrodomänen sind die Sphingolipid- und Cholesterolreichen Mikrodomänen, die sogenannten *Lipid rafts*. *Lipid rafts* sind durch geringe Löslichkeit in anionischen Detergenzien wie Triton X-100 bei 4 °C gekennzeichnet (12, 131). Eine ganze Reihe von Glykoproteinen verschiedener Viren wie Influenza (66, 130, 166), HIV (66, 105, 106) und Masernvirus (66, 82, 153) konnten in *Lipid rafts* nachgewiesen werden. VSV G hingegen wird sehr wahrscheinlich nicht in *Lipid rafts* inkorporiert (12, 66).

Aufgrund ihrer funktionellen Spezialisierung besitzen die basolateralen und apikalen Membrandomänen polarer Zellen unterschiedliche Protein- und Lipidzusammensetzungen. Die apikale Membrandomäne von polaren Epithelzellen ist mit *Lipid rafts* angereichert, während sich in der basolateralen Membrandomäne sehr viel Phosphatidylcholin befindet. Biochemische Hinweise und die Verwendung von fluoreszierenden Fusionsproteinen in *Live cell imaging* deuten darauf hin, dass auch nicht-polare Zellen mit polaren Zellen verwandte apikale und basolaterale Transportwege besitzen. Sie sind daher in der Lage, neu synthetisierte Oberflächenproteine in verschiedene Transportcontainer (TCs) zu sortieren, welche dann zu unterschiedlichen Oberflächenbereichen der Zelle transportiert werden können (71, 102, 125, 163). Die Protein-Sortierung erfolgt hierbei im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und generiert verschiedene Klassen von TCs, die durch den Transport zu unterschiedlichen physikalischen Regionen der Zellmembran zu einer zellulären Polarität führen (71). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass in polaren Zellen neben einem ektodermalen (wie bei PrP^C, siehe unten) (154), transmembranen oder luminalen Sortierungssignal (130) auch N- und O-verknüpfte Oligosaccharide als apikales Sortierungssignal fungieren können. Jedoch gibt es auch genügend Proteine, bei denen die N- oder die O-Glykosylierung keine Rolle spielen. Die Sortierung von Proteinen mit N- und O-verknüpften Oligosacchariden hängt dabei sowohl von der Länge und der Art der Verknüpfungen ab und diese sind wiederum abhängig von den in einem bestimmten Zelltyp vorhandenen Enzymen zur N- und O-Glykosylierung. Daher ist auch die Art der Proteinsortierung (N-Glykosylierungsabhängig oder nicht) und das Zielgebiet in unterschiedlichen Zelltypen verschieden (Übersichtsartikel: (27, 112)). *wt PrP^C* lokalisiert normalerweise in *Lipid rafts*. Zwei verschiedene Bereiche von PrP^C werden als Hauptursache für diese Lokalisation diskutiert. Zum einen besitzt die

PrP^C-Ektodomäne eine Signalsequenz (AS 23 bis 90), welche, unabhängig von der An- oder Abwesenheit des authentischen GPI-Ankers, zu einer Lokalisation von PrP^C in *Lipid rafts* führen soll (154), zum anderen wird der GPI-Anker als Hauptgrund für die Lokalisation von PrP^C in *Lipid rafts* angesehen (49).

Sollte ein mit dem basolateralen und apikalen Transportsystem in polaren Zellen verwandtes Transportsystem auch in den nicht-polaren BHK-Zellen funktionieren, so könnten die PrP^C-Fusionsproteine mit *wt* PrP^C und RVG- bzw. BDV-Anker in *Lipid rafts*, aufgrund ihrer Signalsequenz oder der N-Glykosylierung (*wt* PrP^C und RVG- bzw. BDV-Anker und PrP^C Δ 25-120 RVG) zu anderen Bereichen der Zellmembran als RV M transportiert worden sein. Die Involvierung der N-Glykosylierung in die Proteinsortierung von PrP^C würde auch erklären, wieso bei dem PrP^C-Fusionsprotein PrP^C Δ 25-120 RVG, das eine Deletion der Signalsequenz bis auf 2 AS besitzt (Kapitel 2.3. und Abb. 19), in dem Gradienten mit SAD Δ G(PrP^C Δ 25-120 RVG) Viren keine Kolokalisation von PrP^C-Fusionsprotein und RV M nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.9.2., Abb. 21). Zudem konnte nach der Deglykosylierung des PrP^C-Fusionsproteins PrP^C Δ 25-120 RVG in geringem Maße eine Kolokalisation von PrP^C-Fusionsprotein mit RV Proteinen im Gradienten nachgewiesen werden (Kapitel 3.9.3., Abb. 22A). PrP^C wird also zu Membranbereichen transportiert, an denen keine *Budding* von Tollwutvirionen stattfindet.

Die genaue Analyse der Lokalisation der PrP^C-Fusionsproteine an der Zelloberfläche könnte also dazu beitragen, den Ort des Tollwutvirus*buddings* einzugrenzen. Da durch die Expression und die Inkorporation der PrP^C-Fusionsproteine in die Zellemembran auch das Virus*budding* der Tollwutvirionen gestört wird, würde eine genauere Bestimmung des Hemmmechanismus eventuell auch bei der Entwicklung von Substanzen helfen, welche das Virus*budding* hemmen können.

4.2. Die Verwendung von Tollwutviren als neuronale Tracer

Bei der Untersuchung der Morphologie und Physiologie von Neuronen und ihrer Netzwerke gab es bisher keine ideale Methode um Neuronen zu identifizieren, die monosynaptisch mit einer Zellgruppe oder einer einzelnen Zelle verknüpft sind. Bislang wurden Methoden verwendet wie z.B. die Glutamat-basierende Fotostimulation neuronaler Netzwerke lebender Zellen von Gehirnschnitten (16), Elektronenmikroskopie von synaptischen Kontakten (52), elektrische Stimulation und duale intrazelluläre Aufzeichnungen mit Biocytin-Färbung (98),

quantitativer Laser-*scanning* Fotostimulation (137), Elektornenmikroskopie mit FluoroGold-markierten Zellen (147) und eine Kombination aus intrazellulärer Färbung und quantitativer Laser-*scanning* Fotostimulation (165). In konventionellen *Tracing*-Experimenten wurden z.B. neuronale Netzwerke rekombinanter Mausstämme untersucht, welche Cre-vermittelt Weizenkeim-Agglutinin exprimieren (11) oder es wurden Fusionsproteine aus dem nicht-toxischen Anteil des Tetanustoxins und eGFP zur Färbung neuronaler Netzwerke eingesetzt (84). Alle bislang verwendeten Methoden, einschließlich viraler *Tracer* wie das Pseudorabiesvirus (26) konnten nicht zwischen starken indirekten und sehr schwachen aber direkten Verknüpfungen unterscheiden.

Neuronale Zellen besitzen eine typische, ausgeprägte Polarität. Diese wird während früher Entwicklungsstadien erzeugt, in denen neuronale Progenitorzellen sich differenzieren und Axone und Dendriten ausbilden. Für die Bildung und Stabilität axonaler und somatodendritischer Membrandomänen ist ein polarer Membrantransport unabdingbar (21, 25, 61, 145). Transport von Membrancargos zu spezifischen Membrandomänen konnte schon für dendritische Proteine gezeigt werden (69, 134, 145). Dendriten besitzen zudem Enzyme zur N-Glykosylierung, welche sich normalerweise im Golgi-Apparat befinden (145, 149). Es gibt zudem Hinweise, dass in distalen Dendriten ein ER-Golgi Zwischen-Kompartiment und ein TGN ausgebildet werden (145). In Neuronen dominieren *Lipid rafts*, welche kein Caveolin enthalten. *Lipid rafts* befinden sich vor allem in postsynaptischen Regionen nahe synaptisch aktiven Bereichen und sind vermutlich an der Aktivierung von inaktiven Synapsen durch die Anbindung von Glutamatrezeptoren an die synaptische Zone beteiligt (143).

In vivo findet das *Budding* der Tollwutviren vermutlich an den Synapsen der Neuronen statt. Daher eignen sich RV gut als neuronale *Tracer*; sie exprimieren zusätzliche Gene mit hoher Effizienz von ihrem Genom und werden bei ihrem retrograden Transport transsynaptisch weitergeleitet (62, 72). Dazu ist das RV G notwendig (37). Im Vergleich zu Herpesviren ist die Infektion der Tollwutviren *in vivo* fast ausschließlich auf Neuronen beschränkt; Infektionen von Gliazellen sind selten (62, 72). Zudem konnte während der Tollwutvirusinfektion kaum Zellyse beobachtet werden, so dass unspezifische Freisetzung und Aufnahme der Tollwutviren von anderen Zellen sehr selten vorkommt (72). So können durch die Expression eines Markerproteins (z.B. eGFP) infizierte, neuronale Zellen markiert werden, welche sich presynaptisch zu einem initial infizierten Neuron oder einer Zelle befinden. In diesem Ansatz wurde die Verwendung von G-defizienten, eGFP oder mCherry

exprimierenden RV Partikeln (SAD Δ G eGFP oder SAD Δ G mCherry) mit dem EnvA-Oberflächenprotein/TVA-Rezeptor System kombiniert. G-defiziente RV wurden benutzt, um mit dem chimären EnvARGCD (Kapitel 1.2.) pseudotypisierte Virionen zu erhalten. Durch die Inkorporation des EnvARGCD Proteins änderte sich der Tropismus der Viruspartikel (Kapitel 3.3., Tab. 9, Abb. 3). Das EnvA ist das Oberflächenprotein des Vogelvirus *Avian Sarcoma and Leukosis Virus* und bindet an einen Rezeptor (TVA800), welcher nur von Vogelzellen, nicht jedoch von Säugetierzellen exprimiert wird. So konnte beim Vergleich der Titer von EnvARGCD und SAD G exprimierenden Viren (Tab. 9) gezeigt werden, dass mit EnvARGCD pseudotypisierte Viren BSR T7/5 Zellen nicht oder nur noch in geringem Ausmaße (max. $2,7 \times 10^4$) infizieren können. Die restliche Infektiosität auf den BSR T7/5 Zellen wird hierbei wahrscheinlich von SAD G exprimierenden Ausgangsviren erzeugt. Auf den Zellen, welche EnvARGCD exprimieren konnte ein guter Titer (max. $2,4 \times 10^6$) erreicht werden. Da es sich bei den TVA800 exprimierenden Zellen um Säugetierzellen handelt, können diese mit gleicher Effizienz auch von den Viren mit SAD G infiziert werden (max. $4,0 \times 10^6$). Die Expression des TVA Rezeptors blockiert also nicht die Expression des vom RV verwendeten Rezeptors. In einem Versuch wurden neuronale Säugetierzellen, welche den TVA-Rezeptor exprimieren mit CVS G oder EnvARGCD pseudotypisierten Virionen infiziert. Wie schon bei Bestimmung der infektiösen Titer, konnten mit EnvARGCD pseudotypisierte Viren mit sehr wenigen Ausnahmen, welche noch Ausgangsviren mit SAD G darstellen, nur die Zellen infizieren, welche den TVA Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren. Mit CVS G komplementierte Viren hingegen konnten die Zellen unabhängig von der TVA Rezeptorexpression infizieren (Abb. 3).

4.3. Live-imaging Experimente mit fluoreszierenden Viruspartikeln

Der Infektion mit dem Tollwutvirus in der Peripherie folgt das Eindringen der Viren in die der Bissstelle nächstgelegenen Motoneuronen oder sensorischen Neuronen und der schnelle Transport in das ZNS, einschließlich des transsynaptischen Übersprungs an den Neuronen. Diese Mechanismen sind lange als die wichtigsten Merkmale der Neuropathogenität des Tollwutvirus bekannt. Die RV G Deletionsmutanten haben gezeigt, dass das G Protein für den RV Eintritt in die Zelle und die Ausbreitung innerhalb der Neuronen essentiell ist (37, 159). Die Sequenz des RV G Proteins bestimmt die Fähigkeiten der RV Varianten, Neuronen zu infizieren (42, 100).

Die Untersuchung des intrazellulären Viruspartikeltransportes wurde erst durch die Möglichkeiten zur Fluoreszenzmarkierung von Virusstrukturproteinen ermöglicht (für einen

umfassenden Übersichtsartikel siehe (53)). Bei umhüllten Virionen, welche über die Fusion von Virushülle und Wirtsmembran in die Zelle eindringen, ist die Abtrennung der viralen Hülle und die Freisetzung des nackten Kerns (oder RNPs) an der Zelloberfläche oder in den Endosomen infizierter Zellen, ein sehr wichtiger Schritt im Lebenszyklus der Viren. Die Unterscheidung von abgetrennter Virushülle und nackten intrazellulären RNPs in der Beobachtung des Viruslebenszyklus in lebenden Zellen erfordert die unterschiedliche Färbung von Virushülle und RNP. Die Fluoreszenzmarkierung wurde schon zur Untersuchung der RNP Komplexe bei Tollwutviren (39, 75) und anderen Viren der Ordnung *Mononegavirales* eingesetzt (24, 34). In dieser Dissertation wurden erstmalig Tollwutviren generiert, welche eine rot fluoreszierende Virushülle und ein grün fluoreszierendes RNP aufweisen (Abb. 13) (74). Dies ermöglicht die Unterscheidung der umhüllten Viren von den freigesetzten nackten RNPs in der konfokalen Laserfluoreszenzmikroskopie lebender Zellen.

Zur Untersuchung der Transportprozesse umhüllter Rhabdoviren in Neuronen, wurde der Transport der zweifarbig markierten Tollwut Virionen in *in vitro* differenzierten, murinen NS20Y Neuroblastoma Zellen (Kapitel 3.8.1.1., Abb. 16) untersucht. Der Vergleich der verschiedenen Glykoproteine der unterschiedlichen Lyssaviren hatte gezeigt, dass Viruspartikel mit dem Glykoprotein des Tollwutvirusstammes CVS die stärkste Affinität für neuronale Zellen besitzen (Kapitel 3.2., Tab. 8). Auch ein Vergleich der unterschiedlichen Bewegungsmuster in NS20Y Zellen bestätigte dies. Versuche mit Pseudotyp- oder Surrogat-Tollwutviren mit Mokola Glykoprotein, VSVSAD G, SAD G oder CVS G zeigten, dass das Glykoprotein des Tollwutvirusstammes CVS am besten geeignet ist, um den Transport zu untersuchen (Kapitel 3.8.1.2., Abb. 17A). Zudem hatten auch schon frühere *in vivo* Studien gezeigt, dass Tollwutviren mit dem Glykoprotein des Tollwutstammes CVS im Vergleich zum Glykoprotein des Stammes SAD eine stärkere Neuropathogenität aufweisen (43, 100).

Daher wurde das RV G Protein des stark neurotrophen Tollwutstammes CVS-11 (42) verwendet, um den intra-neuronalen Transport der Tollwutviren zu untersuchen. Die Untersuchung der NS20Y Zellen, welche mit den zweifarbigem, CVS G exprimierenden Viren infiziert wurden, zeigte, dass die umhüllten Virionen die zelluläre Transportmaschinerie über lange Transportstrecken benutzen. Neben Viruspartikeln, welche kaum, oder nur leichte Vorwärts- und Rückwärtsbewegungen durchführten (Abb. 17D), wurden auch umhüllte Virionen beobachtet, welche mit einer recht konstanten Geschwindigkeit von 0,1 $\mu\text{m}/\text{sek}$ und einer Transportlänge von ca. 25 μm in die retrograde Richtung (Abb. 17F) transportiert

wurden. Die Durchschnittsgeschwindigkeit (0,1 $\mu\text{m}/\text{sek}$) der umhüllten Tollwutviren lag jedoch ca. 10fach unter der Durchschnittsgeschwindigkeit anderer viraler Kapside, welche ebenfalls den Mikrotubuli-abhängigen retrograden Transport verwenden (140). Da jedoch die Unterschiede in den Transportgeschwindigkeiten sehr stark von Zelltyp und Kultivierungsbedingungen abhängen, ist ein direkter Vergleich zwischen den unterschiedlichen Virustypen nicht möglich. Aufgrund der Bildaufnahmegeschwindigkeit von 6,4 Sekunden pro Bild kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es zu wiederholten Pausen im Virustransport während der Bildaufnahmen gekommen ist, die zu einer Abnahme der Durchschnittsgeschwindigkeit geführt haben. Die Betrachtung der Viruspartikel, die nur eGFP-markierte RNPs enthielten und identische Bewegungsmuster aufwiesen, beweist, dass nicht die Anwesenheit von tm-RFP für den Transportvorgang verantwortlich ist und dass das tm-RFP den Transport nicht negativ beeinflusst.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Beobachtungen, welche besagen, dass das RV G Protein, inkorporiert in pseudotypisierte Lentiviren, den retrograden, axonalen Transport dieser Viren ermöglicht (85, 97). Der G-abhängige Transport ist also ein spezifisches Merkmal der authentischen Tollwutinfektion. Eine direkte Rolle der zytosolischen RV P Proteine oder der RNPs durch Bindung an DLC, welches an dem Mikrotubuli-getriebenen Transportvorgang beteiligt ist, scheint dagegen eher unwahrscheinlich, da RV Mutanten, welche keine Bindung von RV P mehr an DLC durchführen können, nach peripherer Inokulation trotzdem ins ZNS transportiert werden (88, 144). Ein indirekter Einfluss des RV P ist jedoch möglich. Die Verhinderung der DLC Bindung führt zu einer Abnahme der Primärtranskription der mutanten Tollwutviren und daher auch zu einer Verringerung der intra-neuronalen Virusreplikation (144).

Die Beobachtung, dass umhüllte Tollwutvirionen mit RV G Protein auf der Oberfläche in neuronalen Zellkulturen transportiert werden (74), unterstützt die Modellvorstellung, dass der Transport von kompletten Virionen innerhalb neuronaler Transportvesikel direkt an der Ausbreitung der Tollwutviren *in vivo* beteiligt ist. Die produktive Infektion der Neuronen ist für die weitere Ausbreitung der Virionen in benachbarte Neuronen erforderlich (37). Der initiale Transport der Viruspartikel in Membranvesikeln von der Zellperipherie zu den Zellkörpern spart jedoch Zeit, verhindert die vorzeitige Schädigung der Zellen und des neuronalen Netzwerkes, die Aktivierung der zellulären Abwehrmechanismen und hilft den Viruspartikeln ihren Bestimmungsort zu erreichen.

Die unterschiedlichen Fähigkeiten der verschiedenen Tollwutvirusstämme, Neuronen zu infizieren, könnte mit der unterschiedlichen Verwendung von Rezeptoren zusammenhängen (19). So ist der rekombinante Tollwutvirusstamm SAD L16 und der parentale Stamm SAD B19 (42) *in vivo* nach peripherer Infektion von Mäusen, vermutlich aufgrund der veränderten Rezeptorverwendung stark attenuiert. So könnte die Bindung des CVS G an spezifische, neuronale Rezeptoren zu einer Sortierung der Viruspartikel in Transportvesikel führen, und so einen schnellen retrograden Transport der Virionen ermöglichen. Der an die Zellkultur angepasste Tollwutvirusstamm SAD besitzt vielleicht ein Glykoprotein, das eine viel stärkere Affinität zu universell, auf den unterschiedlichen Zelltypen vorkommende Rezeptoren besitzt, die nicht die Sortierung in retrograde Transportvesikel unterstützen. Einer der potentiellen neuronalen Rezeptoren für Tollwutviren ist p75NTR. Von p75NTR ist bekannt, dass er in Vesikel internalisiert und in diesen in retrograder Richtung transportiert wird (118). Weiterführende Arbeiten sind jedoch nötig, um die genauen Mechanismen und Bedingungen der unterschiedlichen Rezeptorbenutzung zu untersuchen.

DRGs als primäre, neuronale Zellen wurden bisher schon in vielen Studien genutzt, um einer *in vivo* Situation nahe zu kommen. So wurden DRGs benutzt, um nach Rezeptoren und deren Lokalisation in der Zellmembran zu suchen, die von Herpes Simplex Viren verwendet werden (167). Auch der Transportmechanismus der Herpes Simplex und der Pseudorabies Viren wurde auf DRGs untersucht (29). Des Weiteren wurde der Mechanismus der latenten Virusinfektion des Varizella Zoster Virus in DRGs analysiert (73). In dieser Doktorarbeit wurden DRGs mit Tollwutviren mit dem Glykoprotein des Stammes CVS infiziert. Die Membranbindung und die Taumelbewegungen der Partikel innerhalb der axonalen Ausläufer konnten gut beobachtet werden. Aufgrund der starken Vernetzung der axonalen Ausläufer war jedoch keine Bestimmung der Transportrichtung mehr möglich (Abb. 18A und B). Die Analyse des retrograden Transportprozesses in primären Zellen könnte auch weiterhin dazu beitragen, Unterschiede in der Rezeptorverwendung der verschiedenen RV G Proteine und die unterschiedliche Neuroinvasivität der Tollwutvirusstämme und Serotypen zu untersuchen. Weitere Experimente mit primären Neuronen und Tollwutviren, welche verschiedene Glykoproteine von unterschiedlichen Tollwutvirusstämmen und Lyssaviren inkorporiert haben, sind sehr gut geeignet, um den Charakter der neuronalen Transportvesikel und der Rezeptoren, welche von RV G benutzt werden, zu bestimmen.

5. Zusammenfassung

Das Tollwutvirus (Rabies Virus (RV)) ist ein neurotropes Virus aus der Familie der *Rhabdoviridae* innerhalb der Ordnung *Mononegavirales*. RV Partikel werden an der Zelloberfläche durch *Membran-Budding* gebildet. Dabei wird der virale Ribonukleoproteinkomplex (RNP) durch das Matrixprotein (M) in eine Membranhülle verpackt in der Trimere des Transmembran-Glykoproteins (G) selektiv inkorporiert werden. Die G *Spikes* vermitteln die Bindung der Virionen an zelluläre Rezeptoren und die Fusion der viralen und zellulären Membran. Auch in Abwesenheit des G werden Viren freigesetzt, da der *Budding*-Prozess hauptsächlich durch das M Protein vermittelt wird. Das G-unabhängige *Budding* der Rhabdoviren erlaubt den Austausch der Oberflächenproteine (*Envelope-Switching*), wodurch es zu einem veränderten Tropismus (*Re-targeting*) der RV kommt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die G Proteine der Lyssaviren Mokola, Bat Hamburg und Lagos Bat, aber auch des RV-Stammes *Challenge Virus Strain* (CVS) für den spezifischen Neurotropismus dieser Viren verantwortlich sind.

Der für die Inkorporation von Fremdproteinen in die Virushülle essentielle Bereich des RV G (tm) wurde verwendet, um chimäre Typ I Transmembranproteine aus dem rot-fluoreszierenden Protein (RFP) und RV G (tm-RFP) zu konstruieren und in die Virushülle G-defizienter und *Wildtyp* Tollwutviren zu inkorporieren. Fusionsproteine aus tm und zellulärem Prionprotein (tm-PrP^C) wurden nicht an die Bereiche der Zellmembran transportiert, an denen Tollwutvirus-*Budding* stattfindet. Diese Konstrukte könnten daher verwendet werden, um den Ort des RV-*Budding* näher zu bestimmen, während die Inkorporation fluoreszierender Proteine in die Virushülle die direkte Visualisierung von einzelnen Stadien des Tollwutvirus-Lebenszyklus wie z.B. Virustransport oder *Entry* in lebenden Zellen ermöglicht.

Aufgrund der G-vermittelten transsynaptischen Ausbreitung der Rhabdoviren in neuronalen Netzwerken, wurden die Fluoreszenz-markierten RV Partikel auch als neuronale Marker zur Untersuchung der Physiologie und Morphologie neuronaler Netzwerke verwendet.

Der retrograde, axonale Transport der RV zum Zentralen Nervensystem ist eine essentielle Voraussetzung für die letale RV-Erkrankung. Durch die Verwendung von RV Partikeln mit tm-RFP-markierter Virushülle und eGFP-markiertem RNP konnte gezeigt werden, dass zweifarbige, also umhüllte Virionen entlang der neuronalen Ausläufer von *in vitro* differenzierten und primären Neuronen transportiert wurden, wobei der retrograde Transport in den *in vitro* differenzierten Neuronen mit einer konstanten Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,1 µm/sek und einer durchschnittlichen Transportlänge von 25 µm erfolgte.

6. Summary

The neurotropic Rabies Virus (RV) belongs to the family of *Rhabdoviridae* in the order of *Mononegavirales*. Rhabdovirus particles are produced at the cell surface through membrane-budding. During budding of the virus the viral ribonucleoprotein complex (RNP) is enwrapped into an envelope containing an inner layer of matrixprotein (M) and the transmembrane glycoproteins (G), which forms trimeric spikes. The G spikes are required for virus entry into cells, by interacting with cell receptors and promoting virus and cell membrane fusion. Virus budding is mainly mediated through the M protein; in the absence of G non-infectious spikeless virus particles are released from the infected cells. G-independent budding of rabies virus allows the exchange of envelope proteins (envelope-switching) leading to re-targeting of the recombinant virus.

In this work we could show that the G proteins of the Lyssaviruses Mokola, Bat Hamburg and Lagos Bat and the Rabies Virus strain Challenge Virus Strain (CVS) are responsible for the neurotropic tropism of these viruses.

The RV G region (tm) which is essential for the incorporation of foreign proteins into the virus envelope were used to construct chimeric type I transmembrane proteins comprising the red fluorescent protein (RFP) and RV G (tm-RFP) and for incorporation into G-deficient and *wildtype* Rabies Virus particles. Fusionproteins of tm and the cellular Prionprotein (tm-PrP^C) were not transported to regions of the cell surface membrane where Rabies Virus budding takes place. These constructs could be used to narrow the cell surface region of Rabies Virus Budding down, whereas the incorporation of fluorescent proteins into virus envelope allows the direct visualisation of several stages in Rabies Virus life cycle e.g. entry or Rabies virus transport in living cells.

Because Rhabdoviruses can spread within neuronal networks transsynaptically in a G protein dependent manner, fluorescent-tagged Rabies Virus particles were used as neuronal markers to analyze the physiology and morphology of neuronal networks.

The retrograde axonal transport of Rabies virus to the Central Nervous System (CNS) is an essential assumption of the lethal Rabies Virus disease. The use of Rabies Virus particles with a tm-RFP-labeled virus envelope and an eGFP-tagged RNP revealed that dual-coloured, i.e. enveloped virions are transported along neuronal branches of *in vitro* differentiated and primary neurons, whereas transport within *in vitro* differentiated neurons occur with a constant speed of 0.1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ and a mean distance of 25 μm .

7. Literaturverzeichnis

1. ICTV Index to virus classification and nomenclature.ncbi.28-6-2002. ICTV Index to virus classification and nomenclature.ncbi.28-6-2002 . 1997. Ref Type: Electronic Citation
2. WHO Fact sheet No99, revised 09.2006. WHO Fact sheet No99, revised 09.2006 . 1997. Ref Type: Electronic Citation
3. **Banerjee, A. K.** 1987. Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiol. Rev.* **51**:66-87.
4. **Barnard, R. J. and J. A. Young.** 2003. Alpharetrovirus envelope-receptor interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **281**:107-136.
5. **Bates, P., L. Rong, H. E. Varmus, J. A. Young, and L. B. Crittenden.** 1998. Genetic mapping of the cloned subgroup A avian sarcoma and leukosis virus receptor gene to the TVA locus. *J Virol* **72**:2505-2508.
6. **Bates, P., J. A. Young, and H. E. Varmus.** 1993. A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell* **74**:1043-1051.
7. **Bodemer, W.** 1999. The use of monoclonal antibodies in human prion disease. *Naturwissenschaften* **86**:212-220.
8. **Bourhy, H., B. Kissi, and N. Tordo.** 1993. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology* **194**:70-81.
9. **Bova, C. A., J. P. Manfredi, and R. Swanstrom.** 1986. env genes of avian retroviruses: nucleotide sequence and molecular recombinants define host range determinants. *Virology* **152**:343-354.
10. **Bova, C. A., J. C. Olsen, and R. Swanstrom.** 1988. The avian retrovirus env gene family: molecular analysis of host range and antigenic variants. *J Virol* **62**:75-83.
11. **Braz, J. M., B. Rico, and A. I. Basbaum.** 2002. Transneuronal tracing of diverse CNS circuits by Cre-mediated induction of wheat germ agglutinin in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15148-15153.
12. **Brown, D. A. and J. K. Rose.** 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**:533-544.
13. **Brzozka, K., S. Finke, and K. K. Conzelmann.** 2005. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**:7673-7681.
14. **Buchholz, U. J., S. Finke, and K. K. Conzelmann.** 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus

- replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* **73**:251-259.
15. **Buonocore, L., K. J. Blight, C. M. Rice, and J. K. Rose.** 2002. Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol* **76**:6865-6872.
 16. **Callaway, E. M. and L. C. Katz.** 1993. Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:7661-7665.
 17. **Conzelmann, K. K., J. H. Cox, L. G. Schneider, and H. J. Thiel.** 1990. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* **175**:485-499.
 18. **Conzelmann, K. K. and M. Schnell.** 1994. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. *J Virol* **68**:713-719.
 19. **Coulon, P., J. P. Ternaux, A. Flamand, and C. Tuffereau.** 1998. An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons in vivo and in vitro. *J Virol* **72**:273-278.
 20. **Cox, J. H., B. Dietzschold, and L. G. Schneider.** 1977. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect. Immun.* **16**:754-759.
 21. **Craig, A. M. and G. Banker.** 1994. Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**:267-310.
 22. **Creutzfeldt, H. G.** 1920. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* **57**:1-18.
 23. **Curran, J., J. B. Marq, and D. Kolakofsky.** 1995. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J Virol* **69**:849-855.
 24. **Das, S. C., D. Nayak, Y. Zhou, and A. K. Pattnaik.** 2006. Visualization of intracellular transport of vesicular stomatitis virus nucleocapsids in living cells. *J Virol* **80**:6368-6377.
 25. **De Hoop, M. J. and C. G. Dotti.** 1993. Membrane traffic in polarized neurons in culture. *J Cell Sci Suppl* **17**:85-92.
 26. **DeFalco, J., M. Tomishima, H. Liu, C. Zhao, X. Cai, J. D. Marth, L. Enquist, and J. M. Friedman.** 2001. Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. *Science* **291**:2608-2613.
 27. **Delacour, D. and R. Jacob.** 2006. Apical protein transport. *Cell Mol. Life Sci* **63**:2491-2505.
 28. **Delos, S. E., J. M. Gilbert, and J. M. White.** 2000. The central proline of an internal viral fusion peptide serves two important roles. *J Virol* **74**:1686-1693.

29. **Diefenbach, R. J., M. Miranda-Saksena, M. W. Douglas, and A. L. Cunningham.** 2008. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev. Med. Virol* **18**:35-51.
30. **Dietzschold, B., C. E. Rupprecht, M. Tollis, M. Lafon, J. Mattei, T. J. Wiktor, and H. Koprowski.** 1988. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. *Rev. Infect. Dis.* **10 Suppl 4**:S785-S798.
31. **Dietzschold, B., W. H. Wunner, T. J. Wiktor, A. D. Lopes, M. Lafon, C. L. Smith, and H. Koprowski.** 1983. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:70-74.
32. **Dorner, A. J. and J. M. Coffin.** 1986. Determinants for receptor interaction and cell killing on the avian retrovirus glycoprotein gp85. *Cell* **45**:365-374.
33. **Dorner, A. J., J. P. Stoye, and J. M. Coffin.** 1985. Molecular basis of host range variation in avian retroviruses. *J Virol* **53**:32-39.
34. **Duprex, W. P., F. M. Collins, and B. K. Rima.** 2002. Modulating the function of the measles virus RNA-dependent RNA polymerase by insertion of green fluorescent protein into the open reading frame. *J Virol* **76**:7322-7328.
35. **Einfeld, D. and E. Hunter.** 1988. Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:8688-8692.
36. **Emerson, S. U. and Y. Yu.** 1975. Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus. *J Virol* **15**:1348-1356.
37. **Etessami, R., K. K. Conzelmann, B. Fadai-Ghotbi, B. Natelson, H. Tsiang, and P. E. Ceccaldi.** 2000. Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an in vitro and in vivo study. *J Gen Virol* **81**:2147-2153.
38. **Etessami, R., K. K. Conzelmann, R. Marion, H. Tsiang, and P. E. Ceccaldi.** 2000. [Neuronal expression of foreign genes with recombinant rabies virus variants]. *Rev. Neurol. (Paris)* **156**:236-241.
39. **Finke, S., K. Brzozka, and K. K. Conzelmann.** 2004. Tracking fluorescence-labeled rabies virus: enhanced green fluorescent protein-tagged phosphoprotein P supports virus gene expression and formation of infectious particles. *J Virol* **78**:12333-12343.
40. **Finke, S. and K. K. Conzelmann.** 1999. Virus promoters determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus. *J Virol* **73**:3818-3825.
41. **Finke, S. and K. K. Conzelmann.** 2003. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *J Virol* **77**:12074-12082.
42. **Finke, S. and K. K. Conzelmann.** 2005. Recombinant rhabdoviruses: vectors for vaccine development and gene therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **292**:165-200.

43. **Finke, S. and K. K. Conzelmann.** 2005. Replication strategies of rabies virus. *Virus Res.* **111**:120-131.
44. **Finke, S., R. Mueller-Waldeck, and K. K. Conzelmann.** 2003. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J Gen Virol* **84**:1613-1621.
45. **Gaudin, Y.** 2000. Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *J Cell Biol.* **150**:601-612.
46. **Gerstmann, J.** 1928. Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems. *Wien. Medizin. Wochenschr.* **78**:906-908.
47. **Gerstmann, J.** 1936. Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.* **154**:736-762.
48. **Gilbert, J. M., L. D. Hernandez, J. W. Balliet, P. Bates, and J. M. White.** 1995. Receptor-induced conformational changes in the subgroup A avian leukosis and sarcoma virus envelope glycoprotein. *J Virol* **69**:7410-7415.
49. **Gilch, S., C. Kehler, and H. M. Schatzl.** 2006. The prion protein requires cholesterol for cell surface localization. *Mol. Cell Neurosci.* **31**:346-353.
50. **Gould, A. R., J. A. Kattenbelt, S. G. Gumley, and R. A. Lunt.** 2002. Characterisation of an Australian bat lyssavirus variant isolated from an insectivorous bat. *Virus Res.* **89**:1-28.
51. **Graham, F. L. and A. J. van der Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**:456-467.
52. **Gray, E. G.** 1959. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* **183**:1592-1593.
53. **Greber, U. F. and M. Way.** 2006. A superhighway to virus infection. *Cell* **124**:741-754.
54. **Green, T. J., X. Zhang, G. W. Wertz, and M. Luo.** 2006. Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* **313**:357-360.
55. **Grouse, L. D., B. K. Schrier, C. H. Letendre, M. Y. Zubairi, and P. G. Nelson.** 1980. Neuroblastoma differentiation involves both the disappearance of old and the appearance of new poly(A)⁺ messenger RNA sequences in polyribosomes. *J Biol. Chem.* **255**:3871-3877.
56. **Hartter, D. E. and A. Barnea.** 1988. Evidence for release of copper in the brain: depolarization-induced release of newly taken-up ⁶⁷copper. *Synapse* **2**:412-415.
57. **Herms, J., T. Tings, S. Gall, A. Madlung, A. Giese, H. Siebert, P. Schurmann, O. Windl, N. Brose, and H. Kretzschmar.** 1999. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci.* **19**:8866-8875.

58. **Horikami, S. M., J. Curran, D. Kolakofsky, and S. A. Moyer.** 1992. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* **66**:4901-4908.
59. **Hörnlimann, B., D. Riesner, and H. Kretzschmar.** 2001. Prionen und Prionkrankheiten.
60. **Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann.** 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**:994-997.
61. **Horton, A. C. and M. D. Ehlers.** 2003. Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* **40**:277-295.
62. **Iwasaki, Y. and H. F. Clark.** 1975. Cell to cell transmission of virus in the central nervous system. II. Experimental rabies in mouse. *Lab Invest* **33**:391-399.
63. **Jacob, Y., H. Badrane, P. E. Ceccaldi, and N. Tordo.** 2000. Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J Virol* **74**:10217-10222.
64. **Jakob, A. M.** 1921. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden) . *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **70**:132-146.
65. **Jakob, A. M.** 1921. Über eine der Multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Zentralnervensystems (Spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischen Befunde. *Medizinische Klinik* **13**:372.
66. **Jayakar, H. R., E. Jeetendra, and M. A. Whitt.** 2004. Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res.* **106**:117-132.
67. **Jeffrey, M. and G. A. Wells.** 1988. Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet. Pathol.* **25**:398-399.
68. **Johnson, N., C. Freuling, D. A. Marston, N. Tordo, A. R. Fooks, and T. Muller.** 2007. Identification of European bat lyssavirus isolates with short genomic insertions. *Virus Res.* **128**:140-143.
69. **Juttner, R. and F. G. Rathjen.** 2005. Molecular analysis of axonal target specificity and synapse formation. *Cell Mol. Life Sci* **62**:2811-2827.
70. **Kardos, J., I. Kovacs, F. Hajos, M. Kalman, and M. Simonyi.** 1989. Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. *Neurosci. Lett.* **103**:139-144.
71. **Keller, P., D. Toomre, E. Diaz, J. White, and K. Simons.** 2001. Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat. Cell Biol.* **3**:140-149.
72. **Kelly, R. M. and P. L. Strick.** 2000. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J Neurosci. Methods* **103**:63-71.

73. **Kennedy, P. G.** 2002. Key issues in varicella-zoster virus latency. *J Neurovirol.* **8 Suppl 2**:80-84.
74. **Klingen, Y., K. K. Conzelmann, and S. Finke.** 2008. Double-Labeled Rabies Virus Live tracking of enveloped virus transport. *J Virol* **82**:237-245.
75. **Koser, M. L., J. P. McGettigan, G. S. Tan, M. E. Smith, H. Koprowski, B. Dietzschold, and M. J. Schnell.** 2004. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9405-9410.
76. **Lagging, L. M., K. Meyer, J. Westin, R. Wejstal, G. Norkrans, M. Lindh, and R. Ray.** 2002. Neutralization of pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing hepatitis C virus envelope glycoprotein 1 or 2 by serum from patients. *J Infect. Dis.* **185**:1165-1169.
77. **Le Mercier, P., Y. Jacob, and N. Tordo.** 1997. The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* **78 (Pt 7)**:1571-1576.
78. **Lentz, T. L., T. G. Burrage, A. L. Smith, J. Crick, and G. H. Tignor.** 1982. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* **215**:182-184.
79. **Lietz, M., A. Ullrich, C. Schulte-Eversum, S. Oberhoffner, C. Fricke, H. W. Muller, and B. Schlosshauer.** 2006. Physical and biological performance of a novel block copolymer nerve guide. *Biotechnol. Bioeng.* **93**:99-109.
80. **Lippincott-Schwartz, J., T. H. Roberts, and K. Hirschberg.** 2000. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**:557-589.
81. **Malin, S. A., B. M. Davis, and D. C. Molliver.** 2007. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc.* **2**:152-160.
82. **Manie, S. N., S. Debreyne, S. Vincent, and D. Gerlier.** 2000. Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J Virol* **74**:305-311.
83. **Marston, D. A., L. M. McElhinney, N. Johnson, T. Muller, K. K. Conzelmann, N. Tordo, and A. R. Fooks.** 2007. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *J Gen Virol* **88**:1302-1314.
84. **Maskos, U., K. Kissa, C. St Cloment, and P. Brulet.** 2002. Retrograde trans-synaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:10120-10125.
85. **Mazarakis, N. D., M. Azzouz, J. B. Rohll, F. M. Ellard, F. J. Wilkes, A. L. Olsen, E. E. Carter, R. D. Barber, D. F. Baban, S. M. Kingsman, A. J. Kingsman, K. O'Malley, and K. A. Mitrophanous.** 2001. Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum. Mol. Genet.* **10**:2109-2121.

86. **McGettigan, J. P., R. J. Pomerantz, C. A. Siler, P. M. McKenna, H. D. Foley, B. Dietzschold, and M. J. Schnell.** 2003. Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. *J Virol* **77**:237-244.
87. **McGowan, J. P.** 1922. Scrapie in sheep. *Scottish J. Agric.* **5**:365-375.
88. **Mebatsion, T.** 2001. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. *J Virol* **75**:11496-11502.
89. **Mebatsion, T. and K. K. Conzelmann.** 1996. Specific infection of CD4+ target cells by recombinant rabies virus pseudotypes carrying the HIV-1 envelope spike protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11366-11370.
90. **Mebatsion, T., J. H. Cox, and K. K. Conzelmann.** 1993. Molecular analysis of rabies-related viruses from Ethiopia. *Onderstepoort J Vet. Res.* **60**:289-294.
91. **Mebatsion, T., J. H. Cox, and J. W. Frost.** 1992. Isolation and characterization of 115 street rabies virus isolates from Ethiopia by using monoclonal antibodies: identification of 2 isolates as Mokola and Lagos bat viruses. *J Infect. Dis.* **166**:972-977.
92. **Mebatsion, T., S. Finke, F. Weiland, and K. K. Conzelmann.** 1997. A CXCR4/CD4 pseudotype rhabdovirus that selectively infects HIV-1 envelope protein-expressing cells. *Cell* **90**:841-847.
93. **Mebatsion, T., M. Konig, and K. K. Conzelmann.** 1996. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell* **84**:941-951.
94. **Mebatsion, T., M. J. Schnell, and K. K. Conzelmann.** 1995. Mokola virus glycoprotein and chimeric proteins can replace rabies virus glycoprotein in the rescue of infectious defective rabies virus particles. *J Virol* **69**:1444-1451.
95. **Mebatsion, T., M. J. Schnell, J. H. Cox, S. Finke, and K. K. Conzelmann.** 1996. Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7310-7314.
96. **Mebatsion, T., F. Weiland, and K. K. Conzelmann.** 1999. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol* **73**:242-250.
97. **Mentis, G. Z., M. Gravell, R. Hamilton, N. A. Shneider, M. J. O'Donovan, and M. Schubert.** 2006. Transduction of motor neurons and muscle fibers by intramuscular injection of HIV-1-based vectors pseudotyped with select rabies virus glycoproteins. *J Neurosci. Methods* **157**:208-217.
98. **Mercer, A., D. C. West, O. T. Morris, S. Kirchhecker, J. E. Kerkhoff, and A. M. Thomson.** 2005. Excitatory connections made by presynaptic cortico-cortical pyramidal cells in layer 6 of the neocortex. *Cereb. Cortex* **15**:1485-1496.
99. **Modrow, S. and D. Falke.** 1997. *Molekulare Virologie.*

100. **Morimoto, K., H. D. Foley, J. P. McGettigan, M. J. Schnell, and B. Dietzschold.** 2000. Reinvestigation of the role of the rabies virus glycoprotein in viral pathogenesis using a reverse genetics approach. *J Neurovirol.* **6**:373-381.
101. **Morimoto, K., J. P. McGettigan, H. D. Foley, D. C. Hooper, B. Dietzschold, and M. J. Schnell.** 2001. Genetic engineering of live rabies vaccines. *Vaccine* **19**:3543-3551.
102. **Musch, A., H. Xu, D. Shields, and E. Rodriguez-Boulan.** 1996. Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J Cell Biol.* **133**:543-558.
103. **Naim, H. Y., E. Ehler, and M. A. Billeter.** 2000. Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *EMBO J* **19**:3576-3585.
104. **Narayan, S., R. J. Barnard, and J. A. Young.** 2003. Two retroviral entry pathways distinguished by lipid raft association of the viral receptor and differences in viral infectivity. *J Virol* **77**:1977-1983.
105. **Nguyen, D. H. and J. E. Hildreth.** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**:3264-3272.
106. **Ono, A. and E. O. Freed.** 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13925-13930.
107. **Pattnaik, A. K. and G. W. Wertz.** 1990. Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs. *J Virol* **64**:2948-2957.
108. **Patton, J. T., N. L. Davis, and G. W. Wertz.** 1984. N protein alone satisfies the requirement for protein synthesis during RNA replication of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **49**:303-309.
109. **Pauly, P. C. and D. A. Harris.** 1998. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol. Chem.* **273**:33107-33110.
110. **Payne, L. N. and P. M. Biggs.** 1966. Genetic basis of cellular susceptibility to the Schmidt-Ruppin and Harris strains of Rous sarcoma virus. *Virology* **29**:190-198.
111. **Payne, L. N., L. B. Crittenden, and W. Okazaki.** 1968. Influence of host genotype on responses to four strains of avian leukosis virus. *J Natl Cancer Inst.* **40**:907-916.
112. **Potter, B. A., R. P. Hughey, and O. A. Weisz.** 2006. Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**:C1-C10.
113. **Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal, and J. Lippincott-Schwartz.** 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**:81-85.
114. **Prusiner, S. B.** 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13363-13383.

115. **Rager, M., S. Vongpunsawad, W. P. Duprex, and R. Cattaneo.** 2002. Polyploid measles virus with hexameric genome length. *EMBO J* **21**:2364-2372.
116. **Raux, H., A. Flamand, and D. Blondel.** 2000. Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *J Virol* **74**:10212-10216.
117. **Reagan, K. J. and W. H. Wunner.** 1985. Rabies virus interaction with various cell lines is independent of the acetylcholine receptor. *Arch. Virol* **84**:277-282.
118. **Riccio, A., B. A. Pierchala, C. L. Ciarallo, and D. D. Ginty.** 1997. An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* **277**:1097-1100.
119. **Richt, J. A., T. Furbringer, A. Koch, I. Pfeuffer, C. Herden, I. Bause-Niedrig, and W. Garten.** 1998. Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J Virol* **72**:4528-4533.
120. **Robison, C. S. and M. A. Whitt.** 2000. The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *J Virol* **74**:2239-2246.
121. **Roche, S. and Y. Gaudin.** 2002. Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology* **297**:128-135.
122. **Roche, S. and Y. Gaudin.** 2004. Evidence that rabies virus forms different kinds of fusion machines with different pH thresholds for fusion. *J Virol* **78**:8746-8752.
123. **Rose, N. F., P. A. Marx, A. Luckay, D. F. Nixon, W. J. Moretto, S. M. Donahoe, D. Montefiori, A. Roberts, L. Buonocore, and J. K. Rose.** 2001. An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell* **106**:539-549.
124. **Rubin, H.** 1965. Genetic control of cellular susceptibility to pseudotypes of rous sarcoma virus. *Virology* **26**:270-276.
125. **Rustom, A., M. Bajohrs, C. Kaether, P. Keller, D. Toomre, D. Corbeil, and H. H. Gerdes.** 2002. Selective delivery of secretory cargo in Golgi-derived carriers of nonepithelial cells. *Traffic* **3**:279-288.
126. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
127. **Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
128. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed.

129. **Scales, S. J., R. Pepperkok, and T. E. Kreis.** 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* **90**:1137-1148.
130. **Scheiffele, P., A. Rietveld, T. Wilk, and K. Simons.** 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol. Chem.* **274**:2038-2044.
131. **Scheiffele, P., M. G. Roth, and K. Simons.** 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J* **16**:5501-5508.
132. **Schlender, J., B. Bossert, U. Buchholz, and K. K. Conzelmann.** 2000. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol* **74**:8234-8242.
133. **Schnell, M. J., T. Mebatsion, and K. K. Conzelmann.** 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* **13**:4195-4203.
134. **Setou, M., T. Nakagawa, D. H. Seog, and N. Hirokawa.** 2000. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* **288**:1796-1802.
135. **Shakin-Eshleman, S. H., A. T. Remaley, J. R. Eshleman, W. H. Wunner, and S. L. Spitalnik.** 1992. N-linked glycosylation of rabies virus glycoprotein. Individual sequons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell surface expression. *J Biol. Chem.* **267**:10690-10698.
136. **Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer, and R. Y. Tsien.** 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**:1567-1572.
137. **Shepherd, G. M. and K. Svoboda.** 2005. Laminar and columnar organization of ascending excitatory projections to layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex. *J Neurosci.* **25**:5670-5679.
138. **Shyng, S. L., J. E. Heuser, and D. A. Harris.** 1994. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol.* **125**:1239-1250.
139. **Siler, C. A., J. P. McGettigan, B. Dietzschold, S. K. Herrine, J. Dubuisson, R. J. Pomerantz, and M. J. Schnell.** 2002. Live and killed rhabdovirus-based vectors as potential hepatitis C vaccines. *Virology* **292**:24-34.
140. **Smith, G. A., L. Pomeranz, S. P. Gross, and L. W. Enquist.** 2004. Local modulation of plus-end transport targets herpesvirus entry and egress in sensory axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16034-16039.
141. **Smith, M. E., M. Koser, S. Xiao, C. Siler, J. P. McGettigan, C. Calkins, R. J. Pomerantz, B. Dietzschold, and M. J. Schnell.** 2006. Rabies virus glycoprotein as a carrier for anthrax protective antigen. *Virology* **353**:344-356.
142. **Stahl, N. and S. B. Prusiner.** 1991. Prions and prion proteins. *FASEB J* **5**:2799-2807.

143. **Suzuki, T.** 2002. Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. *Neurosci. Res.* **44**:1-9.
144. **Tan, G. S., M. A. Preuss, J. C. Williams, and M. J. Schnell.** 2007. The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:7229-7234.
145. **Tang, B. L.** 2008. Emerging aspects of membrane traffic in neuronal dendrite growth. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**:169-176.
146. **Thoulouze, M. I., M. Lafage, M. Schachner, U. Hartmann, H. Cremer, and M. Lafon.** 1998. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* **72**:7181-7190.
147. **Timofeeva, E., C. Dufresne, A. Sik, Z. W. Zhang, and M. Deschenes.** 2005. Cholinergic modulation of vibrissal receptive fields in trigeminal nuclei. *J Neurosci.* **25**:9135-9143.
148. **Tordo, N., O. Poch, A. Ermine, G. Keith, and F. Rougeon.** 1988. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* **165**:565-576.
149. **Torre, E. R. and O. Steward.** 1996. Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* **16**:5967-5978.
150. **Tuffereau, C., J. Benejean, D. Blondel, B. Kieffer, and A. Flamand.** 1998. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J* **17**:7250-7259.
151. **Tuffereau, C., H. Leblois, J. Benejean, P. Coulon, F. Lafay, and A. Flamand.** 1989. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* **172**:206-212.
152. **Viles, J. H., F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. B. Goodin, P. E. Wright, and H. J. Dyson.** 1999. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2042-2047.
153. **Vincent, S., D. Gerlier, and S. N. Manie.** 2000. Measles virus assembly within membrane rafts. *J Virol* **74**:9911-9915.
154. **Walmsley, A. R., F. Zeng, and N. M. Hooper.** 2003. The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. *J Biol. Chem.* **278**:37241-37248.
155. **Wegner, C., A. Romer, R. Schmalzbauer, H. Lorenz, O. Windl, and H. A. Kretzschmar.** 2002. Mutant prion protein acquires resistance to protease in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol* **83**:1237-1245.
156. **Weiss, R. A.** 1993. Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry, p. 1-108. *In* J. A. Levy (ed.), *Retroviridae*.

157. **Wells, G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, and R. Bradley.** 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* **121**:419-420.
158. **Wickersham, I. R., S. Finke, K. K. Conzelmann, and E. M. Callaway.** 2007. Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus. *Nat. Methods* **4**:47-49.
159. **Wickersham, I. R., D. C. Lyon, R. J. Barnard, T. Mori, S. Finke, K. K. Conzelmann, J. A. Young, and E. M. Callaway.** 2007. Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. *Neuron* **53**:639-647.
160. **Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, and P. G. Smith.** 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**:921-925.
161. **Wong, L. F., M. Azzouz, L. E. Walmsley, Z. Askham, F. J. Wilkes, K. A. Mitrophanous, S. M. Kingsman, and N. D. Mazarakis.** 2004. Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system. *Mol. Ther.* **9**:101-111.
162. **Wyatt, L. S., B. Moss, and S. Rozenblatt.** 1995. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology* **210**:202-205.
163. **Yoshimori, T., P. Keller, M. G. Roth, and K. Simons.** 1996. Different biosynthetic transport routes to the plasma membrane in BHK and CHO cells. *J Cell Biol.* **133**:247-256.
164. **Young, J. A., P. Bates, and H. E. Varmus.** 1993. Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. *J Virol* **67**:1811-1816.
165. **Zarrinpar, A. and E. M. Callaway.** 2006. Local connections to specific types of layer 6 neurons in the rat visual cortex. *J Neurophysiol.* **95**:1751-1761.
166. **Zhang, J., A. Pekosz, and R. A. Lamb.** 2000. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol* **74**:4634-4644.
167. **Ziegler, R. J. and R. S. Pozos.** 1981. Effects of lectins on peripheral infections by herpes simplex virus of rat sensory neurons in culture. *Infect. Immun.* **34**:588-595.
168. **Zigas, V. and D. C. Gajdusek.** 1957. Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med. J Aust.* **44**:745-754.
169. **Zou, Z., L. F. Horowitz, J. P. Montmayeur, S. Snapper, and L. B. Buck.** 2001. Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature* **414**:173-179.

8. Anhang

8.1. Publikation

- I. **Klingen, Y., K. K. Conzelmann, and S. Finke.** 2008. Double-Labeled Rabies Virus Live tracking of enveloped virus transport. *J Virol* **82**:237-245.

8.2. Danksagung

Ich danke Prof. Karl-Klaus Conzelmann für die hervorragende Betreuung der Arbeit, die hilfreichen Anregungen in schwierigen Phasen der Doktorarbeit und dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in München promovieren zu können.

Dr. Stefan Finke danke ich dafür, mir das Projekt zur Untersuchung des Tollwutvirustransportes gegeben zu haben, und für seine gute theoretische und praktische Einweisung in dieses Projekt, vor allem in die konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie und ganz besonders in das *live cell imaging*.

PD Dr. Bettina Kempkes danke ich für die Bereitschaft meine Doktorarbeit zu betreuen, mich vor der Biologischen Fakultät zu vertreten und für die hilfreichen Korrekturen meiner Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen meiner Arbeitsgruppe. Nadin gilt ein großes Dankeschön für ihre enorme praktische Hilfe und für ihre Engelsgeduld (Nadiiiii!) während meiner Einarbeitungszeit. Kris danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die vielen gemeinsamen Mittagspausen und seine moralische Unterstützung. Adriane danke ich für viele nette Gespräche und ihren großen Beitrag zur guten Arbeitsatmosphäre. Wäre noch den immer hungrigen Mensabesuchern Anika, Christian, Martina, Alex und Lisa für viele nette Mittagspausen und Laetitia für ihre hilfreichen Anregungen in den Arbeitsgruppenbesprechungen und natürlich für „Vine and Cheese“ zu danken.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Freunden. Mario, der mich viele Jahre super unterstützt hat und mir durch viele schwere Zeiten geholfen hat.

Sandra und Stefan für die vielen, netten Gespräche und ihre grosse Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Meinen Münchener Tierheim-Freunden Angie, Jutta, Ulli und Roger, die dafür gesorgt haben, dass es mir jetzt sehr sehr schwer fallen wird, München zu verlassen.

Anhang

Den TaeBoLern, allen voran Steffi und Angie für eine super Zeit, ihre Geduld, wenn ich mal wieder schlechte Laune hatte und viele nette Gespräche; hauptsächlich natürlich zum Thema Hunde und Tierheim.

Den „Bochumern“ für eine tolle Zeit im Ruhrpott und viele gemeinsame Holland/Belgien-Touren.

Mein allergrößter Dank gilt jedoch meinen Eltern Ela und Paul, die mich in jeder Hinsicht vollkommen unterstützt haben, mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und nie aufgehört haben, an mich zu glauben.

8.3. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Yvonne Klingen

Geburtsdatum

12.12.1975

Geburtsort

Köln

Ausbildung:

März 2004 – Juli 2008

Promotionsarbeit zum Thema: Rhabdovirus Envelope-Switching: Untersuchungen zum Tropismus und Transport von Rabies Viren am Max von Pettenkofer-Institut & Genzentrum der LMU München

Juli 2002 – Februar 2004

Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abt. für Mol. und Med. Virologie der Ruhr-Universität Bochum

Januar 2002 – Mai 2002

Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Genetik der Universität zu Köln

Dezember 2000 - November 2001

Diplomarbeit zum Thema: Zur Rolle der Protease Lon im Silencing des *E.coli bgl*-Operons, am Institut für Genetik der Universität zu Köln, Abschluss mit Diplom (Gesamtnote: sehr gut)

Oktober 1995 - Januar 2002
1986 - 1995

Studium der Biologie an der Universität zu Köln
Städt. Schiller-Gymnasium in Köln, Abschluss mit Abitur

Publikationen:

Dole, S., **Klingen, Y.**, Nagarajavel and Schnetz, K. 2004. The protease Lon and the RNA-binding protein Hfq reduce silencing of the *Escherichia coli bgl* operon by H-NS. *J Bacteriol.* **186**: 2708-16,

Madhusudan, S., Paukner, A., **Klingen, Y.** and Schnetz, K. 2005. Independent regulation of H-NS-mediated silencing of the *bgl* operon at two levels: upstream by BglJ and Leuo and downstream by DnaKJ. *Microbiology.* **151**: 3349-59

Klingen, Y., K. K. Conzelmann, and S. Finke. 2007. Double-Labeled Rabies Virus Live tracking of enveloped virus transport. *J Virol.*

Präsentationen

Vortrag

03.2006

Deutsche Gesellschaft für Virologie, Jahrestagung in München

Posterpräsentation

03.2005

SFB455 Retreat Wildbad Kreuth

03.2005

Deutsche Gesellschaft für Virologie, Jahrestagung in Hannover

06.2007

SFB455 Junior Fakultät Retreat, Waging am See

11.2007

Deutsche Gesellschaft für Virologie, Europäische Tagung in Nürnberg

8.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Mein Beitrag zu der Publikation Klingen et al., 2007:

Die Fragestellung wurde von K. C. und S. F. formuliert. Die Experimente wurden von mir und S. F. geplant, und sind von mir durchgeführt worden, unter Einbeziehung von Reagenzien und Viren, die S. F. mir zur Verfügung stellte. Die Daten wurden von mir, S.F. und K.C. analysiert. Die Publikation wurde von mir und S.F. geschrieben und von K.C. redigiert.

München, 23.07.08

(Yvonne Klingen)