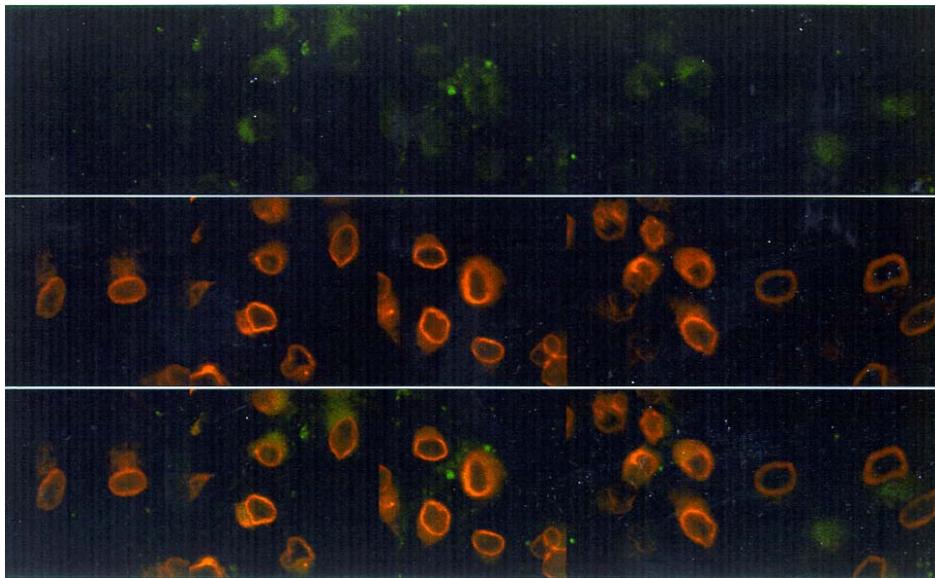


Funktionelle Charakterisierung des Parvovirus H-1 Capsids während des Infektionsvorganges



INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Holger Ahrens
geboren in Gelnhausen

Gießen 2006

Funktionelle Charakterisierung des Parvovirus H-1 Capsids während des Infektionsvorganges

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin der

Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Holger Ahrens

geboren in Gelnhausen

Gießen 2006

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
Institut für Medizinische Virologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. Wolfram Gerlich
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael Kann
Zweiter Gutachter: HDoz Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 14.12.2006

Meinen Eltern

Es irrt der Mensch, so lang er strebt.

Johann Wolfgang Goethe
Faust I

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Einheiten.....	1
1. Einleitung	2
Literaturzusammenfassung	3
1.1 Endozytose	3
1.1.1 Modifikation der Endozytose durch Störung des pH Gradienten	4
1.2 Das Cytoskelett.....	5
1.3 Viraler Eintritt in die Wirtszellen.....	6
1.3.1 Bindung an Membranrezeptoren	6
1.3.2 Zelleintritt.....	7
1.3.3 Cytoplasmatischer Transport und nukleärer Import	8
1.4 Parvoviridae.....	9
1.4.1 Taxonomie	9
1.4.2 Parvovirus H-1.....	11
1.4.3 Klinische Manifestationen.....	11
1.4.4 Autonome Parvoviren in der onkolytischen Gentherapie.....	12
1.4.5 Genom	12
1.4.6 Die viralen Strukturproteine	13
1.4.7 Die Nicht-Strukturproteine	15
1.4.8 Morphologie und Struktur	17
1.5 Lebenszyklus des Parvovirus.....	18
1.5.1 Zell Rezeptoren	18
1.5.2 Aufnahme des Parvovirus in die Zelle.....	19
1.5.3 Cytoplasmatischer Transport und nukleärer Import	22
1.5.4 Virale DNA Freisetzung aus dem Capsid und Initiation der Replikation	24
1.5.5 DNA Replikation, Genexpression und Assemblierung	24
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Material.....	29
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.2 Chemikalien	30
2.1.3 Enzyme.....	30
2.1.4 Antikörper	31
2.1.5 Molekulargewichtsmarker	31
2.1.6 Plasmide	31
2.1.7 Sonden und Primer.....	31
2.1.8 Bakterien.....	31
2.1.9 Zelllinien.....	32
2.1.10 Lösungen und Puffer.....	32
2.2 Methoden	35
2.2.1. Eukaryonte Zellkultur	35
2.2.1.1 Lagerung, Inkulturnahme und Kultivierung von Zellen	35
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl	35
2.2.2 S7 Nuklease Verdau von Parvo H-1 Viren	35
2.2.3 Desintegration von H-1 Capsiden durch Harnstoff	36
2.2.4 Parvovirus H-1 Infektion.....	36

2.2.5	Berechnung des Virustiters mit der Endverdünnungsmethode nach Spearman/Kärber	36
2.2.6	Infektionsinhibition durch lysosomtrophe Agentien	37
2.2.6.1	NH ₄ Cl	37
2.2.6.2	Bafilomycin A ₁	37
2.2.7	Inhibition der Caveolaeformation durch Nystatin	37
2.2.8	Isolierung von Zellkompartimenten	38
2.2.8.1	Isolierung des Zellüberstandes	38
2.2.8.2	Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin	38
2.2.8.3	Karyoplasmaisolation durch Tx100 Behandlung	38
2.2.9	Dichtegradientenzentrifugation von Zellkompartimenten und H-1 Genom	39
2.2.9.1	Dichtegradientenzentrifugation in Sucrose	39
2.2.10	Aufreinigung viraler DNA	39
2.2.10.1	DNA Aufreinigung durch Proteinase K Verdau	39
2.2.10.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	39
2.2.10.3	Ethanol-Präzipitation zum Fällen von DNA	40
2.2.10.4	Aufschluss von Virus Capsiden durch NaOH Denaturierung	40
2.2.10.5	Einengung von Proben durch Filtration	40
2.2.11	Nachweismethoden und Quantifizierung viraler DNA	41
2.2.11.1	Dot Blot	41
2.2.11.2	Agarosegelelektrophorese	41
2.2.11.3	Nachweis von Nukleinsäuren im Agarosegel mit Ethidiumbromid-Färbung ...	42
2.2.11.4	Southern Blot	42
2.2.11.5	Herstellung einer radioaktiven Sonde	43
2.2.11.6	Hybridisierung des Dot Blot und Southern Blot mit $\alpha^{32}\text{P}$ markierter Plasmidsonde	43
2.2.11.7	Darstellung und Quantifizierung der Virus DNA auf dem Dot - und Southern Blot	44
2.2.11.8	Pavovirus H-1 Real-Time-PCR mit dem Light-Cycler	44
2.2.11.9	Parvovirus H-1 DNA Nachweis mit der Pavovirus H-1-Real-Time-PCR	46
2.2.12	Darstellung und Quantifizierung von Proteinen	49
2.2.12.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli	49
2.2.12.2	Coomassie-Färbung und Entfärbung zur Proteindarstellung	49
2.2.12.3	Western-Blot zur Darstellung der VP2 Capsidproteine	49
2.2.12.4	Immunpräzipitation des Protein NS1 aus desintegrierten Capsiden mit Dynabeads	50
2.2.12.5	Bindungsassay zur Darstellung von H-1 Capsiden während des Infektionsvorganges	51
2.2.12.5.1	Konfokale Laserscan-Mikroskopie	52
2.2.13	Zellfotographien von infizierten Zellen	53
3.	Ergebnisse	54
3.1	Charakterisierung der Nachweismethoden	54
3.1.1	Hybridisierung nach Dot Blot	54
3.1.2	Hybridisierung nach Southern Blot	56
3.1.3	PCR	58
3.2	Charakterisierung der eingesetzten Viren	63
3.2.1	Untersuchung auf Degradierbarkeit des Parvovirus H-1 Genoms durch S7 Nuklease-Behandlung mit PCR und Southern Blot	63
3.2.1.1	PCR-Analyse	63
3.2.1.2	Southern Blot-Analyse	66

3.2.2.	Analyse auf Phenol-Extrahierbarkeit der H-1 Genome nach in vitro Genom-freisetzung aus dem Capsid.....	68
3.2.3	Fehlende Immunpräzipitation des H-1 Genom mit α NS1 nach in vitro Genom-freisetzung aus dem Capsid.....	72
3.2.4	Infektion von HeLa-Zellen mit unbehandelten und Nuklease vorbehandelten H-1 Virus	77
3.2.5	Relative Infektiösität des Parvovirus H-1 mit und ohne S7 Nuklease Einfluss	78
3.2.6	Zusammenfassung	79
3.3	Aufnahme Kinetik des Parvovirus H-1.....	81
3.3.1	NB-K Infektionskinetik.....	81
3.3.2	HeLa Infektionskinetik.....	84
3.3.3	Untersuchung auf Degradierbarkeit des Parvovirus H-1 Genoms von infizierenden Viren und Nachkommenviren.....	86
3.3.4	Analyse der intrazellulären H-1 Genomverteilung	88
3.3.5	Zusammenfassung der Infektionskinetiken	89
3.4	Charakterisierung der viralen genomhaltigen Komponenten während der Aufnahme in die Zelle.....	90
3.4.1	Untersuchung von H-1 Virus und H-1 Genom im Sucrosegradienten.....	90
3.4.2	Untersuchung der viralen genomhaltigen Komponenten im Sucrose Gradienten.....	91
3.4.3	Untersuchung der Parvovirus H-1 Infektiösität in Gegenwart von Bafilomycin A ₁ und Nystatin.....	96
3.4.4	Immunfluoreszenzuntersuchung von H-1 Capsiden während der Infektion	98
4.	Diskussion	100
4.1	Nachweismethoden der Parvovirus H-1 DNA	100
4.2	Charakterisierung des H-1 Virus.....	100
4.3	Infektionskinetik des Parvovirus H-1	103
4.3.1	Kinetik der Rezeptor vermittelten Aufnahme des Parvovirus H-1	103
4.3.2	Aufnahmeweg des Parvovirus H-1	104
4.3.3	Entpackungsvorgang des Parvovirus H-1 Genom während der Aufnahme	106
4.3.4	Ausschluss einer Caveolae-vermittelten Aufnahme des Parvovirus H-1 in die Zelle.....	107
4.4	Charakterisierung der viralen genomhaltigen Komponenten während der Aufnahme in die Zelle durch Dichtegradientenzentrifugation	108
4.4.1	Dichteanalyse der cytosolischen Viruspartikel	108
4.4.2	Dichteanalyse der karyoplasmatischen Viruspartikel	109
4.4.3	Dichteanalyse der Viruspartikel unter Infektionsinhibition in Gegenwart von NH ₄ Cl.....	109
4.5	Darstellung von H-1 Capsiden während der Infektion durch Immunfluoreszenz.....	111
5.	Zusammenfassung	112
	Literaturverzeichnis	115

Abkürzungen und Einheiten

AAV	Adeno assoziiertes Virus	MVM	Minute virus of mice
AK	Antikörper	MW	molecular weight
AS	Aminosäure		Molekulargewicht
bp	Basenpaare	nt	Nukleotide
BSA	Bovines Serum Albumin	NLM	Kern-Lokalisations-Motiv
ccc	covalently closed circular	NLS	nuclear localization signal,
CCV	Clathrin coated vesicle		Kerntransport-Signal
CPV	Canines Parvovirus	NP-40	Nonidet P-40
C-Terminus	Carboxyterminus	NS1/NS2	Nicht-Struktur-Protein 1/2
Da	Dalton	oc	open circular
DMEM	DULBECCOs Modified Essential Medium	ORF	open reading frame, Offener Leserahmen
DMSO	Dimethylsulfoxid	PAGE	Polyacrylamid Gelelektro- phorese
ds	double stränded, doppelsträngig	PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
DTT	Dithiothiothreithol	PLA ₂	Phospholipase A ₂
EBV	Epstein-Barr-Virus	PPV	Porcine parvovirus
ECL	enhanced chemoluminescence, verstärkte Chemolumineszenz	PVDF	Polyvinylendifluorid
E. coli	Escherichia coli	RRL	Rabbit Reticulocyte Lysate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		Kaninchen-Retikulozyten-Lysat
EE	early endosome = frühes Endosom	RS-Virus	respiratory syncytial virus
EGTA	[Ethylenbis(oxyethylennitriol)]- tetraaceticacid	SDS	Sodiumdodecylsulfat
ER	endoplasmatisches Retikulum	ss	single stranded, einzelsträngig
ERC	endozytotisches Recycling Kompartiment	SV40	simian virus 40
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat	TGN	Trans-golgi-Apparat
FKS	Fötales Kälberserum	TNE	TRIS Natrium EDTA
FPC	Felines Parvovirus	TP	Transportpuffer
		TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
HRV14	humanes Rhinovirus 14	U	Unit
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1	v/v	volume/volume, Volumenprozent
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation	Well	Probenvertiefung der ELISA- Platte
LE	late endosome = spätes Endosom	WGA	wheat germ agglutinin Weizenkeim-Agglutinin
MEV	Mink enteritis virus	w/v	weight/volume, Gewicht pro Volumen
MG	Molekulargewicht	w/w	weig/weight, Gewichtsprozent

Alle hier nicht aufgeführten Einheiten sind SI- bzw. nicht erweiterte SI-Einheiten. Die letzte Stelle aller angegebenen Werte ist gerundet.

Ribonukleinsäure und Desoxyribonukleinsäure sind wie in der Lieratur gebräuchlich abgekürzt.

Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code abgekürzt.

1. Einleitung

Viren sind intrazelluläre Parasiten, die sich grundlegend von Mikroorganismen unterscheiden, indem sie keinen eigenen Stoffwechsel haben und für ihre Replikation auf die Syntheseleistung einer lebenden Wirtszelle angewiesen sind. Während der Evolution haben sie verschiedene Strategien entwickelt, Zellen zu infizieren. Auf zellulärer Ebene beginnt jede Infektion mit der Adsorption der Zelle an Zelloberflächenrezeptoren, gefolgt von einer Aufnahme in das Innere der Zelle (Penetration). Anschließend müssen weitere Schritte des Infektionszyklus eingeleitet werden. In diesem Zusammenhang gehören zu den weitgehend noch ungeklärten Prozessen die Freisetzung der viralen Nukleinsäure aus der viralen Hülle oder dem viralen Nukleocapsid (Uncoating) und der Transport des viralen Genoms und anderer notwendiger Proteine zum Ort der Replikation. Da Genomfreisetzung und -transport Veränderungen der viralen Struktur erfordern, ist die Infektion gewöhnlich ein komplexer Prozess, der verschiedene virale und zelluläre Komponenten einbezieht.

Parvoviren sind weitverbreitete Viren und kommen bei praktisch allen Tierarten und beim Menschen vor. Sie gehören mit einem Durchmesser von 18 bis 26 nm zu den kleinsten DNA Viren. Das ikosaedrische Viruspartikel setzt sich aus 2-3 Capsidproteinen (VP1, VP2, VP3) zusammen, die das einzelsträngige 4500 bis 5000 Nukleotid lange DNA-Genom enthalten. Die virale Replikation und Synthese neuer Parvoviren hängt von zellulären Hilfsfunktionen sich teilender Zellen ab, wie z.B. der zellulären DNA-Polymerasen α oder δ , wobei die Freisetzung von Nachkommenviren meist mit Lyse der Zellen vergesellschaftet ist.

Der Zellinfektionsprozess der Parvoviren zeigt viele Merkmale anderer Viren, die sich im Zellkern replizieren. Da das virale Genom unabhängig von der Zellteilung in den Kern aufgenommen wird, muss dieses durch die Kernporen in den Zellkern transportiert werden. Da Nukleinsäuren an sich nicht karyophil sind, müssen Virus-Proteine mit den physiologischen Kerntransportrezeptoren in Wechselwirkung treten. Es ist nicht bekannt in welchem Zellkompartiment das parvovirale Genom freigesetzt wird und welches Protein den zellulären Import des viralen Genoms vermittelt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Infektionsvorgang des Parvovirus H-1, in der geklärt werden soll, in welchem Zellkompartiment das parvovirale Genom freigesetzt wird, und versucht, Veränderungen des Parvovirus H-1 während der Infektion zu beschreiben, die zur Exposition eines Kerntransportsignals (NLS) führen könnten und zum Transport des Virusgenoms in den Zellkern beitragen.

Im Folgenden wird eine Übersicht über zelluläre Funktionen gegeben, die in den Infektionsweg der Viren in den Zellkern einbezogen sind. Weiterhin werden bisherige Kenntnisse über Parvoviren und deren Infektionszyklus zusammenfassend dargestellt.

Literaturzusammenfassung

1.1 Endozytose

Der endozytotische Membrantransport in tierischen Zellen spielt eine essentielle Rolle im intrazellulären Transport von Membrankomponenten, Rezeptor assoziierten Liganden und löslichen Molekülen. Es existieren mehrere bekannte Mechanismen der Aufnahme von Molekülen durch Deformation der Zelloberfläche unter Bildung von endozytotischen Kompartimenten. Der am besten charakterisierte endozytotische Prozess – die Rezeptor vermittelte Endozytose – beginnt mit der Formation von „Clathrin coated pits“ (Mukherjee, Ghosh et al. 1997) . Dem gegenüber ist ca. die Hälfte aller Aufnahmeprozesse nicht Clathrin vermittelt. Zu diesen Mechanismen zählen u.a. die Phagozytose, die Formation von Caveolae, das „membrane ruffling“ und die Aufnahme über „non clathrin coated pits“ (Araki, Johnson et al. 1996; Morrissette, Gold et al. 1999; Sandvig and van Deurs 2002; Parton 2003). Durch Rezeptor vermittelte Endozytose werden neben physiologischen Liganden auch opportunistische Liganden, wie Viren und Toxine in die Zelle aufgenommen (Marsh 1984).

Die Clathrin vermittelte Endozytose ist der Hauptweg für selektive Aufnahme von plasmamembranständigen Rezeptoren und Liganden (Simonsen, Wurmser et al. 2001) (Abb. 1). Einige Rezeptoren treten an der Plasmamembran in Regionen zusammen, die als „coated pits“ bezeichnet werden. Die Rezeptor vermittelte Endozytose beginnt mit der Einstülpung eines coated pit. Hierzu werden Clathrin und das Clathrin Adapterprotein 2 (AP2) an der Plasmamembran angereichert. Die Adapterproteine binden die Clathrin Hüllproteine und ein spezifisches Motiv in der cytoplasmatischen Domäne des Membranrezeptors, wodurch Clathrin ein Gitterwerk um das coated pit formt und es unter Bildung eines umhüllten Vesikels (Clathrin coated vesicle = CCV) von der Plasmamembran löst. An der Abknospung des CCV von der Plasmamembran sind die GTPase Dynamin und andere Effektor-Proteine beteiligt (Hinshaw 2000; Marsh 2001). Das CCV verliert innerhalb von 1 – 3 min seine Clathrinhülle (Mellman 1996) und wird zum endosomalen Vesikel (Lemmon 2001; Ma, Greener et al. 2002). Dieses fusioniert mit anderen Endosomen und präexistenten Sorting Endosomen in einem Prozess der teilweise durch Rab Proteine (GTPase Regulator Proteine), EEA1 (early endosome antigen 1) und SNARE Proteine („soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor“) reguliert wird (Clague 1999; Mills, Jones et al. 1999; Woodman 2000). Dieser Vorgang dauert in etwa 1-2 min. Die Sorting Endosomen sind mehr peripher lokalisiert, von tubulär-vesikulärer Struktur und haben einen pH von ~6 (Johnson, Dunn et al. 1993; Presley, Mayor et al. 1997). Sie sind die erste Verzweigungsstelle im Rezeptor vermittelten Endozytoseweg, von der drei bekannte Wege ausgehen – zur Plasmamembran, zu den späten Endosomen (LE) und zum endozytotischen Recycling Kompartiment (ERC), dessen Verteilung in verschiedenen Zelltypen variiert (Lin, Gundersen et al. 2002) (Abb. 1). Sorting Endosom und ERC werden häufig als frühe Endosomen (EE) bezeichnet, sind jedoch zwei verschiedene endosomale Kompartimente. Durch den niedrigen pH im Sorting Endosom (pH 5,9 - pH 6)

dissoziieren viele Liganden von ihrem Rezeptor. Auf dem Recycling-Weg werden Rezeptor und Membranmoleküle in ca. 2 min zurück zur Plasmamembran transportiert. Teilweise werden sie auch erst zum ERC transportiert und anschließend zurück zur Plasmamembran, ein Vorgang der ca. 12 min dauert (Mayor, Presley et al. 1993). Das aufgenommene Material, das nicht für den Wiedergebrauch bestimmt ist, verbleibt in den Sorting Endosomen nur für 5 – 10 min, bevor diese entlang Mikrotubuli weiterwandern, saure Hydrolasen anreichern und Eigenschaften der späten Endosomen (LE) annehmen, ein Prozess der auch als Reifung bezeichnet wird. Andere Moleküle werden von den Sorting Endosomen über das ERC zum Trans Golgi Apparat (TGN) geleitet und von dort weiter zu den späten Endosomen.

Die späten Endosomen können als intermediäre Strukturen im Transportweg von endozytotisch aufgenommenen Molekülen, lysosomalen Hydrolasen und Membranproteinen zu den Lysosomen bezeichnet werden. Die späten Endosomen (LE; pH 5-6) unterscheiden sich von Sorting Endosomen (pH 5,9-6) und ERC (pH 6,4-6,5) durch einen niedrigeren luminalen pH, unterschiedliche Proteinzusammensetzung und verschiedene GTPasen der Rab Familie (Somsel Rodman and Wandinger-Ness 2000). Außerdem erhalten die späten Endosomen ihren Inhalt nicht direkt von der Plasmamembran und sind nicht in den endozytotischen Haupt-Recycling-Weg einbezogen. Von den späten Endosomen schließt sich der Transport zu den Lysosomen an, in denen der pH noch niedriger ist (pH 5-5,5). LE und Lysosomen bestehen aus lysosomalen Membranproteinen und haben durch niedrigen pH und Gehalt an sauren Hydrolasen eine degradative Funktion.

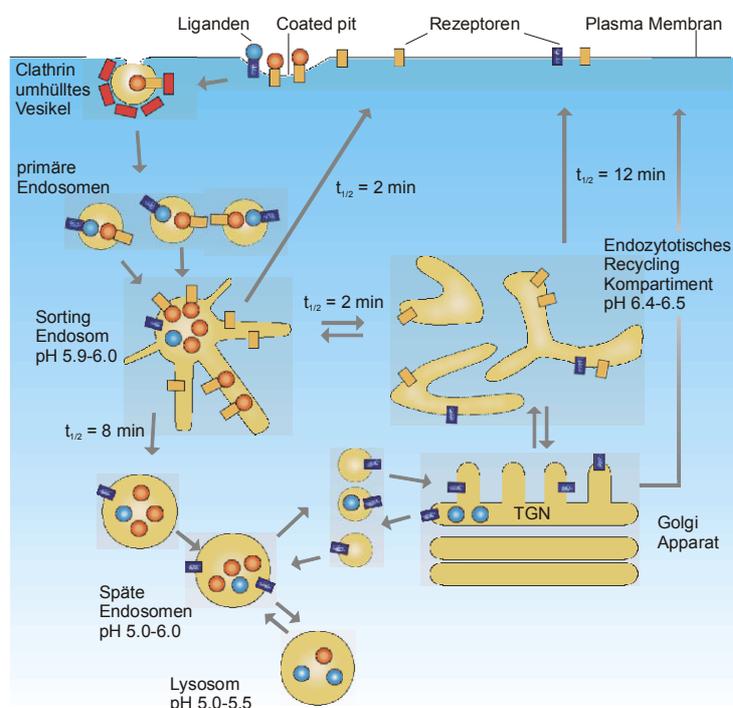


Abb. 1 Schematisches Modell der endozytotischen Recyclingwege
(modifiziert nach Maxfield & McGraw 2004)

1.1.1 Modifikation der Endozytose durch Störung des pH Gradienten

Für Rezeptor vermittelte Endozytose und Rezeptor-Recycling ist ein saurer luminaler pH der Endosomen essentiell (Pillay, Elliott et al. 2002). Manche Membran-Transporter (z.B. der lysosomale Cysteintransporter) und lysosomale Hydrolasen sind nur unter sauren Bedingungen funktionell (Gahl and Tietze 1985; Pisoni and Thoene 1991; Hasilik 1992). Die saure Umgebung wird durch vakuoläre ATP-abhängige Protonen-Pumpen (v-Typ H^+ -ATPasen) und Redox Reaktionen hergestellt, die das Lumen der Vesikel mit Protonen anreichern (Mellman 1996;

Pillay, Elliott et al. 2002). Neben diesen Mechanismen regulieren noch Na^+/H^+ -Austauscher und Cl^- -Kanäle den pH der Endosomen (Al-Awqati 1986; Cain, Sipe et al. 1989; Fuchs, Schmid et al. 1989; Mukherjee, Ghosh et al. 1997; Pillay, Elliott et al. 2002).

Es gibt viele Komponenten, die den pH oder das Ionen Gleichgewicht der endozytotischen Vesikel verändern, und zu reduzierten Endozytoseraten und Inhibition des Rezeptor-Recycling führen, was z.B. die Inhibition der Diphtherie-Toxin-Toxizität oder reduzierte Infektiösität mancher Viren verursacht (Umata, Moriyama et al. 1990; Perez and Carrasco 1994; van Weert, Dunn et al. 1995; Pless and Wellner 1996; Presley, Mayor et al. 1997; Chemello, Aristimuno et al. 2002; Meier, Boucke et al. 2002; Pillay, Elliott et al. 2002)

Durch NH_4Cl -Behandlung der Zellen wird der niedrige pH der endozytotischen Kompartimente neutralisiert, in dem die H^+ -Ionen in den Endosomen gebunden werden. Eine direkte Inhibition der Endozytose wird dadurch nicht verursacht.

Eine der am besten untersuchten Substanzen, die die Endozytose modifizieren, ist Bafilomycin A_1 . Bafilomycin A_1 ist ein spezifischer Inhibitor vakuolärer H^+ -ATPasen, die einen niedrigen luminalen pH in endozytotischen und exozytotischen Kompartimenten bewirken (Pressman 1976; Mellman 1996; Pillay, Elliott et al. 2002). Als Konsequenz dieser Inhibition hat Bafilomycin A_1 sekundäre Effekte. Dazu gehören Inhibition der Rezeptor-Liganden-Dissoziation, wie z.B. für den Mannose-Rezeptor gezeigt wurde (Harada, Shakado et al. 1997), Inhibition der Reifung der Sorting Endosomen zu späten Endosomen (LE) (Clague, Urbe et al. 1994), verzögertes Rezeptor-Recycling, das von einem Peptidmotiv in der cytoplasmatischen Rezeptordomäne abhängig ist (Johnson, Dunn et al. 1993; Presley, Mayor et al. 1997), Inhibition der Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen (van Weert, Dunn et al. 1995) und Fragmentierung der Sorting Endosomen (D'Arrigo, Bucci et al. 1997). Diese sekundären Effekte sind teilweise vom Zelltyp abhängig (Bayer, Schober et al. 1998). In BHK Zellen inhibiert Bafilomycin A_1 die Reifung der Sorting Endosomen (Clague, Urbe et al. 1994; Aniento, Gu et al. 1996) während es im Gegensatz dazu in Hep-G2 Zellen den Transport von späten Endosomen zu Lysosmen blockiert, ohne den Endozytoseprozess bis zu den späten Endosomen zu beeinflussen (van Weert, Dunn et al. 1995).

1.2 Das Cytoskelett

Sowohl cytoplasmatischer Transport als auch Zellmorphologie beruhen auf einem gitterartigen Netzwerk von cytosolischen Filamenten, den Mikrotubuli, Intermediär- und Aktinfilamenten (Sodeik 2000). Diese Struktur ermöglicht vermutlich die Organisation der endozytotischen Maschinerie, Membranspaltung und Vesikelbewegung (Marsh 2001).

Mikrotubuli sind hohle Zylinder mit einem Durchmesser von 25 nm, die gegenüber Biegung und Kompression sehr resistent sind. Sie bestehen aus α - und β -Heterodimeren der GTPase Tubulin und haben ein hoch dynamisches Plus-Ende, das in die Zellperipherie ausgerichtet ist,

und ein gering dynamisches Minus-Ende, das perinukleär am Mikrotubuli Organisierungszentrum („microtubule organizing center“, MTOC) lokalisiert ist (Mandelkow and Mandelkow 1995; Sodeik 2000). Der direkte Transport von zellulären Komponenten entlang Mikrotubuli ist an die Motor-Protein-Komplexe Dynein und Kinesin gebunden oder erfolgt durch Polymerisation oder Filamentverkürzung. Durch ihre polarisierte Struktur können die Motor-Proteine die Richtung des intrazellulären Transportes bestimmen.

Aktin-Filamente sind flexibler und kürzer als Mikrotubuli und haben einen Durchmesser von 5-9 nm. Sie sind unterhalb der Plasmamembran der Zellen stark angereichert und weisen wie Mikrotubuli eine polarisierte Struktur auf.

Intermediärfilamente umfassen die dritte Familie fibröser Proteine. Ihr Durchmesser beträgt 8-10 nm. Intermediärfilamente sind intrazellulär wie Mikrotubuli verteilt, haben aber keine polarisierte Struktur. Sie haben Bedeutung aufgrund ihrer Resistenz gegenüber mechanischen Stress und unterliegen einer hohen Dynamik.

1.3 Viraler Eintritt in die Wirtszellen

Während des Zelleintritts müssen Viren mehrere Barrieren überwinden, um eine produktive Infektion zu etablieren. Viele Viren binden an Membranrezeptoren der Zelloberfläche, um aufgenommen zu werden. Anschließend müssen sie entweder durch die Plasmamembran oder nach endozytotischer Aufnahme durch die endosomale Membran penetrieren, um in das Cytosol und weiterhin zum Ort der viralen Genomreplikation zu gelangen. Dazu müssen die Capside zerfallen, damit die Replikation und virale Proteinexpression starten kann (Whittaker and Helenius 1998; Whittaker, Kann et al. 2000).

1.3.1 Bindung an Membranrezeptoren

Viren benutzen verschiedene Zelloberflächenmoleküle als Rezeptoren, um an die Zelle zu binden und aufgenommen zu werden. Als virale Rezeptoren dienen Proteine, Kohlenhydratrezeptoren und Glycolipide (Knipe 1996). Die Rezeptorbindungsstelle des Virus variiert abhängig vom Virus. Umhüllte Viren binden den Zelloberflächenrezeptor durch ihr Hüllenglycoprotein (Grewe, Beck et al. 1990), während nicht umhüllte Viren Vertiefungen, Schleifenstrukturen oder Vorsprünge des Capsids als Bindungsstelle für den Rezeptor benutzen (Marsh and Helenius 1989). Manchen Viren, wie dem Adenovirus, dienen mehrere Rezeptoren, um in die Zelle zu gelangen. Adenoviren benutzen Rezeptoren zum Andocken an die Zelle (Coxsackie-Adenovirus Rezeptor), zur Aufnahme ($\alpha V\beta 5$ und $\alpha V\beta 3$ Integrine) und zur Penetration durch endosomale Membranen ($\alpha V\beta 5$ Integrin) (Wickham, Mathias et al. 1993; Bergelson, Cunningham et al. 1997; Tomko, Xu et al. 1997).

1.3.2 Zelleintritt

Zwei Mechanismen existieren für den Viruseintritt in die Zelle. Entweder erfolgt die virale Zellaufnahme durch Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran oder durch Rezeptor vermittelte Endozytose gefolgt von einer Penetration durch endosomale Membranen (White, Kielian et al. 1983; McClure, Marsh et al. 1988) (Nussbaum, Roop et al. 1993). Viele Viren nehmen den endozytotischen Weg, weil sie während der Zellaufnahme einem niedrigen pH ausgesetzt sein müssen. Das Influenza Virus und das Semliki Forest Virus sind umhüllte Viren, die den niedrigen pH (< 6) in den Endosomen benötigen, damit ihr Glycoprotein-Spike-Komplex Konformationsänderungen unterläuft und die Virushülle mit der endosomalen Membran fusionieren kann (Kielian and Helenius 1985; Bullough, Hughson et al. 1994). In Gegenwart von Substanzen, die diese endosomale Ansäuerung neutralisieren, wird die Infektion dieser Viren blockiert (Matlin, Reggio et al. 1981; Kielian 1995; Glomb-Reinmund and Kielian 1998). Auch viele nicht umhüllte Viren werden durch pH anhebende Substanzen, z.B. Bafilomycin A₁, beeinflusst. Z.B. ist die Exposition bei sauren pH für eine produktive Infektion von ADV2 (Varga, Weibull et al. 1991), Rhinoviren (Prchla, Kuechler et al. 1994) und Reoviren (Martinez, Guinea et al. 1996) notwendig. Bei manchen pH-abhängigen Viren wird die Infektion durch sekundäre Effekte der pH anhebenden Substanzen auf endosomale Proteasen-Aktivierung oder auf den Endozytose-Prozess, über den die viralen Partikel aufgenommen werden, inhibiert (Clague, Urbe et al. 1994; Authier, Posner et al. 1996; Bayer, Schober et al. 1998). Gewöhnlich werden vom endosomalen pH abhängige Viren durch Clathrin vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen, wodurch der Virustransport in angesäuerten Organellen sichergestellt wird (Marsh and Pelchen-Matthews 2000). Dabei gehen die meisten Viren in das Cytoplasma über, noch bevor die späten Endosomen mit den Lysosomen fusionieren, um nicht dem sauren Lysosomenmilieu ausgesetzt zu sein, der zur Inaktivierung des Virus führen würde (Marsh and Helenius 1989). Es gibt aber auch Viren wie die Reoviren, die eine lysosomale Proteolyse für eine produktive Infektion brauchen (Sturzenbecker, Nibert et al. 1987). Manche pH-unabhängige Viren z.B. EBV, Enten-Hepatitis B Virus und HRV14, nutzen den endozytotischen Weg, um Vorteile des Transports zu haben (Marsh and Pelchen-Matthews 2000). Neben der Rezeptor vermittelten Endozytose ist schließlich noch ein Caveolae-vermittelter Aufnahmeweg für manche Viren, z.B. SV40, RS-Virus, Filoviren, beschrieben worden (Anderson, Chen et al. 1996; Werling, Hope et al. 1999; Richterova, Liebl et al. 2001; Empig and Goldsmith 2002; Marjomaki, Pietiainen et al. 2002). SV40 wird hauptsächlich über Caveolae innerhalb von ca. 2 h in die Zelle aufgenommen (Anderson, Chen et al. 1996). Die Aufnahme von Liganden durch Caveolae ist charakteristischerweise langsam (Anderson, Kamen et al. 1992). Ca. 1/3 der Zell-assoziierten SV40-Partikel wird zum endoplasmatischen Retikulum transportiert, von dem aus die Viren jedoch keinen Zugang zu cytoplasmatischen Kernimportproteinen oder zum cytoplasmatischen Teil der Kernpore haben. Würde SV40 vom ER direkt in das Karyoplasma

übergehen, wäre dies einzigartig, da solch ein Weg in den Zellkern bisher nicht beschrieben wurde.

Nach einer endozytotischen Aufnahme von Viren müssen diese die endosomale Membran penetrieren, um in das Cytoplasma zu gelangen. Bei den umhüllten Viren wie z.B. dem Influenza Virus kommt es dabei zur Fusion zwischen viraler und zellulärer Membran. Die Membraninteraktion von nichtumhüllten Viren ist weniger bekannt, aber es erfolgt wahrscheinlich eine Virus-induzierte Ruptur oder Permeabilisierung der endosomalen Membran, wie bei mehreren Viren z.B. dem Adenovirus beobachtet wurde (Fernandez-Puentes and Carrasco 1980; Pastan, Seth et al. 1996).

1.3.3 Cytoplasmatischer Transport und nukleärer Import

Die meisten DNA-Viren (mit Ausnahme der Poxviren) und manche RNA-Viren, z.B. die Retroviren und Influenza-Viren replizieren im Zellkern, wo zelluläre Faktoren für Amplifikation und Transkription des Virusgenoms sowie für posttranskriptionelle Prozessierung der viralen mRNA gebraucht werden. Dafür müssen die Viren nach Penetration der zellulären Membranen durch das Cytoplasma zum teilweise weit entfernten Zellkern transportiert werden. Das Cytoplasma mit seinem gitterähnlichen Netzwerk aus cytoplasmatischen Filamenten, hoher Organellendichte und hoher Proteinkonzentration beschränkt die freie Diffusion von makromolekularen Komplexen auf eine Größe von 50 nm (Luby-Phelps 1994; Luby-Phelps 2000), sodass ein aktiver Transportprozess vorliegen muss. Viele Viren nutzen die cytosolischen Filamente (Mikrotubuli und Aktinfilamente), um sich von der Zellperipherie zum Kern zu bewegen. Das Vaccinia Virus und Listeria Bakterien werden im Cytosol abhängig von Aktin-Polymerisation fortbewegt (Cudmore, Reckmann et al. 1997; Ireton and Cossart 1997; Welch, Iwamatsu et al. 1997). Ein Mikrotubuli abhängiger Transport ist für viele Viren beschrieben worden, wobei dieser – wie z.B. für das Adenovirus (Suomalainen, Nakano et al. 1999; Leopold, Kreitzer et al. 2000; Suomalainen, Nakano et al. 2001) und Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) (Sodeik, Ebersold et al. 1997; Dohner, Wolfstein et al. 2002) gezeigt – durch Dynein vermittelt wird.

Viren haben zwei verschiedene Strategien, um in den Zellkern zu gelangen. Lentiviren z.B. verbleiben im Cytosol bis zur Mitose. Sie nutzen den vorübergehenden Verlust der Kernmembran aus, um Bestandteil des neugebildeten Kerns zu werden. Solche Viren können daher nur in mitotischen Zellen repliziert werden. Häufiger ist der Transport des viralen Genoms von infizierenden Viren durch die Kernmembran in der Interphase, wodurch die virale Replikation in nicht teilenden Zellen ermöglicht wird (Whittaker, Kann et al. 2000).

Der Kernporen Komplex (NPC, nuclear pore complex) spielt im viralen nukleären Importprozess eine entscheidende Rolle (Cotmore and Tattersall 1988; Whittaker, Kann et al. 2000; Cullen 2001). Der Kernporenkomplex ist ein Tunnel-ähnlicher Komplex, der eine Verbindung zwischen Cytosol und Karyoplasma herstellt und den Transport von Makromolekülen zwischen beiden

Kompartimenten kontrolliert (Pante and Aebi 1996). Sein Durchmesser beträgt ca. 39 nm (Pante and Kann 2002). Der aktive Kernimport wird durch nukleäre Transportrezeptoren (Importine oder Karyopherine) vermittelt (Gorlich and Mattaj 1996; Gorlich 1997). Der Transport viraler Genome zum Kern ist von Kern-Lokalisationssequenzen (nuclear localisation sequence; NLS) abhängig, die auf der Oberfläche der Viruscapside exponiert sind (Whittaker, Kann et al. 2000) und mit den Importinen in Wechselwirkung treten. Importin β bindet dann an die Kernporen, was zur Übertragung des intakten viralen Nukleocapsids oder einer anderen subviralen Struktur in den Kern führt, sofern diese klein genug ist. Kann das Nukleocapsid aufgrund seiner Größe nicht durch die Kernpore transportiert werden, muss es sich deformieren, um als Partikel-DNA-Komplex durch die Kernpore zu passen, oder es setzt die virale DNA – z.T. im Komplex mit viralen Proteinen - an der cytoplasmatischen Seite der Kernpore frei, um anschließend den Transport der viralen Nukleinsäure durch die Kernpore zu ermöglichen. So unterlaufen Influenza- oder Adenoviren vor dem Genomimport einer Deassemblierung mit Freisetzung eines Nukleoproteinkomplexes (Greber, Willetts et al. 1993). Herpesviren setzen ihr Genom an der Kernpore frei, in dem das Capsid an der Kernpore unter Beteiligung cytosolischer Faktoren und Energieaufwendung an einer Stelle geöffnet wird (Ojala, Sodeik et al. 2000), was anscheinend zu einer Form der Injektion des unter Spannung stehenden DNA-Genoms durch die Kernpore führt. Nur wenige Viren wie die Parvoviren sind klein genug und wären dadurch fähig, den NPC als intakte Formen passieren zu können (Whittaker, Kann et al. 2000).

1.4 Parvoviridae

1.4.1 Taxonomie

Die Familie der *Parvoviridae* gliedert sich in zwei Subfamilien: die *Parvovirinae*, die Vertebraten infizieren und die *Densovirinae*, die Insekten infizieren (Berns and Giraud 1996). Im folgenden werden nur die Parvovirinae besprochen. Parvovirinae sind weit verbreitete Viren und kommen bei praktisch allen Tierarten und beim Menschen vor. Sie unterteilen sich in drei Genera: *Parvovirus*, *Erythrovirus* und *Dependovirus*; letzteres auch bekannt als Adeno assoziiertes Virus (AAV).

Die Viren der Gattung *Parvovirus* sowie die *Erythroviren* sind autonom replizierende Viren, die nicht auf die Infektion eines Helfervirus angewiesen sind. Eine Integration autonomer Parvoviren in das Wirtszellgenom ist nicht bekannt. Sie benötigen Zellfunktionen, die während der S-Phase der zellulären DNA-Replikation zur Verfügung stehen, wie z.B. die zelluläre DNA-Polymerase α und/oder δ (Pritchard, Stout et al. 1981; Faust and Rankin 1982; Cossons, Faust et al. 1996), um selbst Nachkommenviren zu produzieren (Siegl, Bates et al. 1985; Cotmore and Tattersall 1987; Berns and Giraud 1996). Die *Erythroviren* sind durch ihren Tropismus zu

erythroiden Vorläuferzellen ausgezeichnet. Zu ihnen gehört das bisher einzige bekannte humanpathogene Parvovirus B19.

Die *Dependoviren* (AAV) sind gegenüber anderen Parvoviren einzigartig, da sie zur produktiven Infektion in Zellkultur von der Coinfektion eines Helfervirus abhängig sind. Als Helferviren können sowohl Adenoviren als auch Herpesviren fungieren (Buller, Janik et al. 1981; Janik, Huston et al. 1981; Siegl, Bates et al. 1985; Berns and Bohenzky 1987). In Abwesenheit des Helfervirus ist AAV nur noch fähig, eine latente Infektion der Wirtszelle zu etablieren, indem das Virusgenom eine inkomplette Replikation eingeht und in das Zellgenom integriert wird (Berns, Kort et al. 1975; Kotin, Siniscalco et al. 1990; Samulski, Zhu et al. 1991). Trotz dieses Unterschiedes gibt es viele Ähnlichkeiten zwischen AAV und den Vertretern der *Parvoviren* und *Erythroviren* in Genomstruktur, -organisation und -expression.

Neben der geläufigen Klassifikation, die auf Wirtszelltropismus und Abhängigkeit von einem Helfervirus beruht, kann die Gruppe der *Parvovirinae* aufgrund evolutionärer Verwandtschaft und basierend auf Genomanalysen der Vertreter in drei Gruppen eingeteilt werden (Tabelle 1). Gemäß phylogenetischer Analysen scheint sich die Spezies Parvovirus sowohl abhängig vom Wirtsorganismus als auch unabhängig davon entwickelt zu haben (Lukashov and Goudsmit 2001). Der spezifische evolutionäre Zusammenhang von Parvoviren wurde durch Analyse der gesamten Genomlänge erstmals beim Felinen Parvovirus (FPC) und Caninen Parvovirus (CPV) untersucht (Horiuchi, Yamaguchi et al. 1998). Das CPV ist aufgrund seiner Genomsequenz eng verwandt mit dem FPV und dem Mink Enteritis Virus (MEV). CPV und MEV werden als Wirtsvarianten des felinen Parvovirus klassifiziert (Parrish 1990). CPV entstand durch Mutation

Tabelle 1

Einteilung der Parvovirinae in drei Gruppen nach ihrer phylogenetischen Abstammung. Die Tabelle umfasst die in dieser Arbeit präsentierten Virusspezies mit ihren Abkürzungen und Wirtsspezifitäten. Modifiziert nach Chapman & Rossmann 1993, Berns 1995, Lukashov & Goudsmit 2001.

Virusspezies Genus	Abgekürzter Name	Wirt
<i>Parvovirinae</i>		
1. PARVOVIREN DER CARNIVOREN, NAGER UND DES SCHWEINES		
<i>Parvovirus</i>		
Minute virus of mice	MVM	Maus
Parvovirus H-1	H-1	Ratte
Felines Parvovirus	FPV	Katze
Canines Parvovirus	CPV	Hund
Mink enteritis virus	MEV	Nerz
Porcine parvovirus	PPV	Schwein
Aleutian mink disease virus	ADV	Nerz
2. ADENO- ASSOZIIERTE VIREN (UND PARVOVIREN DER VÖGEL)		
<i>Dependovirus</i>		
Adeno-associated virus serotype 1-6	AAV-1-6	Mensch
3. AUTONOME PARVOVIREN DER PRIMATEN UND BOVINE PARVOVIREN		
<i>Parvovirus</i>		
Bovines Parvovirus	BPV	Rind
Humanes Parvovirus B19	B19	Mensch

im FPV DNA-Strang, durch die das Virus seinen Wirtszelltropismus auf Hunde erweitern konnte (Parrish 1990).

1.4.2 Parvovirus H-1

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem autonomen Parvovirus H-1. Parvovirus H-1 wurde erstmals als Kontamination in der menschlichen Tumorzelllinie HEp 1 identifiziert (Toolan 1960; Chandra and Toolan 1961). Serologische Studien demonstrierten, dass H-1 Ratten infiziert, sodass die Ratte der natürliche Wirt des Parvovirus H-1 zu sein scheint (Kilham and Margolis 1965). Natürliche H-1 Infektionen der Ratte sind weitverbreitet und verlaufen gewöhnlich subklinisch. Im Experiment verursacht H-1 letale Infektionen in neugeborenen Hamstern und Ratten (Toolan 1960; Moore and Nicastrì 1965) besonders nach intrauteriner oder neonataler Infektion. H-1 kann sich aber auch in vielen humanen transformierten Zelllinien oder Tumorzelllinien replizieren und im Menschen proliferieren, wie Untersuchungen an Probanden nach i.m. Injektion ergeben haben (Toolan, Saunders et al. 1965). Jedoch gilt H-1 als apathogen im Menschen (Jacoby, Johnson et al. 1995). In Zellkulturen kann H-1 eine persistierende Infektion verursachen (Faisst, Bartnitzke et al. 1990) und bleibt noch bei einem pH zwischen 3 – 9 und 56°C für 1 h stabil, was seine weitestgehende Resistenz gegenüber Inaktivierung auszeichnet. Diese Eigenschaften befähigen das H-1 Virus, Zellkulturen und Tumorzelllinien hoch frequent zu kontaminieren. Die Viren können jedoch durch Behandlung mit Formalin, Beta-Propiolacton, Hydroxylamin oder oxidierenden Agentien inaktiviert werden (Cotmore and Tattersall 1987).

Ebenfalls wurde gezeigt, dass H-1 eine Tumorinduktion in Hamstern inhibiert (Toolan and Ledinko 1968; Toolan, Rhode et al. 1982) und hepatozelluläre Nekrosen in infizierten Ratten verursachen kann, die mit hepatotoxischen Chemikalien oder Parasiten behandelt wurden (Kilham, Margolis et al. 1970) (Lindsey, JR; Wagner JE 1991).

1.4.3 Klinische Manifestionen

Im Allgemeinen haben autonome Parvoviren eine teratogene Wirkung. Sie verursachen fetale und neonatale Abnormalitäten, in dem sie zur Zerstörung spezifischer Zellpopulationen führen, die während der Entwicklung rasch proliferieren (Siegl 1984).

Das humanpathogene Erythrovirus, Parvovirus B19, äußert sich im gesunden Individuum vorzugsweise mit einer milden grippalen Symptomatik, verbunden mit dem Auftreten eines typischen Exanthems (Erythema infectiosum = ein girlandenförmiges makulopapulöses Exanthem). Weiterhin treten die Parvovirus B19 Arthritis, aplastische Krisen bei Patienten mit chronischer hämolytischer Anämie, Hydrops fetalis und Abort bei Infektion in der Schwangerschaft auf. Letztere Komplikationen hängen wesentlich von speziellen, prädisponierenden Wirtsfaktoren ab, u.a. vom Immunstatus des Infizierten (Woolf, Campion et al. 1989; Naides, Scharosch et al. 1990). Dem gegenüber ist für AAV nicht bekannt, mit

Krankheiten assoziiert zu sein, weder in Menschen noch in Tieren (Srivastava 1994; Rabinowitz and Samulski 2000).

CPV führt zur Erkrankung in Hunden. Dazu gehören die parvovirale Myokarditis und Enteritis (Fenner F 1974).

Parvovirus H-1 und MVM verursachen wie andere Nager-Parvoviren verschiedene Krankheiten in neugeborenen oder alten Tieren (Parrish 1990; Brownstein, Smith et al. 1991).

1.4.4 Autonome Parvoviren in der onkolytischen Gentherapie

Wegen der geringen Pathogenität und der lytischen Eigenschaften wird versucht, das H-1 Virus wie auch andere Parvoviren als Vektoren in der Gentherapie zu etablieren. Wenn auch H-1 nach in vivo Applikation im Menschen zu einer Virämie mit Serokonversion führt, verursacht es jedoch keine klinischen Symptome. Es konnte gezeigt werden, dass Krebspatienten eine Parvovirus H-1 Injektion tolerierten (Toolan, Saunders et al. 1965). Eine Verbindung zwischen einer humanen Erkrankung und einer früheren H-1 Infektion konnte nicht hergestellt werden (Siegl 1984). Eine Integration in das Wirtszellgenom konnte für autonome Parvoviren nicht festgestellt werden, was das Risiko einer insertionellen Mutagenese ausschließt. Aufgrund dessen gelten rekombinante Parvoviren als sichere Vektoren (Kirn and McCormick 1996). Zudem bieten H-1 Viren ein breites Wirtsspektrum und ermöglichen die Eröffnung eines breiten Behandlungsspektrums. Die onkosuppressive Eigenschaft des H-1 Virus macht es interessant als Vektor in der Krebstherapie. H-1 und andere Nager-Parvoviren hemmen die Entwicklung spontaner, induzierter oder transplanteder Tumore in Versuchstieren (Toolan, Rhode et al. 1982; Guetta, Graziani et al. 1986; Dupressoir, Vanacker et al. 1989). Sie wirken zudem onkolytisch, d.h. sie zeigen in vitro einen stärkeren zytotoxischen Effekt in transformierten Zelllinien als in nicht transformierten Zellkulturen (Cornelis, Becquart et al. 1988; Cornelis, Spruyt et al. 1988; Chen, Tuynder et al. 1989; Salome, van Hille et al. 1990; Mousset, Ouadrhiri et al. 1994).

1.4.5 Genom

Parvoviren haben eine Kopie eines linearen einzelsträngigen DNA-Moleküls von über 5100 Nukleotiden Länge. Das Parvovirus H-1 hat ein 5176 Basen ss-DNA Genom. Die meisten autonomen Parvoviren haben primär einen DNA-Strang negativer Polarität, während Dependoviren (AAV) Stränge beider Polarität mit gleicher Frequenz verpacken (Berns and Adler 1972; Cotmore and Tattersall 1987; Berns and Giraud 1996). Terminale Palindromsequenzen sind an beiden Enden des parvoviralen Genoms lokalisiert, die als ITR-Regionen (Inverted Terminal Repeats) bezeichnet werden (Astell, Thomson et al. 1983; Rhode and Paradiso 1983). Diese können sich zu stabilen Y- (3'-Ende) bzw. T-förmigen (5'-Ende) doppelsträngigen Sekundärstrukturen, so genannte Haarnadelschleifen, falten. Sie beinhalten cis-aktive Sequenzen, die zur Replikation und Verpackung der viralen DNA benötigt werden

(Astell, Chow et al. 1985). Die 3'-Palindrome umfassen bei allen Vertretern der Gattung *Parvovirus* ca. 115 Nukleotide (nt) (Astell, Smith et al. 1979), während das 5'-Palindrom Speziesunterschiede zeigt und beim H-1 Virus über 245 nt umfasst (Rhode and Paradiso 1983). Die Protein kodierenden Regionen scheinen sich über das gesamte Genom zu erstrecken. Es besteht aus zwei großen nicht überlappenden offenen Leserastern (ORF = „open reading frame“) und einer Zahl kleinerer ORFs, deren exakte Größe und Lokalisation von Virus zu Virus variiert. Die Transkription wird durch zwei Promotoren, P4 und P38, reguliert. Der „frühe“ Promotor P4 steuert die Synthese eines Transkripts, dessen Spleißvarianten R1 und R2 für die regulatorischen nichtstrukturellen Proteine NS1 und NS2 kodieren. Unter der Kontrolle des „späten“ Promotors P38 wird das R3-Transkript abgelesen. Durch alternatives Spleißen entstehen hieraus die mRNAs für die Capsidproteine VP1 und VP2 (Jongeneel, Sahli et al. 1986; Cotmore and Tattersall 1987; Berns and Giraud 1996) (Labieniec-Pintel and Pintel 1986; Morgan and Ward 1986) (Abb. 2).

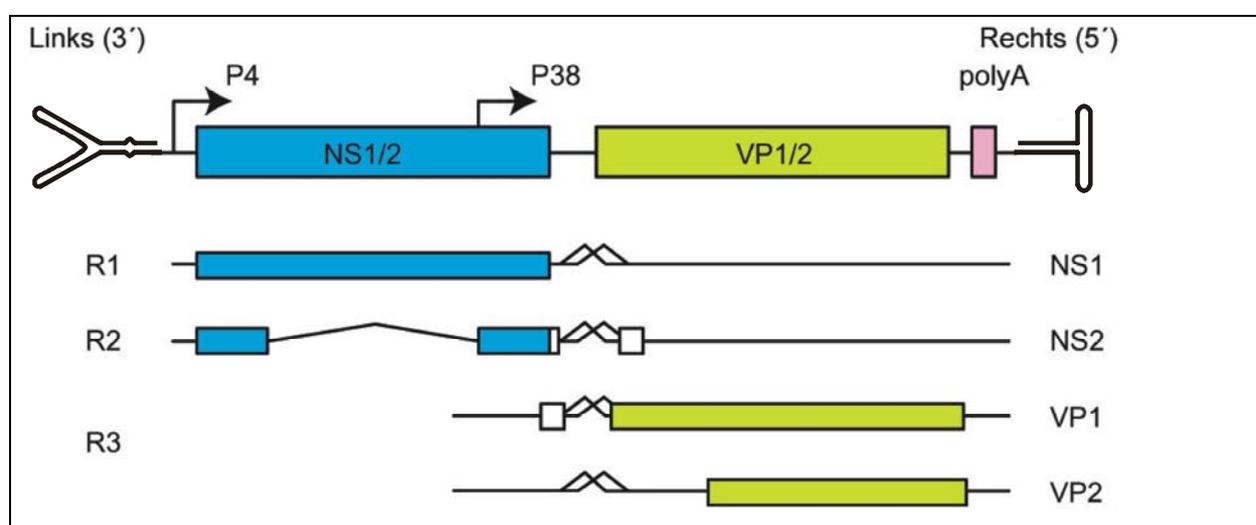


Abb. 2: Genomorganisation der autonomen Parvoviren

Das 5,1 kB ss-lineare DNA Genom der autonomen Parvoviren hat „inverted repeat“ (IR) Sequenzen an den Termini, die sich zu Haarnadelstrukturen falten können und der Replikation dienen. Zwei Leseraster existieren, die für die Capsidproteine (VP1 und VP2) und die nichtstrukturellen Proteine (NS1 und NS2) kodieren. Die Transkription wird durch die P4 und P38 Promotoren reguliert. Unterhalb des Genomschemas sind die Transkripte R1-3 und die korrespondierenden Proteine angezeigt. (Modifiziert nach „Expert Reviews in Molekular Medicine“ 2004 Cambridge University Press)

1.4.6 Die viralen Strukturproteine

Das Parvovirus Capsid besitzt eine T=1 Symmetrie und setzt sich aus 60 Protein-Untereinheiten zusammen. Es besteht zu 90% aus VP2 (68 kDa) und 10% aus VP1 (88 kDa) (Paradiso 1981). Die Proteine werden durch alternatives Spleißen der mRNA codiert (Tattersall, Cawte et al. 1976; Cotmore and Tattersall 1987; Reed, Jones et al. 1988). Unter niedrigen pH-Bedingungen, wie sie in Endosomen vorkommen, werden manche N-Termini des VP2 von vollen, DNA-haltigen, Capsiden außerhalb des Capsid exponiert. Diese werden durch Proteasen der Wirtszelle am N-Terminus gespalten, um das VP3 (65 kDa) zu bilden (Paradiso 1981; Tullis, Burger et al. 1992; Weichert, Parker et al. 1998). Es wurde beschrieben, dass eine

lysosomale Protease, Cathepsin B, VP2 zu VP3 bei $\text{pH} < 5,5$ (Weichert, Parker et al. 1998) spaltet. Im Gegensatz dazu haben das humane Parvovirus B19 und das Aleuten Krankheit Virus (ADV) nur zwei Capsid Proteine, VP1 und VP2 (Cotmore and Tattersall 1987). VP1 enthält die komplette Aminosäuresequenz des VP2 und zusätzlich 150-230 Aminosäuren am N-terminalen Ende (Jongeneel, Sahli et al. 1986; Cotmore and Tattersall 1987). Dieser N-terminale Teil des VP1 wird auch als VP1up (unique part) bezeichnet.

In CPV- und MVM-Virionen ist die N-terminale Sequenz des VP1 im Capsid eingeschlossen, aber sie kann durch Hitze- oder Harnstoffbehandlung ohne komplette Desintegration des Viruscapsids exponiert werden (Weichert, Parker et al. 1998; Cotmore, D'Abramo A et al. 1999). Die N-terminale Sequenz des VP1 der meisten Parvoviren trägt ein konserviertes Motiv, das der katalytischen Region zellulärer sekretorischer Phospholipasen A_2 ähnelt (sPLA₂) (Zadori, Szelei et al. 2001). Phospholipasen stellen eine Oberfamilie von Schlüsselenzymen dar, die in physiologischen und pathologischen Prozessen wie z.B. Lipidmembranmetabolismus, Signal-Übertragungswege, Inflammationsprozesse, akute Hypersensitivität und degenerative Erkrankungen einbezogen sind (Dennis 1997; Kramer and Sharp 1997; Balsinde, Balboa et al. 1999). Phospholipasen katalysieren die Hydrolyse von Phospholipid-Substraten an der 2-Acyl-Ester Position und setzen Lysophospholipide und freie Fettsäuren frei. Das parvovirale Phospholipase A_2 (pv PLA₂) -Motiv von PPV (porcine parvovirus), B19 und AAV Capsiden verfügt über die katalytische Aktivität einer sPLA₂ (Zadori, Szelei et al. 2001; Dorsch, Liebisch et al. 2002; Girod, Wobus et al. 2002).

Die N-terminale Region des VP1 (VP1up) enthält beim CPV auch mehrere basische Sequenzen, die einem klassischen NLS ähneln. Eine dieser VP1-Sequenzen (PAKRARRGYK) zwischen den Resten an AS Position 4 bis 13 bewirkt den nukleären Transport, wenn sie mit bovinen Serum Albumin (BSA) konjugiert ist (Vihinen-Ranta, Kakkola et al. 1997). Die PLA₂-Domäne und die NLS-Region sind im CPV durch 20 AS voneinander getrennt (Vihinen-Ranta, Kakkola et al. 1997; Zadori, Szelei et al. 2001). Auf dem VP2 sind nur zwei entsprechende basische Sequenzen bekannt.

Auch MVM-Capside haben Kern-Transport-Signale im VP1 und VP2 Protein (Tullis, Burger et al. 1992). Zwei NLS-Sequenzen befinden sich am VP1 spezifischen N-Terminus. Untersuchungen mit Deletionsmutanten zeigten, dass die basischen Sequenzen des VP1 zu Infektionsbeginn notwendig sind (Lombardo, Ramirez et al. 2002). Das MVM-VP2 hat C-terminal ein strukturelles Kern-Lokalisation-Motiv (NLM). Im Unterschied zum NLS, das durch eine bestimmte AS-Sequenz der Primärstruktur gebildet wird, ist das NLM eine NLS-ähnliche Sequenz, die durch die Tertiärstruktur des Proteins auf der Capsidoberfläche formiert wird. Das NLM dient dem Kernimport von neu synthetisierten VP2 und der Capsidformation (Lombardo, Ramirez et al. 2000; Lombardo, Ramirez et al. 2002). Im Gegensatz dazu vermittelt die gleiche Sequenz des CPV nicht den nukleären Import, wie durch Punktmutationsanalysen gezeigt

wurde. Stattdessen wurde aber die Zusammensetzung des Capsids durch diese Mutationen beeinflusst (Vihinen-Ranta, Kakkola et al. 1997; Yuan and Parrish 2000).

Die Funktion des VP3 ist unbekannt, aber es wird vermutet, dass VP3 zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Infektion vielleicht für die Interaktion mit zellulären Membranen benötigt wird (Tattersall and Cotmore 1988).

1.4.7 Die Nicht-Strukturproteine

Neben den Capsidproteinen kodieren Parvoviren für zwei verschiedene nichtstrukturelle Proteine, NS1 und NS2 (Cotmore and Tattersall 1987).

NS1 und das homologe Rep 68/78-Protein des AAV sind große pleiotrope 83-86 kDa schwere Phosphoproteine mit einem NLS, das in infizierten Zellen zu einer Akkumulation im Zellkern führt (Cotmore and Tattersall 1987; Nuesch, Cotmore et al. 1992; Nuesch and Tattersall 1993). Beide sind zur Oligomerisation befähigt (Pujol, Deleu et al. 1997) und haben, abhängig vom Phosphorylierungsstatus, verschiedene Funktionen über den gesamten parvoviralen Lebenszyklus hinweg. Zu ihren multifunktionellen Eigenschaften gehören Sequenz-spezifische DNA-Bindung, ATPase- und Helikase-Aktivität (Wilson, Jindal et al. 1991; Christensen, Pedersen et al. 1995; Maxwell, Terrell et al. 2002). NS1 ist für die produktive virale Replikation essentiell, weil es in allen permissiven Zellen als Initiator der viralen DNA-Replikation und als potenter transkriptioneller Aktivator der viralen Promotoren dient (Cotmore and Tattersall 1987; Tullis, Labieniec-Pintel et al. 1988; Naeger, Cater et al. 1990; Cotmore, Christensen et al. 1995). Darüberhinaus fungiert NS1 in der parvoviralen Replikation als strang- und sequenzspezifische Endonuklease (Cotmore and Tattersall 1992; Nuesch, Cotmore et al. 1995; Christensen, Cotmore et al. 1997; Cotmore and Tattersall 1998). Als spezifische Bindungsstelle für das NS1-Protein wurde das DNA-Element [ACCA]₂₋₃ beschrieben, welches an mehreren Stellen des viralen Genoms zu finden ist (Christensen, Pedersen et al. 1995; Cotmore, Christensen et al. 1995; Nuesch, Cotmore et al. 1995). Dort kann NS1 im oligomerisierten Zustand unter Anwesenheit von ATP binden (Nuesch and Tattersall 1993; Cotmore, Christensen et al. 1995). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass NS1 mit verschiedenen Zellproteinen interagiert, wobei die biologische Relevanz dieser Interaktionen jedoch noch ungeklärt ist (Kradly and Ward 1995; Cziepluch, Kordes et al. 1998; Kordes, Savelyeva et al. 1998; Harris, Boden et al. 1999)

Außerdem wird dem NS1 zugeschrieben, eine Hauptrolle in der Parvovirus induzierten Wachstumshemmung zu übernehmen und zytotoxische Effekte auf Wirtszellen zu haben (Ozawa, Ayub et al. 1988; Caillet-Fauquet, Perros et al. 1990; Li and Rhode 1990; Legendre and Rommelaere 1992; Legrand, Rommelaere et al. 1993; Op De Beeck, Sobczak-Thepot et al. 2001; Morita, Nakashima et al. 2003). Für einen maximalen zytotoxischen Effekt zumindest in NB-E Zellen (humane SV40 transformierte Zelllinie) scheint jedoch das NS2 notwendig zu sein (Brandenburger, Legendre et al. 1990). Der Mechanismus der zytotoxischen Wirkung des NS1

ist noch teilweise ungeklärt, da verschiedene Aktivitäten des NS1 diesem Phänomen zugeschrieben werden. So ist beschrieben worden, dass NS1 mit dem Zellzyklus und der Phosphorylierung zellulärer Proteine interferiert (Op De Beeck, Anouja et al. 1995; Anouja, Wattiez et al. 1997), Einzelstrangbrüche in der zellulären chromosomalen DNA induziert (Op De Beeck and Caillet-Fauquet 1997), verschiedene zelluläre Promotoren transreguliert (Legendre and Rommelaere 1994; Vanacker, Corbau et al. 1996) und morphologische Veränderungen in der Zelle hervorruft (Caillet-Fauquet, Perros et al. 1990). Erstaunlicherweise sind neoplastisch transformierte Zellkulturen gegenüber einer NS1-vermittelten Zytotoxizität sensitiver als nicht transformierte Zellen. Möglicherweise liegt dies an der erhöhten viralen DNA-Replikation und NS-Transkription in transformierten Zellen, die zu einer gesteigerten Akkumulation von NS-Proteinen in Zellkultur führen (Cornelis, Spruyt et al. 1988; Mousset, Ouadrhiri et al. 1994).

Das NS1-Protein wird in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert. Für das MVMp (Prototyp-Stamm des MVM) konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des P4-Promotor durch den Transkriptionsfaktor E2F reguliert wird und deshalb an die frühe S-Phase gekoppelt ist (Deleu, Fuks et al. 1998; Deleu, Pujol et al. 1999). Wird NS1 exprimiert, reichern sich die infizierten Zellen in der S- und G2-Phase des Zellzyklus an (Op De Beeck, Anouja et al. 1995; Op De Beeck and Caillet-Fauquet 1997) und machen deshalb einen ungleich hohen Anteil an S- bzw. G2-Phase Zellen aus als in uninfizierten Zellen.

NS2 ist das kleinere der Nichtstruktur-Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa und entsteht durch alternatives Spleißen der NS1-NS2-mRNA. Seine N-terminale Region ist mit der des NS1 identisch (Cotmore and Tattersall 1986). Das NS2 von H-1 existiert in zwei, das von MVMp in drei Isoformen, die sich in 6-15 Aminosäuren im C-terminalen Bereich unterscheiden (Jongeneel, Sahli et al. 1986). Im Gegensatz zu NS1 ist NS2 zu Beginn der Infektion aufgrund der höheren Menge an NS2-Transkripten das dominierende Protein. Jede Isoform des NS2 kommt in gleichen Mengen in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form vor (Cotmore and Tattersall 1990). Während die meisten NS1-Moleküle im Kern lokalisiert sind, kommen NS2-Moleküle überwiegend im Cytosol vor. In der phosphorylierten Form ist das NS2 ausschließlich cytosolisch lokalisiert. (Clemens, Cerutis et al. 1990; Cotmore and Tattersall 1990). Da mit fortschreitender Infektion die Aktivität des P4 Promotors - unter dessen Kontrolle die NS1- und NS2-DNA transkribiert wird - sinkt, kommt es aufgrund der längeren Halbwertszeit von NS1 zu dessen Akkumulation gegenüber NS2 (Schoborg and Pintel 1991).

Die Funktion des NS2 ist noch ungeklärt, aber es ist für eine produktive H-1 Virus- und MVMp-Infektion in Zellen der natürlichen Wirtsspezies notwendig (Naeger, Cater et al. 1990; Li and Rhode 1991; Brownstein, Smith et al. 1992). Es wurde hierbei gezeigt, dass die Replikationsrate von NS2-Deletionsmutanten verglichen mit dem Wildtyp wesentlich geringer war. Auch die Translation der viralen Proteine und der Zusammenbau der Capside waren bei diesen Mutanten erheblich beeinträchtigt (Li and Rhode 1991; Cater and Pintel 1992; Naeger,

Salome et al. 1993; Cotmore, D'Abramo et al. 1997). Im Kontrast dazu ist das NS2 bei Infektion humaner Zellen entbehrlich (Naeger, Cater et al. 1990; Naeger, Salome et al. 1993). Gegenüber H-1 und MVM replizieren NS2-Nullmutanten von CPV effizient, so dass CPV-NS2 vermutlich keine ähnlichen Funktionen wie bei H-1 und MVM übernimmt (Wang, Yuan et al. 1998).

1.4.8 Morphologie und Struktur

Die Viruspartikel der verschiedenen Subfamilien sind generell gleich aufgebaut. Die Symmetrie des Capsids ist ikosahedral. Das fast runde Capsid hat einen Durchmesser von 18 - 26 nm und verfügt über keine Hülle (Siegl, Bates et al. 1985; Chapman and Rossmann 1993).

Das parvovirale Genom ist von einem Proteinmantel umgeben, der aus 60 Untereinheiten der drei Capsidproteine besteht. Das Capsid setzt sich aus 20 Trimeruntereinheiten zusammen, die von jeweils 3 VP-Untereinheiten gebildet werden (Abb. 3). Beim H-1 Virus haben sie folgende Molekulargewichte: VP1 = 88 kDa, VP2 = 68 kDa und VP3 = 65 kDa (Paradiso 1981). Hauptbestandteil des Capsids ist das VP2, das in einem 5:1-Verhältnis zu VP1 vorliegt. VP1 und VP2 sind primäre Translationsprodukte (Cotmore, Sturzenbecker et al. 1983; Rhode and Paradiso 1983). Das VP3 ist ein proteolytisches Spaltungsprodukt von VP2, das nur in geringen Mengen entsteht (Tattersall, Cawte et al. 1976). Die proteolytische Spaltung erfolgt im Spätstadium im Rahmen der Endozytose und nur in infektiösen, DNA-haltigen Viruspartikeln. Leere Partikel, die kein Virusgenom enthalten, werden nicht proteolytisch gespalten und haben kein VP3 (Paradiso 1981; Santaren, Ramirez et al. 1993).

Wechselwirkungen zwischen DNA- und Capsid-Proteinen sind überwiegend nichtionisch (Xie and Chapman 1996). Parvovirus-Capsiden fehlt es an Lipiden und Kohlenhydraten (Berns 1990). Das Viruspartikel weist ein Molekulargewicht von $5,5 - 6,2 \times 10^6$ Da auf. Davon sind in infektiösen Partikeln 19 - 32% virale DNA (Siegl, Bates et al. 1985; Cotmore and Tattersall 1987). Aufgrund dieses hohen DNA zu Protein-Verhältnisses beträgt die Dichte des intakten Virus in CsCl $1,39 - 1,47 \text{ g/cm}^3$ und der Sedimentationskoeffizient im neutralen Sucrosegradient beträgt 110 - 122.

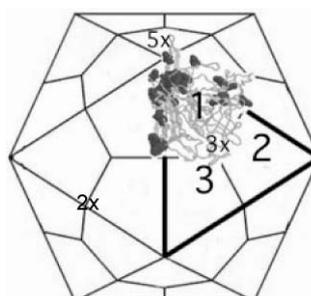


Abb. 3: Schematische Repräsentation des Parvovirus-Capsid, nach (Reguera, Carreira et al. 2004):

Die dicken Linien grenzen 1 von 20 identischen Trimer-Untereinheiten ab. Drei VP2-Untereinheiten sind in diesem Trimer mit 1, 2 und 3 nummeriert. Ein Model der Molekularstruktur einer VP2-Untereinheit ist überprojiziert. Die Symmetrieachsen sind mit 2x (zweifach), 3x (dreifach), 5x (fünffach) gekennzeichnet.

Auf der Oberfläche des ikosahedralen parvoviralen Capsids befinden sich Vorsprünge (Spikes) an der dreifachen Symmetrie-Achse, Fluss-ähnliche Vertiefungen bzw. Kanäle an der fünffachen Achse, und kleine Vertiefungen (Grübchen) an der zweifachen Achse (Tsao, Chapman et al. 1991; Agbandje, McKenna et al. 1993; Chapman and Rossmann 1993; Wu and Rossmann 1993).

Extern exponierte Schleifen-Strukturen, die bei den Vertretern der Parvoviridae variieren, sind primär mit der Antigenität assoziiert (Chapman and Rossmann 1993). Proteinabschnitte an der Pore der fünffachen Symmetrieachse des Capsids sind an Konformationsänderungen des Capsids beteiligt. Dadurch wird u.a. das N-terminale Segment von VP2 vermutlich durch diese Poren exponiert. (Tsao, Chapman et al. 1991; Agbandje, McKenna et al. 1993; Chapman and Rossmann 1993; Wu and Rossmann 1993; Xie and Chapman 1996; Agbandje-McKenna, Llamas-Saiz et al. 1998; Weichert, Parker et al. 1998). Diese Exposition scheint für nukleären Austritt reifer Partikel und Infektiösität notwendig zu sein (Reguera, Carreira et al. 2004).

Die Capsidproteinsequenzen, die die Wirtszellspezifität des CPV, MEV, FPV und MVM kontrollieren befinden sich auf verschiedenen Stellen der Capsidoberfläche, wie z.B. den Spikes oder Grübchen (Gardiner and Tattersall 1988; Ball-Goodrich, Moir et al. 1991; Parrish 1991; Ball-Goodrich and Tattersall 1992; Chang, Sgro et al. 1992; Tsao, Chapman et al. 1992; Agbandje, McKenna et al. 1993; Horiuchi, Goto et al. 1994; Truyen, Evermann et al. 1996; Agbandje-McKenna, Llamas-Saiz et al. 1998; Xie, Bu et al. 2002; Hueffer, Govindasamy et al. 2003).

Zumindest beim MVM sind außerdem 24 Nukleotide am 5'-Ende des Virusgenoms durch eine Pore, dem „Porex“, an einer 5-fachen Symmetrieachse des Capsids außerhalb exponiert. Das große nichtstrukturelle Protein NS1 bindet an diese Nukleotide während der Capsid-Assemblierung (Cotmore and Tattersall 1989; Wang and Parrish 1999).

1.5 Lebenszyklus des Parvovirus

1.5.1 Zell Rezeptoren

Sowohl Kohlenhydrat- als auch Protein-Rezeptoren wurden für viele Viren beschrieben (Tabelle 2).

AAV2 und AAV3 benutzen Heparan Sulfat Proteoglycan (HSPG) zum Andocken an die Zelloberfläche und zur Infektion der Wirtszellen (Summerford and Samulski 1998; Qiu, Handa et al. 2000) , obwohl AAV2-Mutanten, die nicht HSPG binden, immer noch infektiös sind (Shi, Arnold et al. 2001; Opie, Warrington et al. 2003), was, wie bei Adenoviren für weitere mögliche Rezeptoren spricht. Hier wurden das $\alpha V\beta 5$ Integrin und der humane Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (Qing, Mah et al. 1999; Summerford, Bartlett et al. 1999) beschrieben. Für AAV4 und AAV5 sind vermutlich Sialinsäuren die Rezeptoren (Kaludov, Brown et al. 2001; Walters, Yi et al. 2001; Bantel-Schaal, Hub et al. 2002). AAV5 kann auch den PDGF (platelet derived growth factor) -Rezeptor zur Zellbindung und Infektion benutzen (Di

Pasquale, Davidson et al. 2003). AAViren konnten durch Mutationen des Capsidproteins an verschiedene alternative Rezeptoren, z.B. CD34 (Zellrezeptor für hämatopoetische Stammzellen), angepasst werden (Yang, Mamounas et al. 1998; Bartlett, Kleinschmidt et al. 1999; Girod, Ried et al. 1999; Wu, Xiao et al. 2000; Ried, Girod et al. 2002; Shi and Bartlett 2003).

Das humane Parvovirus B19 benutzt das Erythrozyten P Antigen, ein Glycolipid Globosid, als seinen Rezeptor (Brown, Anderson et al. 1993; Chipman, Agbandje-McKenna et al. 1996). Trotzdem gibt es viele Globosid exprimierende Zellen, die nicht für eine B19-Infektion suzeptibel sind (Liu, Green et al. 1992; Brunstein, Soderlund-Venermo et al. 2000). Das bovine Parvovirus (BPV) bindet an sialierte Membranglycoproteine, eines ist das Haupt-Erythrozyten-Membranglycoprotein, Glycophorin A (Thacker and Johnson 1998).

CPV und FPV binden an manchen Wirtszellen Sialinsäuren. Diese Bindung hat jedoch in der Infektion kultivierter Zellen keine Bedeutung, da nicht Sialinsäure-bindende CPV- und FPV-Mutanten im gleichen Ausmass Zellen infizieren, wie Wild-Typ Viren (Barbis and Parrish 1994). Stattdessen benutzen CPV und FPV den Transferrinrezeptor zur Zellbindung und Infektion (Parker, Murphy et al. 2001; Hueffer, Parker et al. 2003).

Für das Parovirus H-1 ist bisher kein Rezeptor bekannt.

Virus	Rezeptor	Corezeptor
AAV2	Heparansulfatproteoglycan (Summerford and Samulski 1998)	α V β 5 Integrin (Summerford, Bartlett et al. 1999)} Humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor- Rezeptor (Qing, Mah et al. 1999)
AAV4	α 2-3-gebundene Sialinsäure (Walters, Yi et al. 2001)	
AAV5	α 2-3-gebundene Sialinsäure (Linser, Bruning et al. 1979) PDGF („Platelet-derived growth factor“) Rezeptor (Di Pasquale, Davidson et al. 2003)	
B19	Erythrozyten P Antigen (Brown, Anderson et al. 1993)	
BPV	u.a. Glycophorin A (Thacker and Johnson 1998)	
ADV	ADV Bindungs-Protein	
CPV	Transferrin-Rezeptor (Parrish 1990) Sialinsäure (Barbis, Chang et al. 1992)	
FPV	Transferrin-Rezeptor (Parrish 1990)	

Tabelle 2: Parvovirale Rezeptoren

1.5.2 Aufnahme des Parvovirus in die Zelle

Alle Versuche, die den Infektionsweg der Parvoviren untersuchen, werden dadurch beeinträchtigt, dass nur wenige virale Partikel infektiös sind. Damit kann in Experimenten zur Analyse des Infektionsweges der viralen Capside durch mikroskopische Techniken keine Korrelation zwischen Lokalisation viraler Elemente und einer produktiven Infektion postuliert werden.

Parvoviren werden am wahrscheinlichsten durch Clathrin vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Damit übereinstimmend konnte die endozytotische Aufnahme von CPV und AAV durch eine dominant negative Mutante des Dynamin inhibiert werden (Duan, Li et al. 1999; Bartlett, Wilcher et al. 2000; Parker and Parrish 2000). Dem gegenüber wurde für AAV auch eine Aufnahme in die Wirtszelle über nicht umhüllte Vesikel beschrieben (Douar, Poulard et al. 2001; Bantel-Schaal, Hub et al. 2002). Infektionen durch CPV, MVM, PPV und AAV können durch Substanzen wie z.B. NH_4Cl und Bafilomycin A_1 , die den sauren pH der Endosomen erhöhen, inhibiert werden (Basak and Turner 1992; Bartlett, Wilcher et al. 2000; Parker and Parrish 2000; Douar, Poulard et al. 2001; Hansen, Qing et al. 2001; Zadori, Szelei et al. 2001; Ros, Burckhardt et al. 2002), ein Hinweis dafür, dass das Virus während der viralen Aufnahme einem niedrigen pH exponiert sein muss. Die endozytotische Aufnahme von einigen bestimmten Parvoviren wurde durch verschiedene Methoden untersucht. So wurde gezeigt, dass CPV- und AAV-Capside mit endozytotisch aufgenommenen Transferrin colokalisieren, aufgrund dessen der endozytotische Recycling-Weg vermutlich ein Teil der intrazellulären Route des Virus ist (Duan, Li et al. 1999; Parker and Parrish 2000) (Abb. 4). MVM- und AAV-Capside werden durch frühe und späte endosomale Kompartimente transportiert, bevor sie in den Zellkern importiert werden, was durch Immunfluoreszenz-, Elektronenmikroskop-Analysen und Zellinfektionsversuche mit Substanzen untersucht wurde, die zelluläre Funktionen und Endozytose beeinflussen (Douar, Poulard et al. 2001; Hansen, Qing et al. 2001; Bantel-Schaal, Hub et al. 2002; Ros, Burckhardt et al. 2002). In Immuno-Elektronenmikroskop-Untersuchungen wurde AAV5 in Lysosomen ähnlichen Strukturen entdeckt. PPV colokalisiert mit dem lysosomalen Membranprotein 2 (LAMP-2), was auf die Lokalisation des Virus in späten Endosomen und Lysosomen während des Zelleintritts hinweist (Zadori, Szelei et al. 2001; Bantel-Schaal, Hub et al. 2002). AAV5 befindet sich zwischen 3 und 22 h p.i. im TGN und in Golgi assoziierten Vesikeln (Bantel-Schaal, Hub et al. 2002).

Nach der Aufnahme des Parvovirus in die Zelle kommt es zu einer perinukleären Ansammlung von Capsiden, was durch Immunfluoreszenz von CPV-infizierten Zellen gezeigt werden konnte (Vihinen-Ranta, Kalela et al. 1998; Parker and Parrish 2000). Da nur wenige Parvoviren infektiös sind – das Partikel zu Infektiösität-Verhältnis beträgt ca. 1:1000 – ist nicht auszuschließen, dass die infektiösen Viren in den Kern aufgenommen werden, während die nicht infektiösen Viren perinukleär verbleiben. Der intrazelluläre Transport scheint relativ lange zu dauern. So bleiben CPV- und FPV-Capside mit dem Transferrinrezeptor für mehrere Stunden assoziiert, da gezeigt werden konnte, dass bis zu 4 h p.i. mikroinjizierte Antikörper gegen den cytoplasmatischen Teil des Transferrinrezeptors die Infektion reduzierten (Parker, Murphy et al. 2001). Wurden Antikörper gegen das CPV-Capsid erst 6 h nach Inokulation in das Cytoplasma injiziert, wurde ebenso eine Infektion verhindert, daraufhindeutend, dass CPV-Capside die endosomalen Vesikel erst nach mehreren Stunden verlassen (Vihinen-Ranta, Yuan et al. 2000; Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002). Auch andere Parvovirus Capside wie MVM, PPV

und AAV bleiben für mehrere Stunden in perinukleären Vesikeln (Duan, Li et al. 1999; Zadori, Szelei et al. 2001; Ros, Burckhardt et al. 2002).

Der Mechanismus, der dem Übergang von Parvoviren aus endozytotischen Vesikeln in das Cytosol zu grunde liegt, ist weitgehend unbekannt. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass die Penetration des CPV durch das Vesikel nicht zur völligen Auflösung der endosomalen Membran führt (Parker and Parrish 2000), da gezeigt wurde, dass CPV die Permeabilität der Endosomen für endozytotisch aufgenommenes α Sarcin (einer 16,8 kDA RNase, die die Proteinsynthese inhibiert) nicht erhöht. Auch endozytotisch aufgenommenes Dextran mit einem MG von 10000 verbleibt zusammen mit CPV in den Vesikeln, während jedoch Dextran mit einem MG von 3000 8 h p.i. in Gegenwart von CPV aus Vesikeln freigesetzt wird (Suikkanen, Antila et al. 2003). Es liegt nahe, das Entkommen der Parvoviren aus den Endosomen der PLA₂-Aktivität zuzuordnen.

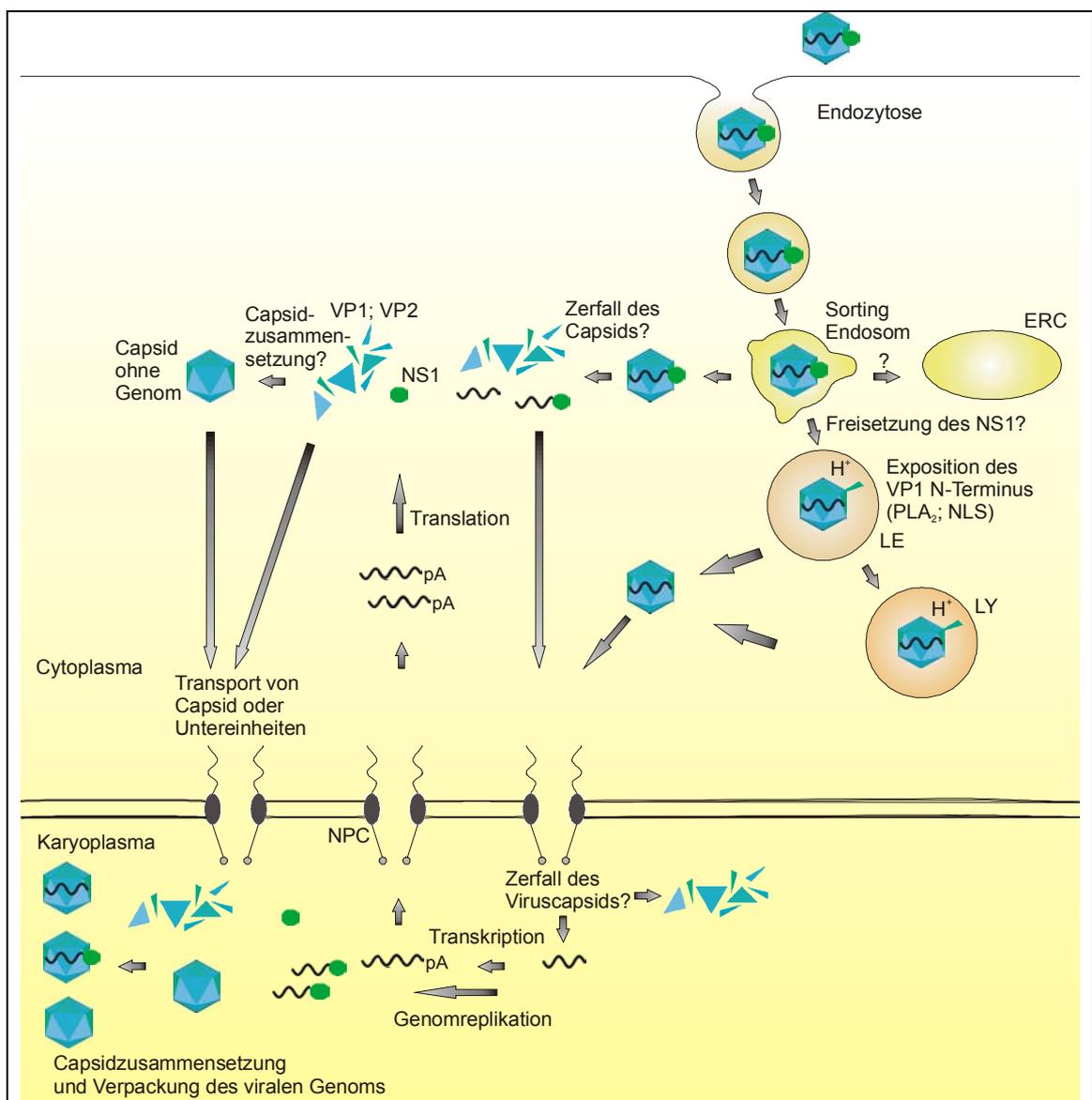


Abb. 4: Schematische Übersicht des parvoviralen Genom- und Capsidtransports und deren verschiedene Möglichkeiten.
 LE= spätes Endosom; LY= Lysosom; PLA₂= Phospholipase A₂; NLS= Nukleäre Lokalisations Sequenz; NPC= Kernporenkomplex; ERC= Endosomen Recycling Kompartiment.

In der Tat konnte durch PLA₂-Inhibitoren und VP1- Mutanten gezeigt werden, dass die PLA₂-Aktivität im Zeitraum zwischen perinukleärer Akkumulation und frühzeitiger Genexpression gebraucht wird (Li, Zadori et al. 2001; Zadori, Szelei et al. 2001; Dorsch, Liebisch et al. 2002; Girod, Wobus et al. 2002).

1.5.3 Cytoplasmatischer Transport und nukleärer Import

Die Capside der bekannten Parvoviren werden am wahrscheinlichsten im Cytoplasma von endosomalen Vesikeln in die perinukleäre Region freigelassen. Es ist unklar, ob vor dem Kerntransport des viralen Genoms eine Prozessierung der parvoviralen Partikel im Cytoplasma stattfindet. Das CPV scheint als intaktes Partikel aus endosomalen Vesikeln in das Cytosol freigesetzt zu werden, da cytosolisch mikroinjizierte Antikörper, die nur intakte Capside erkennen, eine Infektion verhindern konnten (Vihinen-Ranta, Yuan et al. 2000).

Das Cytoplasma schränkt die freie Diffusion von makromolekularen Komplexen bis auf eine Größe von 500 kDa ein (Luby-Phelps 1994; Seksek, Biwersi et al. 1997; Luby-Phelps 2000). Obwohl der endozytotische Transport das virale Partikel in die Nähe des Kerns trägt, ist es sehr wahrscheinlich, dass das parvovirale Partikel (ca. 4500 kDa) durch aktiven Transport zum Ort des Kerneintritts gebracht wird. Der Transport mikroinjizierter CPV-Capside in die perinukleäre Region wurde durch Nocodazol, das die Mikrotubuli depolymerisiert, und durch AK gegen Dynein, ein Motor-Protein der Mikrotubuli, unterdrückt, was einen Mikrotubuli vermittelten Prozess der untersuchten CPV-Partikel vermuten lässt (Vihinen-Ranta, Yuan et al. 2000; Suikkanen, Saajarvi et al. 2002; Suikkanen, Aaltonen et al. 2003), wobei diese Untersuchungen offen lassen, ob der Transport freier Capside oder in Endosomen verpackter Capside betroffen ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen und Präzipitationen von CPV-Capsiden mit Dynein in infizierten Zellen legen jedoch nahe, dass auch freie Capside entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Suikkanen, Antila et al. 2003). Jedoch ist zu beachten, dass ein Großteil der mikroinjizierten Partikel nicht zur Infektion beiträgt und somit hierbei keine sichere Aussage über das Aufnahmeverhalten infektiöser Partikel gemacht werden kann.

Durch Inhibition der Chymotrypsinaktivität von zellulären Proteasomen konnte die DNA-Synthese des MVM in einem Zeitraum zwischen 3 und 9 h p.i. reduziert werden, dauraufhindeutend, dass zelluläre Proteasomen für den parvoviralen Infektionsprozess notwendig sind (Ros, Burckhardt et al. 2002). Proteasomen sind Enzymkomplexe, die für den Abbau von Ubiquitin-markierten Proteinen zuständig sind. Die Proteine werden in der Zelle vor dem Abbau mit Ubiquitin markiert. Im Gegensatz wird der zelluläre Transport von rekombinanten AAV-Capsiden durch Proteasomen-Inhibitoren erheblich verstärkt, so dass angenommen wird, dass der Ubiquitin-Proteasomen-Weg eine Barriere des AAV-Infektionszyklus darstellt (Douar, Poulard et al. 2001; Yan, Zak et al. 2002).

Der Transport des parvoviralen Capsids und/oder der viralen DNA in den Kern ist ein essentieller Schritt in der Infektion von Zellen und sollte prinzipiell durch den Kernporen-Komplex erfolgen. Obwohl kleine Moleküle frei durch die Kernpore diffundieren können, erfordert der Transport größerer Moleküle ATP, lösliche cytosolische Faktoren und wird durch Kern-Lokalisation-Sequenzen (NLS) vermittelt (Feldherr and Akin 1990; Nigg 1997; Gorlich and Kutay 1999; Feldherr, Akin et al. 2001). Parvovirus-Capside scheinen dazu fähig zu sein, den NPC als intaktes Partikel zu passieren bzw. in den Kern zu gelangen. So konnte gezeigt werden, dass mikroinjizierte CPV-Capside innerhalb von 2 und mehr h den Zellkern erreichten, wo sie durch AK, die nur intakte Capside binden, erkannt werden konnten (Vihinen-Ranta, Yuan et al. 2000). Aufgrund des hohen Partikel zu Infektionsverhältnisses der Parvoviren, kann jedoch nach Mikroinjektion von Parvovirus-Capsiden keine sichere Aussage über die Lokalisation der infektiösen Partikel gemacht werden, da sowohl infektiöse als auch nicht infektiöse Partikel mikroinjiziert wurden. Des Weiteren erscheint der lange Zeitraum bis zum Auftreten nukleärer Capside gegen einen direkten Transport zu sprechen, da karyophile Proteine nur Minuten brauchen, um in das Karyoplasma importiert zu werden.

Dessen ungeachtet könnte der Kernimport in diesem Fall durch das NLS des VP1 vermittelt werden. In Übereinstimmung damit ist das VP1 des MVM nicht für die Formation neuer Capside notwendig, sondern essentiell in einem Zeitraum zwischen Virusaufnahme und viraler DNA-Synthese (Tullis, Burger et al. 1993). Allerdings wird der VP1 N-Terminus nicht auf der Oberfläche von DNA-haltigen Partikeln exponiert, wie für das MVM gezeigt wurde (Cotmore, D'Abramo A et al. 1999).

Modifikationen des viralen Capsids könnten die Exposition von NLS-Sequenzen für den Kerntransport auslösen. Obwohl Parvovirus-Capside stabil sind, führen Hitze- (45°C) oder Harnstoffbehandlung des Capsids zur Exposition von internen verborgenen Sequenzen und Strukturen wie den VP1 N-Terminus und das 3'-Ende der viralen DNA (Christensen, Cotmore et al. 1997; Cotmore, D'Abramo A et al. 1999; Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002). Da auf dem VP1 spezifischen N-Terminus das Motiv der pvPLA₂ und die NLS-Sequenzen liegen und an sich durch Capsidstrukturen verdeckt bleiben, können pvPLA₂-Motiv und NLS bei derartiger Exposition aktiv bzw. genutzt werden. (Vihinen-Ranta, Kakkola et al. 1997; Zadori, Szelei et al. 2001; Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002). Mutationen in der VP1 N-Terminus Sequenz reduzierten die Infektiosität der Capside (Vihinen-Ranta, Kakkola et al. 1997; Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002). Es wird vermutet, dass der VP1 N-Terminus während des intrazellulären Capsidtransportes durch die essentielle endosomale Ansäuerung exponiert wird. So konnte am CPV gezeigt werden, dass cytoplasmatisch mikroinjizierte anti-VP1 N-Terminus AK den N-Terminus neutralisierten und die Infektion blockierten, was durch Ausbleiben der Zelllyse nach Infektion ermittelt wurde. Der VP1 N-Terminus ist daher zunächst für eine produktive Infektion essentiell. Da in diesem Test infizierte Zellen auf Zelllyse untersucht wurden, zeigt ein Ausbleiben der Zelllyse nach Mikroinjektion von VP1 N-Terminus AK nicht, ab welchem

Infektionsschritt es zu einer Exposition des VP1 N-Terminus kommt. Z.B. wird nicht geklärt, ob die VP1 N-Terminus-AK-Injektion zu einer Blockade des Kernimports von infizierenden Viren oder erst von Nachkommenviren führt und dadurch eine Infektion inhibiert. Die ermittelte Exposition des VP1 N-Terminus gibt auch keinen Hinweis darauf, dass dessen NLS tatsächlich für den Kerntransport des Genoms zuständig ist. Im Gegenteil konnten doch die in das Cytoplasma mikroinjizierten CPV-Capside durch AK im Kern wiedergefunden werden, ohne das Capside einem niedrigen endosomalen pH ausgesetzt waren und es demzufolge zu keiner Exposition des NLS tragenden VP1 N-Terminus kommen konnte. Somit muss angenommen werden, dass ein anderes NLS für den Kernimport des Virusgenoms oder Capsids zuständig sein könnte.

Ein nukleäres Lokalisationsmotiv (NLM) im VP2 des MVM ist mit dem Kerntransport von neusynthetisierten VP Oligomeren assoziiert (Lombardo, Ramirez et al. 2000). Das VP2 ist im Gegensatz zum VP1 für die Formation von neu gebildeten MVM- und AAV-Capsiden essentiell, die im Zellkern erfolgt (Tullis, Burger et al. 1993; Hoque, Ishizu et al. 1999).

1.5.4 Virale DNA Freisetzung aus dem Capsid und Initiation der Replikation

Für den Kernimport des Parvovirus könnte auch das NLS exponierende NS1-Protein fungieren. Bei DNA-haltigen Capsiden von MVM, CPV und AAV2 ist das 5'-Genomende mit dem NS1-Protein außerhalb des Capsids verbunden. Trotzdem scheint es fraglich, dass das NLS exponierende NS1 den Kernimport vermittelt, weil es während des Zelleintritts abgespalten wird (Cotmore and Tattersall 1989). Unter Beachtung, dass nur 1 von ca. 1000 Parvoviren infektiös ist, erfolgt die NS1-Abspaltung einzelner Parvoviren möglicherweise unvollständig. Diese wenigen Viruspartikel könnten noch ein NLS exponierendes NS1-Protein tragen, das sie befähigt, infektiös zu sein. Die Verbindung zwischen NS1-Protein und im Capsid verpackten Genom wird über 20 – 30 Nukleotide, die außerhalb des Capsids exponiert sind, hergestellt (Cotmore and Tattersall 1988; Prasad and Trempe 1995; Wang and Parrish 1999).

Das 3'-Ende der viralen DNA kann nach Behandlungen, die das Capsid nicht vollständig desintegrieren, aus dem Capsid exponiert werden, während die 3'-terminale Haarnadelschleife *in vitro* als Template der DNA-Polymerase agieren kann (Christensen, Cotmore et al. 1997; Cotmore, D'Abramo A et al. 1999; Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002). Es wurde daher spekuliert, dass das exponierte DNA-Ende nukleären Polymerasen als Template dient, wobei im Zuge der Gegenstrang-DNA-Synthese das Genom aus dem Capsid gezogen wird.

1.5.5 DNA Replikation, Genexpression und Assemblierung

Die parvovirale DNA-Replikation findet im Zellkern statt. Sie folgt einem unidirektionalen rollenden Haarnadelmechanismus (rolling hairpin mechanism) (Tattersall and Ward 1976; Astell, Chow et al. 1985) mit Hilfe von zellulären DNA-Polymerasen. Von Bedeutung sind dabei die beiden terminalen Palindrome (Faust and Ward 1979; Cotmore and Tattersall 1994), an

denen die Replikation initiiert wird, und die internen Replikationssequenzen am 5'-Ende des Genoms (Astell, Liu et al. 1996; Brunstein and Astell 1997). Beim MVM entsteht im doppelsträngigen Strang des 3'-Palindroms eine Blase, die für die Initiation der viralen Replikation essentiell ist (Faust and Ward 1979; Astell, Chow et al. 1985; Cotmore and Tattersall 1987; Cotmore and Tattersall 1994). Für die virale Replikation sind weiterhin zelluläre Faktoren, z.B. die DNA-Polymerase α und δ , notwendig, die transient während der S-Phase exprimiert werden (Cotmore and Tattersall 1987; Deleu, Pujol et al. 1999). Das NS1-Protein vom MVM interagiert mit der zellulären DNA-Replikation und führt zu einer Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase, so dass ideale Bedingungen für die Genomreplikation herrschen (Op De Beeck and Caillet-Fauquet 1997; Op De Beeck and Caillet-Fauquet 1997).

Zu Beginn der viralen Replikation wird die

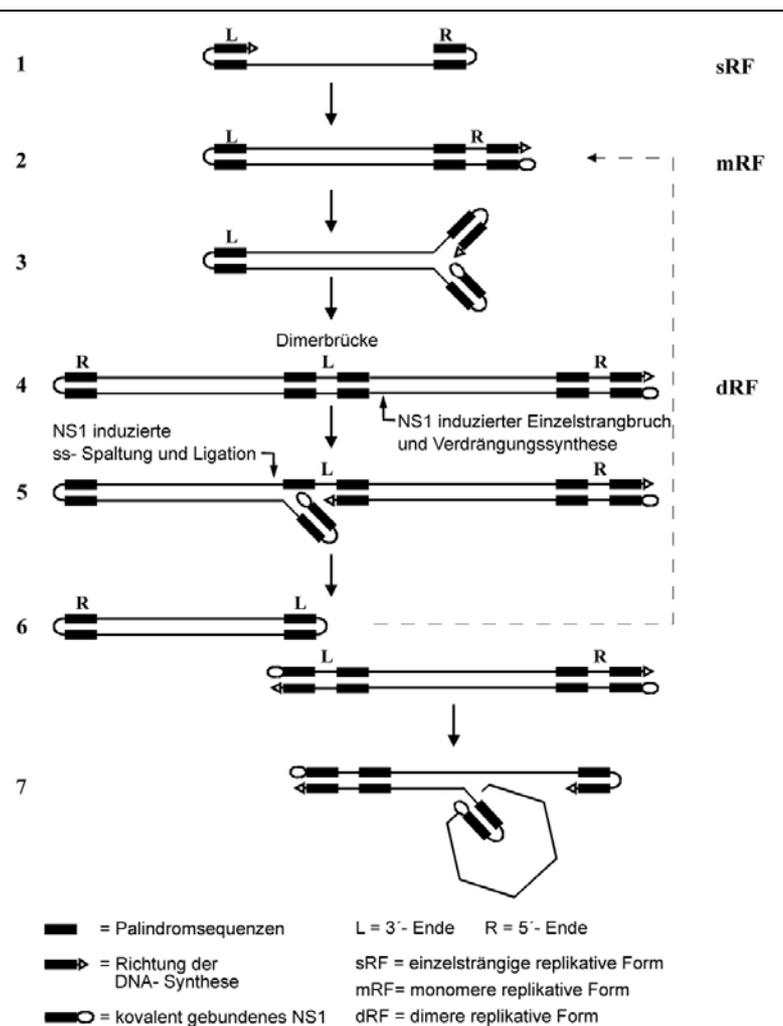


Abb. 5:

Modell der DNA Replikation autonomer Parvoviren

Das einzelsträngige Genom (sRF) wird von Polymerasen der Wirtszelle verlängert. NS1 führt zum Einzelstrangbruch und durch Replikation des rechten Endes entsteht eine doppelsträngige monomere replikative Form (mRF, 2). Die Enden auf der rechten Seite falten sich zurück (3) und vom 3'-Strang ausgehend wird eine doppelsträngige dimere Form (dRF, 4) synthetisiert. Das ausgedehnte linke Ende verbindet als „Dimerbrücke“ in der Mitte dieser Struktur zwei gegenläufig orientierte virale Genome. Anschließend wird die Dimerbrücke aufgelöst. Dies erfolgt durch einen ersten NS1 vermittelten Einzelstrangbruch und Verdrängungssynthese des linken Endes (5) und einen zweiten NS1 induzierten Einzelstrangbruch mit anschließender Ligation. Das kovalent geschlossene Molekül wird nach weiterem Einzelstrangbruch wieder verwertet. Das vollständig ausgedehnte Molekül wird verschiedenen Prozessen von Haarnadeltransfer und Verdrängungssynthese unterzogen, um schließlich die einzelsträngige DNA der Nachkommenviren zu bilden (7). Das Hexagon symbolisiert die Verpackung der DNA in Capside.

einzelsträngige Virus-DNA durch die Synthese des komplementären DNA-Stranges in eine monomere doppelsträngige replikative Form (mRF) umgewandelt (Abb. 5). Dabei dient die zurückgefaltete Haarnadelstruktur des 3'-Endes der zellulären DNA-Polymerase als Primer. Dieser Vorgang ist ausschließlich von zellulären Faktoren abhängig. Cyklin A aktiviert dabei die komplementäre DNA-Strang-Synthese (Kollek, Tseng et al. 1982; Deleu, Pujol et al. 1999;

Bashir, Horlein et al. 2000). Die mRF fungiert als Matrize für die virale mRNA-Synthese. Somit kann das für weitere Schritte essentielle NS1-Protein exprimiert werden. Durch fortschreitende Einzelstrangverdrängungssynthese wird die mRF zu einer dimeren replikativen Form (dRF) verlängert, aus der durch fortlaufende Replikation tetramere Formen entstehen können (Cotmore and Tattersall 1992). Anschließend werden aus diesen multimeren Formen durch NS1 vermittelte sequenzspezifische Einzelstrangsnitte monomere einzelsträngige Genome herausgeschnitten (Cotmore and Tattersall 1992; Cotmore and Tattersall 1994; Nuesch, Cotmore et al. 1995), an deren 5'-Enden je ein NS1 kovalent gebunden bleibt (Cotmore and Tattersall 1989) (Abb. 5).

Neu synthetisierte Capsid-Proteine werden in den Zellkern gebracht, wo anscheinend die DNA-Verpackung stattfindet, wie für AAV und MVM gezeigt wurde (Wistuba, Weger et al. 1995) (Tattersall and Cotmore 1988). Es wird vermutet, dass neusynthetisierte virale DNA in mindestens teilweise vorgeformte leere Capside im Zellkern verpackt wird (Hoque, Ishizu et al. 1999) (Tattersall and Cotmore 1988; Lombardo, Ramirez et al. 2000).

Beim H-1 Virus wird hauptsächlich der Minusstrang verpackt (Bates, Snyder et al. 1984). Für AAV wurde ein Modell entwickelt, nach dem das Rep52-Protein durch seine Helikasefunktion die einzelsträngige Virus-DNA in die vorgeformten leeren Capside presst (King, Dubielzig et al. 2001). Nach Neusynthese von Virusproteinen oder kompletten Nachkommenviren müssen diese aus dem Kern gebracht werden. Dafür scheint die Exposition des N-Terminus von VP2 beteiligt zu sein, wie es für reife MVM-Partikel beschrieben ist (Reguera, Carreira et al. 2004). Ebenso ist auf dem NS2-Protein des MVM ein nukleäres Export-Signal gefunden worden, dessen Bedeutung für den nukleären Austritt durch Punkt-Mutationsanalysen gezeigt worden ist (Eichwald, Daeffler et al. 2002).

Der parvovirale Lebenszyklus endet mit Lyse der Zellen. Die Cytotoxizität des NS1-Proteins auf die Wirtszellen ist für viele Parvoviren bekannt, wie z.B. H-1, MVM, B19 (Ozawa, Ayub et al. 1988; Li and Rhode 1990; Legendre and Rommelaere 1992). Die Parvovirus B19-Infektion so wie die Expression des B19 NS1 Proteins induzieren in Erythrozyten-Vorläufer-Zellen Apoptose, daraufhindeutend, dass Nachkommenviren vielleicht durch programmierten Zelltod freigesetzt werden (Sol, Le Junter et al. 1999), was auch die Freisetzung aus dem Kern einfacher erklären würde.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die unterschiedlichen Transportvorgänge von infizierenden und Nachkommenviren deuten darauf hin, dass sich die Oberfläche der parvoviralen Capside im Rahmen des Infektionsvorganges ändert.

Obwohl Zellteilung für eine produktive Infektion notwendig ist, ist der Kerneintritt des Virus nicht von einer Auflösung der Kernmembran abhängig. Es ist nicht bekannt, in welchem Zellkompartiment das parvovirale Genom freigesetzt wird und welches Protein den nukleären Import des viralen Genoms vermittelt. Das Virusgenom wird vermutlich durch den Kernporenkomplex in den Kern transportiert. Da Nukleinsäuren an sich nicht karyophil sind, muss das umhüllende Capsid mit physiologischen Kerntransportwegen zellulärer Proteine in Wechselwirkung treten. Nach Replikation werden die Genome in Capsidproteine verpackt, um Nachkommenviren zu bilden. Da dieser Vorgang vermutlich im Zellkern stattfindet, muss ein Kernimport von neu synthetisierten Capsidproteinen angenommen werden.

In Analogie zum nukleären Import karyophiler Proteine sollten daher Proteine des Parvovirus-Capsid ein Kerntransportsignal aufweisen. Tatsächlich konnte für einige bekannte Parvoviren auf dem VP1 ein klassisches Kerntransportsignal (NLS) und auf dem VP2 ein nukleäres Lokalisationsmotiv (NLM), eine NLS-ähnliche Struktur, identifiziert werden, die die nukleäre Aufnahme des Virus vermitteln könnten. Für die Bedeutung des VP1 spricht, dass es im Gegensatz zu VP2 für die Infektiosität neu gebildeter Viren notwendig ist. VP2 scheint wiederum essentiell für die Capsidbildung und die Einhüllung des viralen Genoms zu sein. Allerdings ist das NLS des VP1 nicht auf der Oberfläche von DNA-haltigen, extrazellulären Viruspartikeln exponiert und dürfte damit nicht funktionell sein. Möglicherweise werden Kerntransportsignale des Capsids während des Infektionsvorganges exponiert oder das Genom wird aus dem Capsid freigesetzt. Diese Vorgänge könnten dann verursacht werden, wenn die Viruscapside während der Infektion auf dem endozytotischen Weg einer essentiellen Ansäuerung unterlaufen.

Alternativ dazu könnte die nukleäre Aufnahme des Virus auch durch das NS1-Protein vermittelt werden, das ebenfalls ein Kernlokalisierungssignal trägt und an das virale Genom kovalent gebunden ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob während des Infektionsvorganges strukturelle Veränderungen auftreten, die den nukleären Import des Parvovirus H-1 induzieren könnten. Hierbei wurde zum einen untersucht, wann es zu einer Freisetzung von viraler DNA während des Infektionsvorganges kommt. Die DNA-Freisetzung wurde durch Sensibilitätsuntersuchungen der H-1 Viren auf S7 Nuklease untersucht. Zum anderen wurden die genomhaltigen Komponenten während des Infektionsvorganges analysiert, um zu wissen, ob das virale Genom im Capsid eingeschlossen den Zellkern betritt oder als flexibler Komplex von Genom und viralen Strukturproteinen importiert wird. Weiteres Ziel der Arbeit war es, die Art der Zellaufnahme des Parvovirus H-1 zu definieren.

Zu beachten ist allerdings, dass Versuche, die den Infektionsweg der Parvoviren untersuchen, dadurch beeinträchtigt werden, dass nur wenige virale Partikel infektiös sind, bzw. das Partikel zu Infektiosität-Verhältnis relativ hoch ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Automatischer Filmentwickler	Curix 60 AGFA, Morstel, Belgien
Autoradiographiefilme Hyperfilm MP	AMERSHAM BIOSCIENCES; Freiburg
Autoradiographiekassetten RPN 1642	AMERSHAM BIOSCIENCES; Freiburg
Binokularmikroskop	LEITZ, Wetzlar
Begasungs-Bruschrack Cytoperm	HERAEUS, Hanau
Dot Blot Kammer	Werkstatt der JLU
Einwegpipettenspitzen	SARSTEDT, Nürnberg
Einwegreaktionsgefäße 50 µl, 1,5 ml	EPPENDORF, Hamburg
Elektrophoresekammer für Agarosegele	GIBCO BRL, Karlsruhe Werkstatt der JLU
Gelaire BSB 4A, Arbeitsbank für Zellkultur	ICN BIOMEDICALS, Meckenheim
Gelkammer CS1, Thermodrucker, Monitor	CYPERTECH, MITSUBISHI, HANTAREX
Gelkammer für SDS-PAGE	HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, San Francisco, USA
Gewebekulturschalen (15 cm) Petrischalen	FALCON, Niderau
Gel Blotting Papier (Glasfaserfilter, GF/C, WHATMAN)	Schleicher&Schuell; MAGV, Rabenau-Londorf
Konfokales Laserscan-Mikroskop (LEICA DM IRBE)	LEICA Lasertechnik, Heidelberg
LIGHT-CYCLER	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Mikroliterpipetten 2µl, 20µl, 200µl, 1000µl	GILSON, Frankreich
Nanosep-Hülsen: K10 (500 µl)	PALL GELMAN LABORATORY, Dreieich
Neubauer Zählkammer	HECHT-ASSISTENT; KALLENSEE, Gießen
Nylonmembran, GeenScreen Plus	PALL GELMAN LABORATORY, Dreieich
Peristaltikpumpe 2232 Microperpex	SLKB, Schweden
Powersupply	HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, San Francisco, USA
PVDF-Membran	PALL GELMAN LABORATORY, Dreieich
Reaktionsgefäße 7 ml, 12 ml	SARSTEDT, Nürnberg
Reaktionsgefäße 50 ml	FALCON, New Jersey, USA
TST 41.14 Rotor	BECKMAN, USA
Sephadex G-50 „Quick Spin Columns“	KONTRON-HERMLE, Gosheim
Filter zur Abreinigung radioaktiver DNA	ROCHE, Mannheim
SDS-Page („NuPAGE“)	IN VITROGEN, LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	EPPENDORF, Hamburg
Typhoon 9200, Variable Mode Imager	AMERSHAM BIOSCIENCES; Freiburg
Ultrazentrifuge L5-50	BECKMAN, USA
UV-Stratalinker 2400	STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande
UV-Transluminator TFX-20M	VILBER-LOURMAT, Torcy, Frankreich
Vakuumpumpe Divac 2,4L	LEYBOLD, England
Zentrifuge BIOFUGE 15 R	HERAEUS, Hanau
Zentrifuge CR 422	JOUAN, Unterhaching

Zentrifugenröhrchen für Ultrazentrifuge

BECKMAN, USA

2.1.2 Chemikalien

Agarose	AMERSHAM BIOSCIENCES; Freiburg
Bafilomycin A ₁	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin	ROTH, Karlsruhe
Chloroform	ROTH, Karlsruhe
Collagen	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Coomassie Brilliantblau R250	MERCK, Darmstadt
CsCl ₂	MERCK, Darmstadt
DABCO	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Digitonin	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
EDTA	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
EGTA	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Ethanol	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg
FKS	PANSYSTEMS, Aidenbach
Harnstoff	MERCK, Darmstadt
HEPES	ROTH, Karlsruhe
Magermilchpulver	UELZENA, Uelzen
MOVICOL	HOECHST, Frankfurt
NaOH	MERCK, Darmstadt
Nonident P-40 (NP-40)	FLUKA, Buchs
Nystatin	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Phenol	ROTH, Karlsruhe
Radiochemikalien	AMERSHAM PHARMACIA, Freiburg
Saccharose	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	MERCK, Darmstadt
Tris-HCl	ROTH, Karlsruhe
Triton X-100	SERVA, Heidelberg
tRNA	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Ziegenserum	DIANOVA, Hamburg

Alle Chemikalien, Salze, organische Lösungsmittel wurden, soweit im Text nicht anders vermerkt, in der Qualität „reinst“ oder „pro analysi“ von der Firma MERCK, Darmstadt bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma MILLIPORE, Eschborn.

2.1.3 Enzyme

Fast Start Taq DNA Polymerase	ROCHE, Mannheim
Proteinase K	ROCHE, Mannheim
RNAse A [1U/μl]	ROCHE, Mannheim
S7 Nuklease [20U/μl]	ROCHE, Mannheim
10xTrypsin/EDTA	GIBCO BRL, Karlsruhe

2.1.4 Antikörper

Esel Anti-Kaninchen-AK, POD konjugiert	DIANOVA, Hamburg
Kaninchen Anti-HBV Core-AK	DAKO, Hamburg
Kaninchen Anti-NS1-AK SP7 (Faisst, Faisst et al. 1995)	freundliche Bereitstellung von Jan Cornelius, DKFZ, Heidelberg
Kaninchen Anti-VP2-AK	freundliche Bereitstellung von Jan Cornelius, DKFZ, Heidelberg
Maus Anti-Kernporen-AK (mAb414)	BAbCO, Richmond, CA, USA
Schaf Anti-Kaninchen-AK, konjugiert an magnetische Partikel (Eisen) (Dynabeads M-280)	DYNAL, Hamburg
Ziege Anti-Kaninchen-AK, Cy5 konjugiert	DIANOVA, Hamburg
Ziege Anti-Kaninchen-AK, FITC konjugiert	DIANOVA, Hamburg
Ziege Anti-Maus-AK, TR konjugiert	DIANOVA, Hamburg

2.1.5 Molekulargewichtsmarker

1 kb DNA Ladder	GIBCO BRL, Karlsruhe
Rainbow high Marker	AMERSHAM PHARMACIA, Freiburg

2.1.6 Plasmide

H-1 Plasmid (5176+2686bp)	Plasmid kodiert für das Parvovirus H-1 und in den Basisvektor pUC19 (2686bp) (NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach) kloniert. freundliche Bereitstellung von Jan Cornelius, DKFZ, Heidelberg
NS1 Plasmid/ KPA I 672+2686bp	Plasmid kodiert für das NS1 Protein des Parvovirus H-1 und wurde in den Basisvektor pUC19 (NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach) kloniert. freundliche Bereitstellung von Jan Cornelius, DKFZ, Heidelberg

2.1.7 Sonden und Primer.

H-1 3479f	Die 5' und 3' Enden des Primers korrespondieren zur Position (5'-3') 3479-3502 im viralen H-1 Genom	TIB MOLBIOL, Berlin
H-1 3732r	Die 5' und 3' Enden des Primers korrespondieren zur Position (5'-3') 3732-3707 im viralen H-1 Genom	TIB MOLBIOL, Berlin
H-1 3'FL-Sonde	Die 5' und 3' Enden der Hybridisierungssonde korrespondieren zur Position (5'-3') 3642-3669 im viralen H-1 Genom	TIB MOLBIOL, Berlin
H-1 5'LC-Sonde	Die 5' und 3' Enden der Hybridisierungssonde korrespondieren zur Position (5'-3') 3671-3698 im viralen H-1 Genom	TIB MOLBIOL, Berlin

2.1.8 Bakterien

<i>E.coli</i> -Stamm XL1-Blue	BULLOCK et al., 1987 (recA-, lac-, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1 {F', proAB, lacIq, lacZ, M15, Tn10})
-------------------------------	--

2.1.9 Zelllinien

HeLa	humane Zervixkarzinom Zelllinie mit epithelialer Morphologie. Die ursprünglichen HeLa Zellen stammten von Henrietta Lacks, die 1951 in Baltimore, USA, am Gebärmutterhalskrebs starb.
NB324K	(Shein and Enders 1962) (simian virus 40-transformed human newborn kidney cell)
HuH-7-Zellen	Humane Hepatom-Zelllinie (Nakabayashi, Taketa et al. 1982); aus dem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 57-jährigen Japaners wurde eine Primärkultur angelegt, eine Epithelzellenkolonie wurde aus dieser etabliert; bei Injektion in Nack-Mäusen erfolgt Tumorbildung. Die verwendeten Zellen waren ca. 250 x passagiert worden.

2.1.10 Lösungen und Puffer

Agarose-Probenpuffer (6x)	50% (w/v)	Saccharose
	1% (w/v)	SDS
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	6x	TAE
Agarose-Laufpuffer (TAE pH 7,8)	40mM	Tris-Acetat (ROTH, Karlsruhe)
	1mM	EDTA (SIGMA, Deisenhofen)
Coomassie-Entfärbelösung	20 %	Methanol
	5 %	Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliantblau
	7,5 %	Essigsäure
	50 %	Methanol
DMEM High Glucose	Pulverform	(GIBCO BRL, Karlsruhe)
	3,7 g/l	NaHCO ₃
	mit dH ₂ O	ad 9 l und steril filtrieren
	mit CO ₂	auf pH 7,0 einstellen,
vor Gebrauch zugesetzt:	ad 10 % (v/v)	FKS
Einfriermedium für Zellen	60 %	DMEM High Glucose
	20 %	FKS
	20 %	DMSO (MERCK, Darmstadt)

ECL-Substratlösung: Zur Verdrängung des Luftsauerstoffs wurden 225ml H₂O mit 25 ml 1M Tris-HCl pH 8,5 unter ständigem Rühren mehrfach mit Flüssigstickstoff versetzt und 1250 µl 500mM 3-Aminophthalhydrazid (SIGMA, Deisenhofen) ad 25 mM/DMSO (frische Lösung mit Stickstoff begast und aliquotiert bei -20°C gelagert), sowie 555 µl 180 mM 4-Hydroxycimtsäure (SIGMA, Deisenhofen) ad 3,7 mM/DMSO tropfenweise hinzugegeben. 30 min vor Gebrauch wurde 1:10000 18,3 % H₂O₂ (ad 0,0018 % (v/v) zugesetzt.

Ham's F12 Medium	Pulverform	(GIBCO BRL, Karlsruhe)
	3,7 g/l	NaHCO ₃
	mit dH ₂ O	ad 9 l und steril filtrieren
	mit CO ₂	auf pH 7,0 einstellen,
vor Gebrauch zugesetzt:	ad 10 % (v/v)	FKS

LB-Medium für Bakterienkultur	10 g	Bacto-Tryptone (DIFCO Laboratories, U.S.A.)
	10 g	Hefeextrakt (DIFCO Laboratories, U.S.A.)
	5 g	NaCl
	ad 1 l	dH ₂ O,
		Medium vor Gebrauch autoklaviert

LB/Amp-Agarplatten: Zu LB-Flüssigmedium wurde Agar (15 g/l) hinzugegeben. Nach dem Autoklavieren und Erkalten auf ca. 50°C wurde Ampicillin (ad 200 µg/ml) hinzugegeben; anschließend wurde das Medium in 10 cm Kulturschalen gegossen. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt.

Laemmli-Puffer (Laemmli 1970)	62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
	1 %	SDS
	10 %	Glycin (ROTH, Karlsruhe)
	5 %	2-Mercaptoethanol
	0,001 %	Bromphenolblau

PAGE-Sammelgelpuffer 4x	0,5 M	Tris-HCl pH 8,8
	0,1 %	SDS

PBS pH 7,4	171 mM	NaCl (ROTH, Karlsruhe)
	3,4 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,9 mM	KH ₂ PO ₄

2x Proteinase K-Puffer	200 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	25 mM	EDTA (pH 8,0)
	300 mM	NaCl
	2 %	SDS
SSC 10x	1500 mM	NaCl (ROTH, Karlsruhe)
	150 mM	Tri-Natriumcitrat
SSC- Puffer 20x	3 M	NaCl (ROTH, Karlsruhe)
	0,3 M	Natriumcitrat
	in 800 ml	dH ₂ O lösen,
	pH mit 10 M mit dH ₂ O	NaOH auf 7,0 einstellen, auf 1l auffüllen
TAE-Puffer (pH 7,8)	40 mM	Tris-Acetat pH 7,8
	1 mM	EDTA pH 8,0
TE-Puffer (VTE, virus TE)	50 mM	Tris-HCl (pH 8,7)
	0,5 mM	EDTA
TN-Puffer (pH 8,0)	10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	100 mM	NaCl
TNE-Puffer (pH 8,0)	10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Transport-Puffer 1x (TP)	20 mM	Hepes pH 7,3
	2 mM	Magnesiumacetat
	110 mM	Kaliumacetat
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	EGTA
Transportassay-Waschpuffer	1 x	Transport-Puffer
	0,7 %	BSA
	7 %	Ziegenserum
Trypsin 10x	25 g/l	Trypsin
	5 mM	EDTA
	15 mM	NaCl
Waschpuffer zur Cytosolisolation	1 x	TP
	0,5 %	BSA
	5 %	Ziegenserum
	2 mM	DTT

2.2 Methoden

2.2.1. Eukaryote Zellkultur

Die Arbeiten wurden mit den Zelllinien HeLa, NB-324K und HuH-7 durchgeführt. Das Arbeiten mit Zellen erfolgte unter einer Sterilbank (Laminar Flow-Arbeitsbank Lamin Air HB 2448, HERAEUS, Hanau). Die Zellmedien wurden ausschließlich mit Wasser aus einer Reinstwasseranlage (MILLIPORE, Eschborn) angesetzt und sterilfiltriert oder autoklaviert. Die benötigten Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.2.1.1 Lagerung, Inkulturnahme und Kultivierung von Zellen

Zum Lagern wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 15 cm-Zellkulturschale in 1ml Einfriermedium aufgenommen und bei -175°C in 1,8 ml Kryogefäßen der Firma Nalgene eingefroren.

Für die Inkulturnahme der Zellen wurden sie auf Eis aufgetaut und mit 37°C-warmen Zellmedium versetzt. Nach 5-minütiger Zentrifugation der Zellen bei 1800 rpm wurde das zelltoxische DMSO-haltige Einfriermedium entfernt. Das Zellpellet wurde in Zellmedium/ 10% FKS resuspendiert und die Zellen auf 15 cm- Zellkulturschalen (FALCON, bezogen über FISHER-SCIENTIFIC, Niderau) ausgesät.

Die adhärent in Monolayern wachsenden Zellen wurden in Zellkulturschalen in DMEM („Dulbeccos Modified Essential Medium“- Medium/ 10% FKS oder Ham's F12 Medium/ 10% FKS angezogen. Alle Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 10% und 90% rel. Luftfeuchte kultiviert. Bei ca. 90% Konfluenz wurden die Zellen zum Passagieren mit 1x Trypsin-EDTA/PBS-Lösung abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in Kulturmedium suspendiert, auf zwei neue Zellplatten gegeben und Kulturmedium ergänzt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Wenn eine Bestimmung der Zellzahl notwendig war, wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurde ein 10µl-Tropfen der Zellsuspension zwischen Deckgläschen und Zählfeld der Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in den 4 äußeren Quadranten des Zählfeldes mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Grundfläche von 0,04mm² pro 25 Kleinquadrate gezählt. Die Zellzahl in einem Quadrat bestehend aus 25 Kleinquadraten entspricht dem Zellgehalt in 0,1 µl. Die mittlere Zellzahl der 4 Quadrate mit 10 multipliziert entspricht der Zellzahl pro Mikroliter.

2.2.2 S7 Nuklease Verdau von Parvo H-1 Viren

Es wurden H-1 Viren mit S7 Nuklease ad 2 U/µl in Gegenwart von 5 mM CaCl₂ für 2-13 h bei 37°C verdaut. S7 Nuklease verdaut sowohl Einzelstrang- wie auch Doppelstrang-DNA. Der Verdau wurde durch Zugaben von EGTA ad 10 mM gestoppt und die geschützte virale DNA durch Proteinase K Verdau aus dem H-1 Capsid freigesetzt.

2.2.3 Desintegration von H-1 Capsiden durch Harnstoff

H-1 Viren wurden mit Harnstoff ad 4 M für 30 min bei 65°C inkubiert. Durch die Harnstoffbehandlung wurden die Capsidproteine desintegriert und setzten ihr Genom frei. Kovalente Bindungen blieben nach Harnstoffbehandlung intakt.

2.2.4 Parvovirus H-1 Infektion

Zellinfektionen wurden unter einer Sterilbank (Laminar Flow-Arbeitsbank Lamin Air HB 2448, HERAEUS, Hanau) durchgeführt. Virusstammkonzentrationen in VTE wurden vor Infektion in Zellmedium (DMEM)/10% FKS verdünnt, um das EDTA der VirusstammLösung mit den Ca^{2+} und Mg^{2+} aus dem Medium zu neutralisieren. Bei Erstellen einer Virusverdünnungsreihe zur Infektion in abnehmender Viruskonzentration wurde zwischen jedem Verdünnungsschritt die Pipettenspitze gewechselt und gevortext, um eine möglichst lineare Verdünnungsreihe zu erhalten. Vor der Zellinfektion einer halbkonfluenten Zellplatte wurde das Medium der Zellen abgenommen und die Virussuspension in Zellmedium/10% FKS hinzugefügt. Bei Verwendung einer 16 cm Gewebekulturschale wurden ca. 5 ml Virussuspension in DMEM/10% FKS eingesetzt. Es sollten nicht weniger als 10^6 Zellen pro 16 cm Zellplatte infiziert werden, weil bei geringeren Zellkonzentrationen die Infektion ineffizient wird, da die Wahrscheinlichkeit des Virus, eine Zelle zu treffen, abnimmt. Dies gilt vor allem bei Infektion einer Virusverdünnungsreihe, denn bei geringen Zelldichten besteht dann keine Linearität in der Viruskonzentration pro Zelle. Zur Virusadhäsion wurden die Zellen für 2-3 h bei 4°C oder RT gelagert. Im Anschluss wurde den Zellen noch ca. 5ml DMEM/10% FKS zugefügt und die Zellplatte zur Infektion in den Brutschrank bei 37°C für bestimmte Infektionszeit gestellt.

2.2.5 Berechnung des Virustiters mit der Endverdünnungsmethode nach Spearman/Kärber

Hierbei wird das Eintreten oder Ausbleiben des Infektionserfolges bzw. der Zellyse beurteilt. Zur Titerbestimmung wird das virushaltige Material so lange verdünnt, bis kein Effekt mehr erkennbar ist. Aufgrund des in infizierten Zellkulturen beobachteten cytopathischen Effekts kann der Titer als Angabe der Infektiösität mit Hilfe von Schätzverfahren berechnet werden. Der Titer gilt als Kehrwert derjenigen Verdünnung, bei der statistisch die Hälfte der Testobjekte reagiert. Er wird als mittlere effektive Dosis (ID_{50}) bzw. (TCID_{50} = „tissue culture infectious dose“) angegeben und in der Regel auf 1ml bezogen.

Auf eine 96 Lochplatte wurden 10^4 HeLa Zellen pro Vertiefung gesät. 7 Reihen mit je 12 Vertiefungen wurden in geometrischen (1:2) Verdünnungsschritten infiziert. Eine Reihe blieb als Kontrolle uniniziert. In den Reihen wurden 6 der Zellflächen mit unbehandelten H-1 Viren und 6 Zellflächen mit S7 Nuklease vorbehandelten Viren infiziert (Abb. 33). Nach 3 Tagen Infektion wurden die Zellen auf Zellyse als Zeichen einer erfolgreichen Infektion untersucht (Abb. 33).

Aufgrund der Beobachtung wurden die Virustiter bzw. mittleren effektiven Dosen der unbehandelten und S7 Nuklease vorbehandelten H-1 Viren nach folgender Formel berechnet:

$$ID_{50}/\text{Volumen} = x_0 - \frac{d}{2} + \frac{d}{n} \sum xi$$

x_0 = positiver Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Zellen lysiert sind

d = Dosisabstand in Logarithmen

n = Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Zellflächen

$\sum xi$ = Summe aller auf die Infektion mit Zelllyse reagierenden Zellflächen, ab und einschließlich der bei x_0

2.2.6 Infektionsinhibition durch lysosomtrophe Agentien

2.2.6.1 NH_4Cl

NH_4Cl wurde eingesetzt, um den endosomalen pH während der Infektion zu neutralisieren. Hierzu wurde dem Zellmedium während der Infektion NH_4Cl ad 50 mM zugefügt, wobei die Zellen bereits vor Infektion in NH_4Cl ad 50 mM für 1 h bei 34°C inkubiert wurden.

2.2.6.2 Bafilomycin A_1

Bafilomycin A_1 , ein spezifischer Inhibitor vakuolärer H^+ ATPasen, die einen niedrigen pH in endozytotischen und exozytotischen Kompartimenten bewirken, wurde zur Endozytoseblockade während der Infektion eingesetzt. Hierzu wurden die NB-K Zellen in Gegenwart von Bafilomycin A_1 ad 100 nM infiziert. Bafilomycin A_1 wurde in DMSO ad 500 μM gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Um den Effekt von Bafilomycin A_1 auf die Parvovirus H-1 Infektion zu untersuchen, wurden drei Zellansätze in geometrischer Verdünnungsreihe (1:10) ab 500 Viren pro Zelle in Gegenwart von Bafilomycin A_1 infiziert und nach 2 d auf Zelllyse untersucht.

2.2.7 Inhibition der Caveolaeformation durch Nystatin

Zur Untersuchung des Aufnahmeweges des H-1 Virus wurden NB-K Zellen in Gegenwart von Nystatin, einem Inhibitor der Caveolaeformation, infiziert. Dazu wurde dem Zellmedium zu Infektionsbeginn 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Nystatin zugesetzt. Nystatin wurde in DMSO in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gelöst. Der Einfluss von Nystatin auf die Parvovirus H-1 Infektion im Zellinfektionsversuch mit Erstellen einer Virusverdünnungsreihe (1:10) ab 500 Viren pro Zelle untersucht.

2.2.8 Isolierung von Zellkompartimenten

Zur Erstellung von Infektionskinetiken und Analyse von Viren in den einzelnen Zellkompartimenten wurden diese isoliert und weiterverwendet.

2.2.8.1 Isolierung des Zellüberstandes

Der Zellüberstand wurde durch Abziehen des Zellmediums von infizierten Zellen einer Zellkulturplatte nach vorgesehener Infektionszeit, bzw. sobald sich ein konfluentes Wachstum der Zellen eingestellt hat, isoliert.

2.2.8.2 Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin

Um das Cytosol der Zellen zu isolieren, wurden diese mit Digitonin permeabilisiert. Dazu musste zunächst das serumhaltige Medium ausgewaschen werden, da Digitonin durch Serum inaktiviert wird. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann für 5 – 15 min im Brutschrank mit serumfreien Medium unter Zusatz von 5 µl/ml bzw. 50 µg/ml (0,5%) Digitonin inkubiert. Das Detergenz Digitonin bewirkt ein Permeabilisieren von ausschließlich cholesterolhaltigen Membranen wie der Plasmamembran. Andere Membranen, wie die Zellkernmembran oder die des Endoplasmatischen Retikulums (ER) werden nicht angegriffen. Der Grad der Permeabilisierung erkennbar an einer dunkleren unregelmäßigen Sprengelung der Zellkerne und veränderten Zellmorphologie wird mikroskopisch kontrolliert. Nach Permeabilisierung der Zellmembran wurde das cytosolhaltige Medium von der Zellplatte abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Waschlösung (bestehend aus 1x TP, 0,5% BSA/PBS, 5% Ziegenserum, 2mM DTT und H₂O) zweimal 10 min auf Eis gewaschen, um die restlichen cytosolischen Faktoren zu gewinnen. Falls sich während des Waschvorganges Zellen von der Platte lösten, wurde der Überstand 5 min bei 1000g (3400 rpm in der Zentrifuge CR 422, JOUAN, Unterhaching) zentrifugiert und das zellhaltige Pellet verworfen.

2.2.8.3 Karyoplasmaisolation durch Tx100 Behandlung

Im nächsten Schritt wurde das Karoplasma isoliert. Dazu wurde die Kernmembran der übrigen Zellen durch Zugabe von ca. 10 ml 0,1 % Triton-X-100 für 15 min bei 37°C im Brutschrank oder durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Die aufgelösten Zellen wurden danach mit einem Gummischaber in Flüssigkeit abgekratzt, gevortext und in Reaktionsgefäßen (SARSTEDT) 5 min bei 1000g (3400 rpm in der Zentrifuge CR 422, JOUAN, Unterhaching) zentrifugiert. Der Karyoplasma-haltige Überstand wurde abgezogen, das Pellet wurde verworfen.

Die Zellkompartimente wurden nach Isolation für 30 min bei 10°C und 25000 rpm im TST 28.38 zur Abtrennung von Detritus zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 10µl RNase A für 30 min bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Zellkompartimente für 24 h bei 10°C im TST

28.38 Rotor (BECKMAN, München) zentrifugiert. Davon wurden die Pellets in 1 ml PBS resuspendiert und für die Gradientenzentrifugation weiterverwendet.

2.2.9 Dichtegradientenzentrifugation von Zellkompartimenten und H-1 Genom

Zur Charakterisierung der H-1 Viren während des Infektionsvorganges wurden die Kompartimente H-1 infizierter Zellen im Sucrosegradienten aufgetrennt.

Der Sucrosegradient diente der Separation der Viruspartikel abhängig von ihrer Größe, Form und Dichte.

2.2.9.1 Dichtegradientenzentrifugation in Sucrose

Ein TST 41.14-Zentrifugenröhrchen (BECKMAN, München) wurde mit SIGMACOTE (SIGMA, Deisenhofen) silikonisiert und mit PBS ausgespült. In dem silikonisierten Zentrifugenröhrchen wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers (HOEFER, bezogen über PHARMACIA, Freiburg) bei Geschwindigkeitsstufe 5 ein kontinuierlicher Sucrose-Dichtegradient aus jeweils 15 % (w/w) und 60 % (w/w) Sucrose präformiert. Die Probe (500µl des resuspendierten Pellets) wurde vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen und für 24 h bei 10°C und 25000 rpm im TST 41.14 Rotor (BECKMAN, München) in einer Ultrazentrifuge (L5-50, BECKMAN, München) zentrifugiert. Der Gradient wurde danach mit Hilfe einer Glaskapillare langsam bei Geschwindigkeitsstufe 2 vom Boden des Zentrifugenröhrchens her in ca. 25 Fraktionen zu je 500µl geerntet. Die Dichten der einzelnen Fraktionen wurden im Abbé-Refraktometer (ZEISS, Jena) bestimmt.

2.2.10 Aufreinigung viraler DNA

2.2.10.1 DNA Aufreinigung durch Proteinase K Verdau

Um das Virusgenom durch radioaktive Hybridisierung oder PCR nachweisen zu können, wurde die virale DNA durch Proteinase K Verdau aus dem Virus Capsid freigesetzt.

Zum Proteinase K Verdau wurde die Probe mit 1 Probenvolumen Proteinase K in 2x Proteinase K Puffer gemischt. Der Verdau erfolgte bei 65°C mindestens 4 h. Nach dem Verdau wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um die in der Lösung enthaltenen Proteine zu entfernen.

2.2.10.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Alle anfallenden Phenol- und Chloroform-haltigen Abfälle müssen gesondert entsorgt werden. Die verdauten Proben wurden mit einem Volumen Phenol versetzt, 1 min gevortext und 1 min in der Tischzentrifuge (5415 EPPENDORF) bei 14000 rpm zentrifugiert. Auf diese Weise werden Verschmutzungen denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase an, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase bleiben. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt. Falls nach der Zentrifugation eine Interphase erschien, die ein Gemisch aus Proteinen und Nukleinsäuren enthielt, musste diese zusammen mit der

unteren Phenolphase und 1 Volumen 1x VTE versetzt, gevortext und wie oben beschrieben zentrifugiert werden. Die resultierende obere Phase wurde abgenommen und zu der ersten DNA-haltigen Phase pipettiert. Der Schritt wurde so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr erschien. Um die Phenolreste in dem DNA-haltigen Überstand zu entfernen, wurde dieser mit einem Volumen Chloroform versetzt, 1 min gevortext und 1 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei Bildung einer Interphase wurde der letzte Schritt wiederholt. Anschließend erfolgte durch eine Ethanol-Präzipitation die Fällung der Nukleinsäuren.

2.2.10.3 Ethanol-Präzipitation zum Fällen von DNA

Der hydrophile DNA-haltige Überstand wurde mit 2,5 Probenvolumina 96% Ethanol und 1 µg tRNA versetzt und gevortext. Das Gemisch wurde für mindestens 1 h bei -70°C weggefroren. (Hierbei fällt die tRNA und copräzipitiert die Nukleinsäuren). Es folgte eine 1 h Zentrifugation bei 4°C und 15000 rpm. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das DNA Pellet zum Entfernen des restlichen Ethanols 5 min in einem Vakuum-Exikator getrocknet. Das Pellet wurde in gewünschtem Volumen DNase freien H₂O resuspendiert.

Die aufgereinigte Nukleinsäure konnte danach bei -20°C gelagert oder durch Southern Blot oder PCR nachgewiesen werden.

2.2.10.4 Aufschluss von Virus Capsiden durch NaOH Denaturierung

Die Denaturierung von Virus Capsiden zur Genomfreisetzung mit NaOH wurde bei Dichtegradienten Fraktionen von HeLa Zellkompartimenten angewendet, um diese auf Virus DNA durch Dot Blot Hybridisierung zu untersuchen.

Die Proben wurden mit NaOH ad 0,1 M für 15' bei RT versetzt. Im Anschluss wurden die Proben im Dot Blot auf eine Nylonmembran übertragen.

2.2.10.5 Einengung von Proben durch Filtration

Da H-1 DNA haltige Proben zur Auftrennung durch Gelelektrophorese nur in geringem Volumen von ca. 20 µl eingesetzt werden konnten, musste bei größeren Probenvolumina das Volumen durch Filtration eingengt werden. Dazu wurden 10 K NANOSEP-Konzentratoren (Ausschlussgrenze = 10 kDa, PALL GELMAN LABORATORY) verwendet. Diese wurden vor Filtration 1x mit 500 µl PBS und anschließender Zentrifugation in der Tischzentrifuge (5415 EPPENDORF) bei 14000 rpm gespült. Danach wurde die Filterhülse mit Probe und PBS ad 500 µl beladen und bei 14000 rpm bis auf ca. 100 µl eingengt. Das Filtrat wurde verworfen. Der restliche Virusgenom-haltige Filtrerrückstand wurde mit PBS auf 500 µl aufgefüllt und wieder auf ca. 100 µl eingengt. Der Vorgang wurde insgesamt 3 x durchgeführt. Im letzten Schritt wurde die Probe auf ca. 30 µl eingengt, so dass ein kleines hochkonzentriertes Probenvolumen übrig blieb.

2.2.11 Nachweismethoden und Quantifizierung viraler DNA

2.2.11.1 Dot Blot

Zu Beginn wurde eine in die Dot Blot Kammer (Werkstatt der JLU) passende Nylonmembran zurechtgeschnitten. Die Nylonmembran wurde wie für den Southern Blot vorbereitet. Die Membran wurde kurz in destilliertem H₂O angefeuchtet. Danach wurde die Nylonmembran für 15 min in 10x SSC getaucht und anschließend in der Dot Blot Kammer platziert. Alle Öffnungen der Kammer wurden mit 500 µl PBS zweimal durchgespült. Beim Beladen der Kammeröffnungen war darauf zu achten, dass keine Luftblase auf der Blotmembran verblieb, die ein Durchsaugen der Probe unmöglich machte. Ebenso mussten alle Kammeröffnungen beladen sein, damit beim Durchsaugen der Proben kein Kurzschluss entstand, der das Übertragen der restlichen Proben auf die Membran verhinderte. Nach dem Durchspülen wurden die Kammeröffnungen mit den Proben z.B. den NaOH denaturierten Gradientenfraktionen, beladen und durch Saugen auf die Nylonmembran übertragen. Im Anschluss wurden die Blotpunkte noch einmal mit PBS durchgespült. Anschließend wurde die Blotmembran zur DNA Denaturierung für 1 min in 0,4 M NaOH getaucht und danach in 0,2 M Tris-HCl pH 7,5/ 1x SSC für 1 min neutralisiert. Durch UV Crosslinking (im UV Stratalinker 2400, STRATGENE) wurden die Nukleinsäuren auf der noch feuchten Nylonmembran fixiert. Trockene Membranen benötigen eine viele niedrigere UV Dosis und damit geringere UV-Expositionszeit. Bis zur Hybridisierung konnte die Blotmembran Luft getrocknet werden.

Beim Bloten mehrerer Membranen nacheinander in der Dot Blot Kammer, muss die Kammer stets gründlich von Nukleinsäurerückständen des letzten Blottransfers gereinigt werden, damit diese nicht zu falsch positiven Signalen auf der neuen Blotmembran führen.

2.2.11.2 Agarosegelelektrophorese

Mittels der Agarosegelelektrophorese können Makromoleküle in einem homogenen elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

In Abhängigkeit davon, welche Art von Makromolekülen (Nukleinsäuren oder Proteine) durch dieses Verfahren nachgewiesen werden sollten, wurden die Proben mit unterschiedlichen Agaroseprobenpuffern versetzt. Bei Nukleinsäurenachweis enthielt der Probenpuffer SDS, welches die Bindung der DNA an die Proteine aufhebt. Für den Nachweis von Capsiden wurde ein Probenpuffer ohne SDS verwendet.

Die Auftrennung der viralen DNA erfolgte in einem nativen 1% Agarosegel. Zur Herstellung des 1%igen Gels wurden 4 g Agarose (AMERSHAM, Freiburg) in 400 ml 1 x TAE Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und in flüssigem Zustand auf einen Gelschlitten gegossen, in den zur Aussparung der Probenaschen ein Teflonkamm eingesteckt wurde. Das fest gewordene Gel wurde in eine horizontale mit 1 x TAE-Laufpuffer befüllte Gelkammer gelegt. Der Teflonkamm wurde entfernt und die Proben auf das Gel aufgetragen. Zum Vergleich der Laufhöhe und der Konzentrationen der aufgetrennten Proben wurde eine

Standardverdünnungsreihe vom H-1 oder NS1 Plasmid im Gel mitgeführt. Die Agarosegelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 10 V/cm Gellänge durchgeführt.

2.2.11.3 Nachweis von Nukleinsäuren im Agarosegel mit Ethidiumbromid-Färbung

Sollte die Laufföhe in Basenpaaren angegeben werden, wurde dem Agarosegel zusätzlich ein DNA Marker aufgetragen. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde dann das Agarosegel für 15-30 min bei 4°C in einem Ethidiumbromidbad (2µg/ml) inkubiert. Das Ethidiumbromid interkalierte mit der DNA und konnte anschließend durch UV-Licht (260 nm Wellenlänge, TFX-20M, VILBER-LOURMAT, Torcy, Frankreich) angeregt werden. Mit einer elektronischen Gelkamera (CS-1, CYBERTEC, Berlin) wurde die Fluoreszenz fotografiert und über einen Thermodrucker (MITSUBISHI, Paderborn) ausgedruckt. Die Größenbestimmung der DNA erfolgte durch Vergleich der Bandenlaufhöhe mit denen des Größenmarkers, wobei bei Untersuchung von aufgetrennten ss H-1 Genomen keine Größe sondern nur das Laufverhalten im Vergleich zum DNA Marker angegeben werden konnte.

2.2.11.4 Southern Blot

Mit dem Southern Blot wurden die im 1% Agarosegel aufgetrennten viralen Nukleinsäuren anschließend in einem von SOUTHERN (1975) beschriebenen Kapillarblot in 10x SSC über Nacht vom Agarosegel auf eine Nylonmembran (GeneScreen Plus, PALL) transferiert und durch radioaktive Hybridisierung nachgewiesen.

Eine Nylonmembran wurde 1 mm größer als das Agarosegel nach allen Seiten zugeschnitten und eine Ecke zur Markierung abgeschnitten. Die Membran wurde kurz in destilliertem H₂O angefeuchtet. Danach wurde die Nylonmembran für 15 min in 10x SSC getaucht. Währenddessen wurde das Agarosegel mit 0,25 M HCl im Schüttelbad für 10 min behandelt und kurz in dH₂O gewaschen, um HCl- Rückstände zu entfernen. Anschließend wurde das Gel zur Denaturierung 30 min bei RT in 0,4 M NaOH/ 0,6 M NaCl im Schüttelbad gewaschen. Danach wurde das Gel in 1,5 M NaCl/ 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 für 30 min neutralisiert. Das Gel wurde aus der Neutralisationslösung geholt und mit der Unterseite nach oben auf ein angefeuchtetes Whatman Papier blasenfrei aufgelegt. Die Gelränder wurden mit Folie oder Parafilm abgedeckt, um einen Kurzschluss des Kapillarblots zu vermeiden. Erst jetzt wurde die Nylonmembran zentriert. Zwei zurechtgeschnittene Whatman Papiere wurden in 2x SSC angefeuchtet und auf die Blot- Membran gelegt. Anschließend wurde ein 15 cm hoher Papiertücherstapel oben aufgelegt und darauf eine Platte mit 500 g Gewicht. Der Transfer dauerte ca. 24 h, wobei nach den ersten 4 h die Papiertücher gewechselt wurden.

Nach dem Transfer wurden die Papiertücher und Whatman Papiere entfernt und die Gelkammern auf der Blotmembran mit einem Bleistift markiert. Das Gel wurde verworfen, die Blotmembran wurde in 0,4 M NaOH für 1 min zur DNA Denaturierung getaucht. Anschließend wurde die Membran in 0,2 M Tris-HCl pH 7,5/ 1x SSC für 1 min neutralisiert. Durch UV

Crosslinking (im UV Stratalinker 2400, STRATGENE) wurden die Nukleinsäuren auf der Nylonmembran, die dafür auf ein nasses Filterpapier gelegt wurde, fixiert. Trockene Membranen benötigen eine viele niedrigere UV Dosis und damit geringere UV-Expositionszeit. Zum Schluss wurde die Membran in 2x SSC gereinigt, um Agarosegelreste von der Membran zu entfernen, da diese zu einem hohen autoradiographischen Hintergrund führen. Zum Lagern konnte die Membran getrocknet werden. Vor Prähybridisierung des Blot wurde die Membran in 2x SSC angefeuchtet.

2.2.11.5 Herstellung einer radioaktiven Sonde

Beim Arbeiten mit radioaktiven Materialien wurde stets unter Strahlenschutz gearbeitet. Zum Pipettieren radioaktiver Lösungen wurden ausschließlich gestopfte Spitzen verwendet. Radioaktiver Abfall wurde in gesonderten dafür geeigneten Behältern gesammelt und in einem dafür vorgesehenen Isotopenlabor aufbewahrt.

Die radioaktive Sonde zur Hybridisierung des Dot- und Southern Blot wurde nach dem Protokoll des Rediprime II DNA Labelling Kit (AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg) hergestellt. Es wurden ein NS1 Plasmid oder H-1 Plasmid markiert. 25 ng des zu markierenden Plasmids wurden in 45 µl TE-Puffer (VTE) verdünnt. Die Plasmidkonzentration wurde hierzu photometrisch bestimmt. Die Plasmidprobe wurde im Eppendorf Reaktionsgefäß durch Erhitzen bei 95-100°C für 5 min denaturiert. Danach wurde kurz zentrifugiert und die denaturierte Plasmid DNA mit dem Klenow-Enzym Mix gemischt. Dazu wurden 5 µl radioaktives $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (AMERSHAM, Freiburg), entsprechend 50 µCi, hinzugegeben. Die Reaktion wurde zur Doppelstrangsynthese bei 37°C inkubiert und nach 10 min durch Zusatz von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide abzutrennen wurde die Sonde durch Quick Spin Columns (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim) gefällt. Die Strahlung von 1 µl Sonde wurde im Szintillationszähler unter Zusatz von 1ml Szintillationslösung gemessen. Dazu wurde 1 µl Sonde mit 1 ml Szintillationslösung in ein Eppendorf Cup überführt. Der Wert wurde in Counts/ml angegeben. Für den Blot wurden 2×10^5 Counts pro cm^2 Membranfläche eingesetzt.

2.2.11.6 Hybridisierung des Dot Blot und Southern Blot mit $\alpha^{32}\text{P}$ markierter Plasmidsonde

Die radioaktive Hybridisierung der Dot Blot und Southern Blot Membranen wurden mit einem gebrauchsfertigen Hybridisierungspuffer „Rapid-hyb buffer“ (AMERSHAM BIOSCIENCES Freiburg), durchgeführt. Der Hybridisierungspuffer wurde in einer Hybridisierungsröhre auf 65°C in einem Hybridisierungsofen (HYBAID, Heidelberg) erwärmt. Abhängig von der Größe der Hybridisierungsröhre wurde soviel Hybridisierungspuffer eingesetzt, dass die Membran ausreichend bedeckt wurde. Bevor der Blot in die Hybridisierungsröhre zur Prähybridisierung gelegt wurde, musste er, wenn notwendig, in 2x SSC angefeuchtet werden. Die

Prähybridisierung wurde bei 65°C für 30 min durchgeführt. Vor Hybridisierung wurde die Plasmid Sonde für 5 min bei 98°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Zur Hybridisierung für ca. 2 h bei 65°C wurde die denaturierte Sonde mit dem Hybridisierungspuffer in der Hybridisierungsröhre gemischt. Nach der Hybridisierungszeit wurde der Sonden-haltige Puffer verworfen und die Membran erst für 20 min in 50 ml 2x SSC/ 0,1% SDS bei RT und anschließend 2 mal für 15 min in 50 ml 0,5x SSC/ 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die Blotmembran wurde getrocknet in Folie eingeschweißt und auf einem Phosphorimagerscreen (FUJI PHOTO FILM) in einer Autoradiographiekassette (RPN 1642, AMERSHAM, Freiburg) exponiert. Die Expositionszeit betrug abhängig vom Erfolg des Blottens, der Hybridisierung und DNA Menge der Blotmembran 10 min bis mehrere Stunden.

2.2.11.7 Darstellung und Quantifizierung der Virus DNA auf dem Dot - und Southern Blot

Nach der Screen-Exposition wurde die Blotmembran in einem Bioimager (RAYTEST, Straubenhardt) oder in einem Fluoroimager (TYPHOON 9200 Variable Mode Imager, AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg) dargestellt. Der Bioimager-Scan oder Fluoroimager-Scan wurde als Datei ausgelesen (Software: PC-BAS-READER 2.09, RAYTEST, Straubenhardt, bzw. IMAGEQUANT), gespeichert, mit der Bildbearbeitungssoftware TINA (Version 2.09, RAYTEST, Straubenhardt, bzw. IMAGEQUANT) dargestellt und konnte ausgedruckt werden. Die Quantifizierung der Blotsignale erfolgte durch die oben genannten Bildbearbeitungsprogramme. Die Blotsignale wurden dazu in einheitlichen Flächen eingegrenzt und ausgewertet. Zusätzlich wurde eine Fläche hinzugefügt und quantifiziert, die den Hintergrund der Autoradiographie wiedergab. Die ermittelten Signalwerte wurden durch die Fläche dividiert. Der Quotient aus Hintergrundsignal und Fläche wurde von den anderen Quotienten subtrahiert, so dass man einen um die Hintergrundstrahlung bereinigten Wert erhielt. Die durch die Bildbearbeitungsprogramme ermittelten Signalwerte wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (MICROSOFT EXCEL) übertragen. Mit diesem Programm wurden die Plasmidkonzentrationen den Signalwerten der Plasmid-Standardreihe zugeordnet. Aus zugeordneten Werten wurde eine logarithmische Regressionskurve erstellt. Anhand dieser Regressionskurve wurden die Blotsignale der untersuchten Proben (virale Genome) quantifiziert.

2.2.11.8 Parvovirus H-1 Real-Time-PCR mit dem Light-Cycler

Das Prinzip der Parvovirus H-1-Real-Time-PCR mit Hilfe des Light-Cyclers (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim) beruht auf der Amplifikation einer ausgewählten Region des Parvovirus H-1 Genoms mit Hilfe je eines spezifischen sense- und antisense-Primers. Der Zeitpunkt des Auftretens der synthetisierten Amplifikate korreliert mit der Genom-Ausgangskonzentration (H-1 Genome) in der Probe. Der Einsatz von Hybridisierungssonden

ermöglicht einen hochspezifischen DNA Nachweis und die Quantifizierung der eingesetzten Genommenge. Zwei sequenzspezifische Farbstoff-markierte Oligonukleotidsonden hybridisieren mit der Zielsequenz des zu amplifizierenden DNA Fragmentes in einer „head to tail“ Anordnung, so dass die beiden Farbstoffe nah aneinander liegen. Der Donor-Farbstoff (Fluoreszein) am 3'-Ende wird durch eine blaue Lichtquelle angeregt und emittiert längerwelliges, grünes Fluoreszenzlicht. Wenn die beiden Farbstoffe in unmittelbarer Nähe liegen, wird die Energie auf den Akzeptor-Farbstoff (LC Red 640) am 5'-Ende der zweiten Hybridisierungssonde übertragen, der rot fluoreszierendes Licht emittiert. Dieser Energietransfer, genannt „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET), ist in hohem Maße vom Abstand der beiden Farbstoffe abhängig, denn ein effizienter Energietransfer ist nur bei einem Abstand der Farbstoffe von 1-5 Nukleotiden möglich. Die Intensität an Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an neu synthetisierter DNA während der PCR. In der Denaturierungsphase kommt es nicht zur Hybridisierung der Sonden. Während der annealing Phase kommt es zum Energietransfer zwischen den Sonden. Während der Elongationsphase mit steigender Temperatur werden die Hybridisierungssonden entfernt. Das Auftreten und die Intensität der Fluoreszenzsignale werden nach jedem PCR Zyklus gemessen und durch die Light-Cycler-Software (Version 3, ROCHE DIAGNOSTICS) ausgewertet.

Nach abgeschlossenen PCR Lauf wird die Fluoreszenzintensität in jedem Zyklus gegenüber der entsprechenden Zyklus-Nummer graphisch aufgetragen. Abb. 6 zeigt das Verhältnis der logarithmisch angegebenen Fluoreszenzemissionen gegenüber dem jeweiligen PCR-Zyklus. Dabei ist vor allem die Zahl der Zyklen bis zum Auftreten der Fluoreszenzsignale in den einzelnen Proben für die spätere Bestimmung der eingesetzten H-1 DNA Mengen entscheidend. Der Schwellenwert, der die

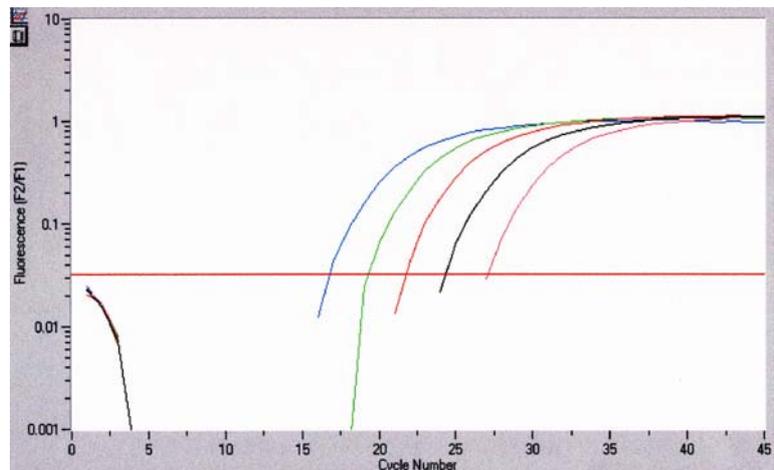


Abb. 6: Kurvenverläufe der emittierten Fluoreszenzen der an die H-1 DNA-Amplifikate gebundenen Hybridisierungssonden in der Parvovirus H-1 real-time-PCR. Das Amplifikationsdiagramm zeigt die emittierten Fluoreszenzen der Plasmid H-1 Standardkonzentrationen (10^7 , 2×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , $1,6 \times 10^4$, $3,2 \times 10^3$) pro Zyklus. Durch die waagrechte Basislinie ergeben sich die Crossing points.

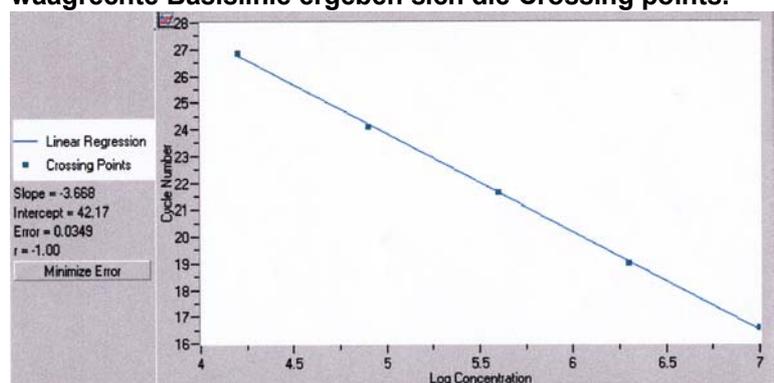


Abb. 7: Crossing points (Zyklusnummer) der log-linearen Korrelation mit der Basislinie, aufgetragen gegenüber der logarithmischen Konzentration der Standardreihe

Zykluszahl angibt ab der es zu einer Zunahme der Fluoreszenz und damit Amplifikation kommt, wird durch die Basislinie ausgewählt.

Die Schnittpunkte der Basislinie mit den Kurven der mitgeführten Standardreihen geben die Zyklusnummern an, die gegenüber den bekannten logarithmischen Konzentrationen der Standardproben graphisch aufgetragen werden (Abb. 7). Es wird so eine logarithmische Regressionsgerade erstellt, mit der die tatsächlich eingesetzten Genommengen der Standardreihe neu berechnet werden.

Mit der Regressionsgeraden wird durch die Light-Cycler-Software die DNA Menge in den untersuchten Proben quantifiziert (Abb. 8).

	P.	Name	Standard	Calculat...	Cro...
—	1	Parvo H1 plasmid	1.000E+07	9.544E+06	16.57
—	2	Parvo H1 plasmid	2.000E+06	2.075E+06	19.00
—	3	Parvo H1 plasmid	4.000E+05	4.015E+05	21.61
—	4	Parvo H1 plasmid	8.000E+04	8.561E+04	24.08
—	5	Parvo H1 plasmid	1.600E+04	1.504E+04	26.85

Abb. 8: Kalkulierte Konzentrationen der Proben, neben der kalkulierten Konzentration ist der korrespondierende Crossing point angegeben.

Weil die beiden Hybridisierungs sonden nur miteinander wechselwirken und

Fluoreszenz emittieren können, wenn sie an die zu amplifizierende Region des H-1 Genoms gebunden haben, werden nur Kurvenverläufe der positiven Proben und der Standardverdünnungsreihe abgebildet.

2.2.11.9 Parvovirus H-1 DNA Nachweis mit der Parvovirus H-1-Real-Time-PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) war darauf zu achten, dass alle verwendeten Lösungen und Gegenstände Nuklease-frei waren, um eine unerwünschte Degradation der Nukleinsäuren zu vermeiden. Um eine Kontamination der Proben auszuschließen wurde in einem Templet-freiem Raum gearbeitet. Es wurden ebenfalls nur Templet-freie Lösungen und Gegenstände sowie gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Zur PCR musste die virale DNA aus den Capsiden oder Zellextrakten durch Proteinase K Verdau isoliert werden, damit eine Amplifikation und Analyse möglich wurde. Alle Proben zur PCR wurden nach Proteinase K Verdau durch Phenol-Chloroform Extraktion und anschließende Ethanol-Präzipitation in Gegenwart von tRNA aufgereinigt. Nach Aufreinigung konnten die in H₂O resuspendierten Nukleinsäuren direkt in die PCR eingesetzt werden oder wurden für späteren Gebrauch bei -20°C gelagert. In die PCR wurden die Proben in 10 µl Volumen eingesetzt.

Zur Erstellung der Standardreihen wurde ein H-1 Plasmid verwendet. Die H-1 Plasmidkonzentration wurde UV spektrophotometrisch quantifiziert. Die Plasmide [$\sim 1,65 \times 10^{11}$ Kopien/µl dsDNA] wurden in H₂O verdünnt. Eine Standardverdünnungsreihe des Plasmids wurde meistens in 1:5 Verdünnungsschritten ab einer Konzentration von 10^7 bis $3,2 \times 10^5$ Einzelstranggenomen erstellt. Die Standardreihe wurde mit 10µl/Verdünnung präpariert. Im Light Cyler wurden die Reaktionen in speziellen Glaskapillaren in 20µl Volumen durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Probe mit 10µl template-freien Wassers. Bevor die Kapillaren mit der Standardreihe und den zu untersuchenden Proben a 10 µl beladen wurden, wurden sie

erst mit 10 µl eines Master Mix, der die notwendigen Primer, Sonden, Enzyme usw. enthielt, befüllt.

Als Primer für die Parvovirus H-1-Real-Time-PCR wurden folgende Primer nach (Besselsen, Besch-Williford et al. 1995) verwendet:

H-1 3479f: 5' – CTA GCA ACT CTG CTG AAG GAA CTC – 3'

Die 5' und 3' Enden des Primers aus 24 Nukleotiden korrespondieren zur Position (5'- 3') 3479-3502 im viralen H-1 Genom

H-1 3732r: 5' – TAG TGA TGC TGT TGC TGT ATC TGA TG – 3'

Die 5' und 3' Enden des Primers aus 26 Nukleotiden korrespondieren zur Position (5'- 3') 3732-3707 im viralen H-1 Genom

Diese eingesetzten Primer amplifizieren ein 254 bp langes Fragment aus dem 3' -nahen Drittel des 5176 bp Parvovirus H-1 Genoms.

Folgende Sequenzen des H-1 Genoms wurden in dieser Arbeit für die Hybridisierungssonden ausgewählt, die innerhalb der Sequenz der zu amplifizierenden Region zwischen den Primern binden und 1 Nukleotid voneinander entfernt liegen:

H-1 Sonde 3'FL 5' – ACT TAC TCA CAC ATG GCA AAC CAA CAG A – 3' - Fluoreszein

Die 5' und 3' Enden der Hybridisierungssonde korrespondieren zur Position (5'- 3') 3642-3669 im viralen H-1 Genom

H-1 Sonde 5'LC 5' - LC Red640 – ACT TGG CAT GCC TCC AAG GAA TAA CTG A – 3'

Die 5' und 3' Enden der Hybridisierungssonde korrespondieren zur Position (5'- 3') 3671-3698 im viralen H-1 Genom

Da die Hybridisierungssonden bei RT mit der Zeit degradiert werden, wurde auf Eis gearbeitet. Zudem mussten die Sonden dunkel gehalten werden, weil sie lichtempfindlich sind.

Der Master Mix für 20 µl Volumen setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen:

1 µl Primer H-1 3479f [10 pmol/µl]

1 µl Primer H-1 3732r [10 pmol/µl]

0,5 µl H-1 Sonde 3'FL [8 pmol/µl]

0,5 µl H-1 Sonde 5'LC [8 pmol/µl]

1,6 µl MgCl₂ [25 mM]

3,4 µl H₂O

2 µl LC-FastStart Reaction Mix (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim, enthielt Taq Polymerase, Nukleotide und MgCl₂ [10 mM])

Die PCR wurde in einer MgCl₂ Konzentration von 3mM durchgeführt. Nach Ansetzen des Master Mix wurde dieser vorsichtig gemischt und je 10 µl auf die Light-Cycler Kapillaren verteilt. Anschließend wurden diese mit 10 µl Probe beschickt. Die befüllten Kapillaren wurden kurz bei 1000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und dann vorsichtig im Light-Cycler Karussell deponiert. In der PCR-Software wurde das Programm mit den folgenden Konditionen aufgerufen:

Denaturierung:		
1 Zyklus	Zieltemperatur	Inkubationszeit
	95°C	10 min
Temperaturanstieg	20°C/sec	

Amplifikation:			
45 Zyklen	Zieltemperatur	Inkubationszeit	2. Zieltemperatur
Denaturierung	95°C	10 sec	
Annealing	62°C	8 sec	53°C
[Temperaturabfall von 1°C pro Zyklus bis zum Erreichen der 2. Zieltemp.]			
Elongation	72°C	10 sec	
Temperaturanstieg	20°C/sec		

Kühlen:		
1 Zyklus	Zieltemperatur	Inkubationszeit
	40°C	30 sec
Temperaturanstieg:	20°C/sec	

Die Konditionen der Real-Time-PCR im Light Cycler wurden in dieser Arbeit für das Parvovirus H-1 etabliert. Die PCR begann mit einer 10 min langen Denaturierungshase bei 95°C, die für die Aktivierung der verwendeten „Fast Start Taq“ Polymerase notwendig war. Ohne diese Hitzebehandlung war die Polymerase nicht aktiv.

Der PCR-Lauf wurde als „touch down PCR“ durchgeführt. Im ersten Amplifikationszyklus wurde die annealing-Temperatur auf die Zieltemperatur von 62°C eingestellt. In jedem darauf folgenden Amplifikationszyklus wurde die annealing-Temperatur um 1°C gesenkt bis die zweite Zieltemperatur von 53°C erreicht wurde.

Im PCR Programm wurden die Probenanzahl und die Standardverdünnungen mit ihren bekannten Konzentrationen eingegeben und gespeichert. Nach vollendetem PCR Lauf wurde die Quantifizierung der eingesetzten Proben angegeben. Der Messungs-Kanal wurde auf „Ch 2/1“ gestellt, der das emittierte Licht der Wellenlängen 640 nm und 530 nm misst. Durch

Verstellen der Basislinie („Noise Band“) wurden Genomkonzentrationen der Proben bei verschiedenen Fluoreszenzintensitäten berechnet.

2.2.12 Darstellung und Quantifizierung von Proteinen

2.2.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Proteine können in der diskontinuierlichen SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt und anschließend quantifiziert werden. Die denaturierenden Bedingungen unter denen die SDS-PAGE durchgeführt wird, gewährleisten, dass das Laufverhalten der einzelnen Proteine im Gel nicht mehr durch die unterschiedlichen, im nativen Zustand der Proteine vorliegenden Molekülstrukturen, -größen (bei Aggregaten) oder Nettoladungen beeinflusst wird.

Für die Gelelektrophorese wurde eine „Tall Mighty Small“- Apparatur (HOEFER SCIENTIFIC U.S.A., bezogen über PHARMACIA, Freiburg) verwendet. Die Gele hatten eine Größe von 12 x 10 cm und eine Dicke von 1mm. Für die Auftrennung von H-1 Capsid Proteinen wurde ein 4-12% Bis-Tris Gel (NuPAGE; IN VITROGEN, LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe) verwendet.

Die Proteinproben sowie ein Größenmarker wurden in SDS-PAGE-Probenpuffer (1x MES) und 1µl DTT resuspendiert und 10 min bei 75°C erhitzt (Denaturierung). Das SDS-Gel wurde in die mit 1x MES und 500µl Antioxidanz befüllte Elektrophoresekammer platziert. Die denaturierten Proteinproben wurden auf das Gel aufgetragen. Nach Einlaufen der Proben in das Gel bei 100 mA für ca. 15 min wurde die Stromstärke auf 120 mA erhöht.

2.2.12.2 Coomassie-Färbung und Entfärbung zur Proteindarstellung

Zur Quantifizierung der aufgetrennten Proteine konnte das Gel 30 – 90 min in Coomassie-Färbelösung (0,1% Coomassie brilliant blue/ 7,5 % Essigsäure/ 50 % Methanol) unter Schütteln gefärbt werden. Zum Entfärben des Gels wurde dieses anschließend in Entfärbelösung (5% Essigsäure/ 20% Methanol) gelegt, 1 min in der Mikrowelle aufgeköcht und 10 min geschüttelt. Die Entfärbelösung wurde abgegossen und durch Neue ersetzt. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis die Gelmatrix klar und nur noch die blau gefärbten Proteinbanden sichtbar wurden. Nach Trocknen des Gels zwischen Cellophanfolien konnten die Proteine durch Vergleich mit dem Größenmarker aufgrund ihrer Laufhöhen quantifiziert werden. Zum Geltrocknen zwischen Cellophan wurden die Gele 30 min in einem Puffer (20% Ethanol/ 10% Glycerin/ 70% dH₂O) unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das Gel auf einer Glasplatte blasenfrei zwischen zwei nasse Cellophanfolien geklemmt und bei RT oder 37°C getrocknet.

2.2.12.3 Western-Blot zur Darstellung der VP2 Capsidproteine

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Capsid Proteine wurden immunologisch nachgewiesen. Das Prinzip beruht auf der Bindung eines 1. Antikörpers an die Capsidproteine. Dieser Antikörper wird durch einen zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper gekoppelt. Nach

Zugabe von ECL-Lösung oxidiert die Peroxidase den unlöslichen Farbstoff. Die bei dieser Reaktion entstehende Chemolumineszenz kann auf einem Röntgenfilm aufgezeichnet werden. Zur Darstellung der aufgetrennten Proteine mit einem Fluoroimager, wurde ein Cy5 konjugierter Antikörper als zweiter verwendet.

Das SDS-PAGE wurde in einem Elektro-Blot in 1x PAGE- Laufpuffer/ 15% Methanol in einem Elektro-Blot bei 40 mA über Nacht auf eine PVDF-Membran (PALL GELMAN LABARATORY, Dreieich) transferiert, die vor Beginn des Blottens 1 min in Methanol inkubiert und anschließend in 10x SSC äquilibriert worden war. Nach dem Probentransfer wurden die noch freien Bindungsstellen der Membran durch 5% (w/v) Magermilch/PBS für 1h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde der 1. Antikörper, ein polyklonaler Kaninchen-anti-VP2-AK (1:5000 in 5% (w/v) Magermilch/PBS verdünnt) 3 h unter Schütteln auf die Membran aufgetragen. Die Membran wurde zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper 3x 10 min in 0,1% Tween-20 (v/v)/ 0,5% Magermilch (w/v)/PBS gewaschen und weiterhin mit dem 2. Antikörper, ein Esel Anti-Kaninchen-POD-Konjugat (DIANOVA, Hamburg) 1:5000 verdünnt in 5% Magermilch (w/v)/PBS inkubiert. Nach 1 h Inkubation bei RT unter Schütteln wurde die Membran wieder zur Beseitigung nicht gebundener AK für 3x 10 min in 0,1% Tween-20 (v/v)/ 0,5% Magermilch (w/v)/PBS und 1x 15 min in PBS gewaschen.

Danach erfolgte eine Inkubation der Membran im ECL-Substrat für 1 min bei RT. Nach Entfernen der Substratlösung folgte die Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm MP, AMERSHAM, Freiburg), bei der die durch die Peroxidase erzeugte Chemolumineszenz den Röntgenfilm belichtete. Nach Entwicklung des Röntgenfilms in einer Filmentwicklermaschine wurden die VP2 Capsidproteine als schwarze Banden sichtbar.

Die Banden auf dem Röntgenfilm wurden eingescannt, als tif-Datei gespeichert und konnten mit dem Programm „image quant“ densitometrisch ausgewertet werden.

Wurde als 2. Antikörper ein Anti-Kaninchen-Cy5-AK eingesetzt und die Membran nach Inkubation und Waschvorgang getrocknet, konnte der Blot im Fluoroimager (TYPHOON 9200, AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg) entwickelt und dargestellt werden.

2.2.12.4 Immunpräzipitation des Protein NS1 aus desintegrierten Capsiden mit Dynabeads

Die Immunpräzipitation vom NS1 Protein aus in Harnstoff desintegrierten Viruscapsiden wurde mit Hilfe von Antikörpern, die mit magnetischen, Eisen-haltigen Partikeln konjugiert waren (Dynabeads, DYNAL, Hamburg) durchgeführt. Diese richten sich in einem Magnetfeld aus und können so von Strukturen, die nicht an den Eisen-gekoppelten Antikörpern binden, getrennt werden. Dazu wurden 10 µl ($\sim 8 \times 10^6$ Partikel bzw. 100µg) an Schaf Anti-Kaninchen konjugierte magnetische Partikel 3x mit je 500 µl 1x PBS gewaschen und in 200 µl PBS und 2 µl (10^7) SP7 Kaninchen Anti NS1 Antikörper (Faisst, Faisst et al. 1995) suspendiert und bei 4°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Danach wurden die an die SP7 Kaninchen Anti NS1 Antikörper

gekoppelten Dynabeads 3x in 500 µl PBS gewaschen. Nach dem 3. Waschgang wurden die Antikörper in 100 µl PBS resuspendiert. Die Lösungen wurden dabei immer im Magnetfeld gewechselt, sodass die Dynabead gekoppelten NS1 Antikörper nicht verloren gingen. Nach dem Waschen wurden ca. 4×10^9 genomhaltige H-1 Viruspartikel, die vorher in Harnstoff desintegriert wurden, mit den Dynabead-NS1 Antikörpern in 200 µl Volumen über Nacht bei 4°C schüttelnd zur Immunpräzipitation inkubiert. Nach Immunpräzipitation wurde der Überstand im Magnetfeld abgezogen und zum DNA- Nachweis aufgereinigt. Das Pellet, Immunpräzipitat, wurde 2x in 500 µl PBS gewaschen, mit 50 µl 0,1% NP40/PBS versetzt und in einem neuen Reaktionsgefäß wieder 2x in 500 µl PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 30 µl PBS resuspendiert. Weil im Immunpräzipitat gebundene H-1 DNA nachgewiesen werden sollte, wurde das Pellet zur Auflösung der NS1-Antikörper-Komplexe in 30 µl NaOH ad 0,1 M bei 65°C für 1h inkubiert und alle 15 min gevortext. Davon wurde im Magnetfeld der Überstand abgezogen und von den konjugierten magnetischen Partikeln getrennt. Dieser Überstand (60µl) wurde mit 50µl TrisHCl [1M] pH 6,8 auf einen pH von ~7,5 neutralisiert. Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung zum H-1 DNA Nachweis durch Proteinase K Verdau, Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol Präzipitation.

Die aufgereinigten Proben von NS1 Immunpräzipitat und Überstand wurden im 1% Agarosegel aufgetrennt und durch Southern Blot Hybridisierung auf H-1 Genome untersucht.

2.2.12.5 Bindungsassay zur Darstellung von H-1 Capsiden während des Infektionsvorganges

Zur Darstellung von Capsidproteinen während des Infektionsvorganges wurde ein Bindungsassay durchgeführt. Der Bindungsassay wurde mit Parvovirus H-1 infizierten HeLa Zellen durchgeführt. Es wurden HeLa Zellen unter sterilen Bedingungen auf Deckgläschen in einer 24-well-Zellkulturschale ausgesät und in DMEM-Medium/ 5% FKS kultiviert. Die Deckgläschen waren zuvor über dem Bunsenbrenner abgeflammt und 1 h bei RT unter UV-Licht Bestrahlung ($1200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) mit Kollagen (1mg/ml in 0,1% Essigsäure) beschichtet worden. Das Zellmedium wurde nach Adhärens der Zellen abgezogen und die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit H-1 Viren infiziert. Zur Virusadhäsion wurden die Zellen für 2-3 h bei 4°C gelagert. Danach wurden sie zur weiteren Infektion bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Nach verschiedenen Infektionszeiten wurde der Bindungsassay durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen für 30 min bei RT in 500 µl 3% Paraformaldehyd (PFA)/PBS fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen 2x 5min bei RT mit 500 µl 1x Transportpuffer gewaschen. Anschließend folgte ein Lysieren der Zellkernmembranen durch 10 min Inkubation bei RT in 500µl 0,1% Tx100/PBS, damit die Antikörper alle Zellareale erreichen konnten. Die Zellen wurden erneut 3x 5 min bei RT mit 1x Transportpuffer gewaschen, bevor die erste Antikörperreaktion erfolgte.

Zur immunocytochemischen Darstellung der viralen Capsidproteine und Kernporenkomplexe wurden ein H-1 Capsid spezifischer Antikörper [Kaninchen VP2 AK, 1:200] und ein anti-NPC-Antikörper [mAb 414, 1:500] in einer Antikörperlösung gemischt (1xTP, 5% Ziegenserum, 0,5% BSA) in 20µl –Tropfen auf einen Parafilm pipettiert. Die mit Zellen besiedelten Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf die Tropfen gelegt und in einer feuchten Kammer 90 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Deckgläschen wurden anschließend zurück in die 24-well-Zellkulturplatte überführt und 4x je 5 min bei RT mit 1ml 1x TP gewaschen.

Die folgende Immunreaktion durch die zweiten Antikörper erfolgte durch Inkubation mit einem Texas red (Rhodamin-Derivat) markierten Ziege Anti-Maus-Antikörper [1:200] und einem FITC – markierten Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper [1:200], die in der Antikörperlösung (1xTP, 5% Ziegenserum, 0,5% BSA) verdünnt wurden. Der Texas red Anti-Maus-Antikörper war gegen den mAB 414 gerichtet, der FITC Anti-Kaninchen-Antikörper gegen den Kaninchen Anti-VP2-Antikörper. Die Inkubation der Zellen auf den Deckgläschen erfolgte in 20 µl Tropfen auf Parafilm in einer feuchten Kammer für 40 min bei 37°C. Nach dem Waschen der Deckgläschen (4x bei RT in 1x TP) wurden diese auf einem Objektträger mit Zellseite nach unten in DABCO/Moviol [100mg/ml] eingebettet. DABCO ist ein Radikalfänger, der die durch Laserstrahlung entstehenden Radikale, welche die aromatischen Ringe der Fluoreszenzfarbstoffe oxidieren, abfängt und damit ein Ausbleichen der Fluoreszenz verhindert. Die Objektträger wurden über Nacht bei RT zur Polymerisation des Moviols im Dunkeln gelagert. Bis zur Auswertung der Proben anhand ihrer Immunfluoreszenzen durch konfokale Laserscan-Mikroskopie konnten sie zur Erhaltung der Fluoreszenz bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt werden.

2.2.12.5.1 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Dem Arbeiten mit dem konfokalen Laserscanmikroskop ist insofern eine zeitliche Begrenzung gesetzt, dadurch dass die Fluoreszenz der Objekte durch das Laserlicht schnell ausbleicht. Es sollte daher ein Bildausschnitt nicht länger als 1-2 min betrachtet werden.

Es wurde ein Leica DM IRBE Mikroskop (optische Vergrößerung 630-fach) mit einer konfokalen Laser-Scan-Einheit (Leica TCS NT, LEICA, Lasertechnik, Heidelberg) verwendet. Die Lasereinheit verfügte über einen Argon-Krypton-Mischgas-Laser mit einer Anregungswellenlängen-Kombination im sichtbaren Spektralbereich von 488 nm, 567 nm und 648 nm. Die Fluoreszenz des FITC-markierten Antikörpers wurde oberhalb der Wellenlänge von $\lambda = 519$ nm, die des Texas-Red-markierten Antikörpers oberhalb von 571 nm über Photomultiplier aufgenommen, digitalisiert und elektronisch erfasst (LEICA TCS NT-Software). An einem Negativansatz wurden Laserleistung und Signalamplifikation justiert. Die Anregungsenergie wurde mit ca. 30% der maximalen Laserleistung so gewählt, dass die Negativkontrollen eine geringe, unspezifische Hintergrundfluoreszenz zeigten. Dabei wurden die Zellen fokussiert und „gescannt“. Die untersuchte Ebene in der vertikalen Achse wurde so eingestellt, dass der Zellkern durchschnitten wurde. Die Messblende des Mikroskops (pinhole)

zur Feinabstimmung wurde so verstellt, dass die TR-Anti-NPC-markierte Kernmembran als scharfer Ring erschien. Unter den gleichen Einstellungen erfolgte die Untersuchung der positiven Proben. Ihre Fluoreszenzintensität ist somit in Relation zur Negativkontrolle zu bewerten. Die Fluoreszenzen der beiden Farbstoffe im mikroskopischen Bild wurden einzeln nacheinander aufgenommen (Kanal 1 und Kanal 2). In der nachgeschalteten Bildverarbeitung wurde eine 16-fache Kalman-Filterung der Bilder durchgeführt. Durch elektronische Überlagerung der Abbildungen beider Kanäle ließen sich Colokalisationen der Fluoreszenzen ermitteln. Von jedem mikroskopischen Präparat wurden drei Bitmap-Grafiken erstellt, die über ein Bildbearbeitungsprogramm (ADOBE Photoshop, ADOBE; Systems, Inc.) elektronisch nachbearbeitet werden konnten.

2.2.13 Zellfotographien von infizierten Zellen

Zur Dokumentation wurden Zellen mit einem Photoapparat bei einer Belichtungszeit von 62,5 ms unter einem Mikroskop (ZEISS, Axiovert 35) in 100 – 400 facher Vergrößerung im Phasenkontrast photographiert.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Nachweismethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Nachweismethoden des parvoviralen H-1 Genoms verwendet: Die Hybridisierung nach Dot Blot oder Southern Blot und die PCR. Die Virus-DNA wurde nach Dot Blot oder Southern Blot durch Hybridisierung mit zwei radioaktiv markierten Plasmiden nachgewiesen. Ein Plasmid kodierte für das virale NS1-Protein, das andere Plasmid kodierte für das gesamte Virus. Bei der PCR wurde eine 254 bp Region an der 5'-3' Position 3479-3732 des H-1 Genoms amplifiziert. Die PCR wurde als „real-time PCR“ im „Light-Cycler“ durchgeführt.

Zunächst wurden Nachweisgrenzen und Schwankungsbreiten der Messmethoden charakterisiert.

3.1.1 Hybridisierung nach Dot Blot

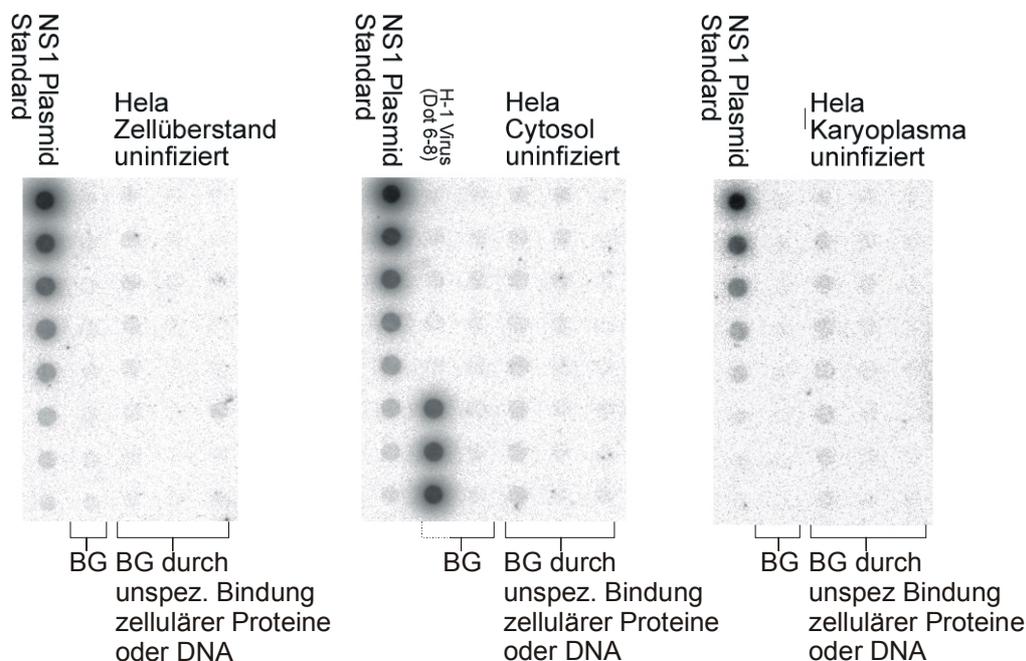
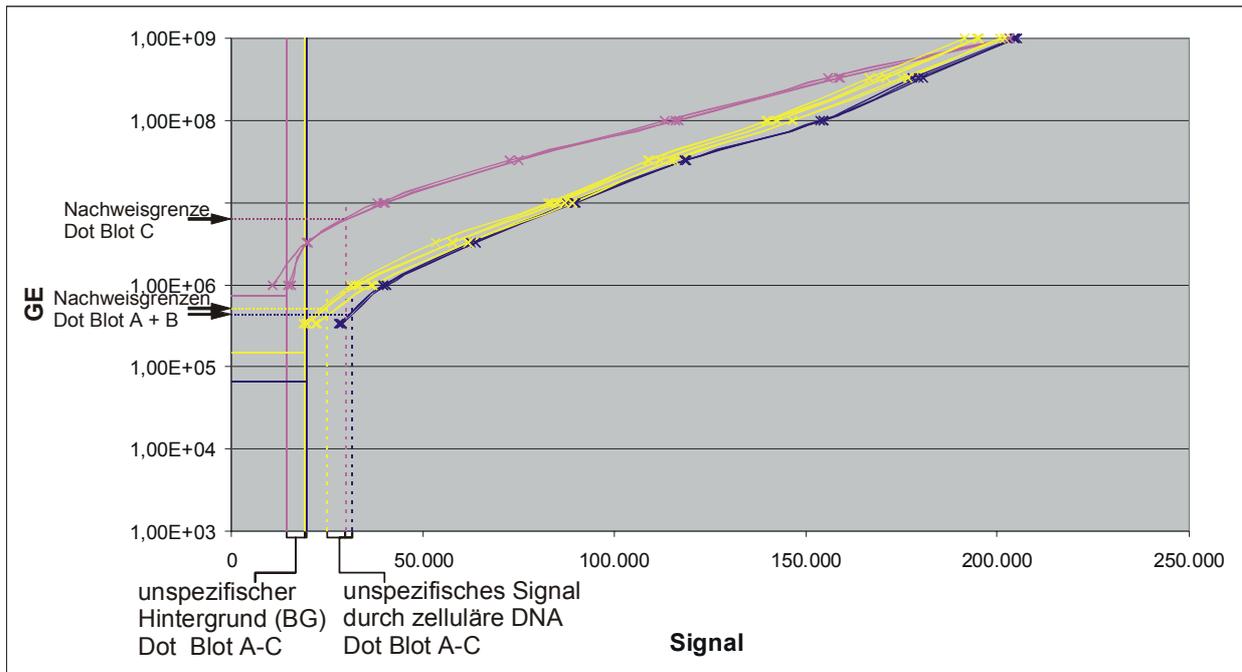


Abb. 9: Dot Blot mit markiertem NS1 Plasmid

Auf den Phosphoimager-Scans der Dot Blots in Abb. 9 sind die Standardverdünnungsreihen vom NS1 Plasmid ab einer Konzentration von 10^9 Plasmiden in 1:3 Verdünnungsschritten dargestellt. Als Kontrolle wurden - neben der Verdünnungsreihe - Fraktionen von Sucrose Gradienten aufgetragen, auf denen Zellüberstand, Cytosol und Karyoplasma uninifizierter HeLa-Zellen aufgetrennt worden waren.

Die Analyse zeigte schwache Signale durch die unspezifische Hybridisierung zellulärer Nukleinsäuren. Zur Bestimmung von Nachweisgrenze und Schwankungsbreite wurden die Signale eingekreist und die Intensität der Fläche bestimmt.



- x— Dot Blot A
 - x— Dot Blot B
 - x— Dot Blot C
- } Bestimmungen der
NS1 Plasmid Standard
Verdünnungsreihe

Abb. 10: Dot Blot, Plasmid NS1 Standardverdünungsreihe

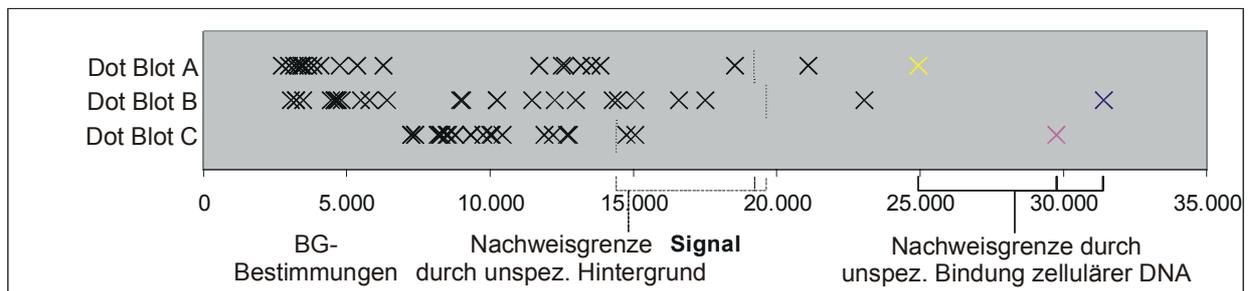


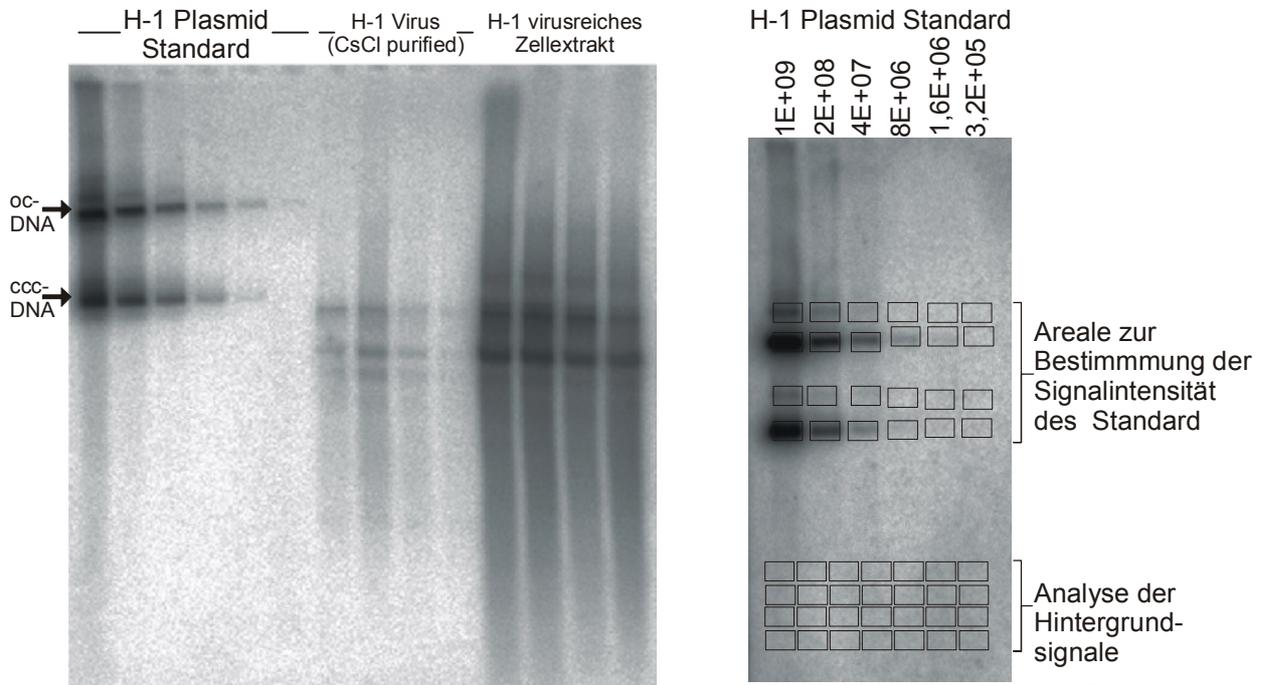
Abb. 11: Dot Blot, Hintergrund Analyse

Das Diagramm in Abb. zeigt die quantitative Auswertung der Standardverdünungsreihe der drei Dot Blots. Die Blot-Signale wurden jeweils dreimal quantifiziert, um durch die Auswahl der quantifizierten Flächen bedingte Schwankungen zu erfassen. Die Schwankungsbreite, als Standardabweichung angegeben, betrug 2,5%.

Die Auswertung zeigte, dass die Nachweisgrenze beim Dot Blot durch unspezifische Hintergrundsignale und durch Signale, die durch unspezifische Bindung zellulärer DNA bei ungereinigtem Probenanteil zustande kamen, limitiert wurde. Als Hintergrundwert wurde die Summe von Mittelwert und 2-facher Standardabweichung mehrerer Hintergrundbestimmungen („BG“) gewählt (Abb. 11). Die Nachweisgrenze in GE (Genomäquivalente) der drei Dot Blots allein durch unspezifischen Hintergrund limitiert lag zwischen $6,7 \times 10^4$ und $7,1 \times 10^5$ GE. Die sichere Nachweisgrenze aufgrund unspezifischer zellulärer DNA-Bindung lag jedoch höher zwischen $3,6 \times 10^5$ und 4×10^6 GE.

3.1.2 Hybridisierung nach Southern Blot

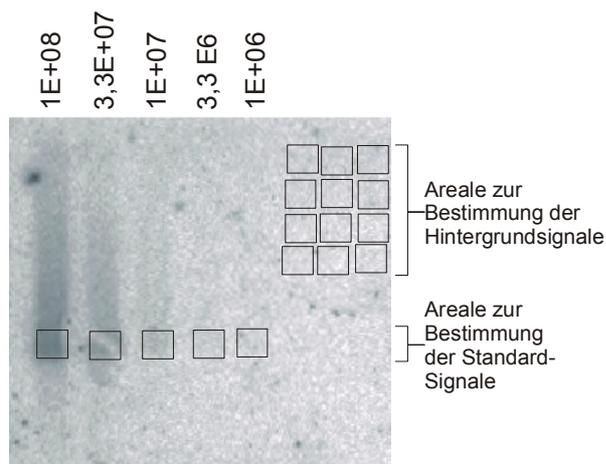
Da unspezifische Signale im Dot Blot nicht klar als solche erkannt werden konnten, wurde als weitere Nachweismethode die Hybridisierung nach Southern Blot charakterisiert. Hierzu wurde eine Standardverdünnungsreihe des 7862 bp-großen H-1 Genom Plasmids, sowie das 3358 bp-lange NS1-kodierende Plasmid verwendet.



Der Southern Blot zeigt die Auftrennung des H-1 Plasmid in 2 Hauptbanden. Die obere Bande entspricht der oc-DNA, die untere Bande der ccc-DNA. Daneben sind H-1 Genome von in CsCl aufgereinigten Viren und von Viren, die aus dem Überstand einer NB-K-Zellinfektion stammen. Sie laufen weiter als das Plasmid.

Die Quantifizierung erfolgte durch Einrahmen der Signale und Bestimmung der Signalintensitäten im Phosphoimager Screen. Der unspezifische Hintergrund (BG) wurde durch mehrfaches Einrahmen bestimmt.

NS1 Plasmid Standard



Im Southern Blot wurde die NS1 Plasmid-Verdünnungsreihe in eine Hauptbande aufgetrennt. Zur Quantifizierung wurde die Flächenintensität der eingerahmten Signale im Phosphoimager Screen berechnet. Unspezifische Hintergrundsignale wurden durch mehrere Areale analysiert.

Abb. 12: Quantifizierung des Southern Blot

Die Plasmid Standardverdünnungsreihen wurden überwiegend ab einer Konzentration von 10^9 Plasmiden in geometrischen Verdünnungsschritten aufgetragen und entsprechend der oc (open

circular)- und ccc (covalent circular closed)-Form in zwei Hauptbanden aufgetrennt (Abb. 12). In Abb. 12 wurden im oben links abgebildeten Southern Blot neben der H-1 Plasmid Verdünnungsreihe die Genome von im CsCl-Gradienten aufgereinigten H-1 Virus und von Virus aus dem Zellextrakt einer NB-K-Zellinfektion aufgetrennt. Das 5176 b einzelsträngige Genom des H-1 Virus wandert während der Auftrennung im 1% Agarosegel weiter als das H-1 Plasmid. Im unteren abgebildeten Blot wurde eine NS1-Plasmid-Verdünnungsreihe aufgetrennt. Zur quantitativen Auswertung des Southern Blot wurden die Signale - wie zur Auswertung der Dot Blot Hybridisierung - in Arealen eingrahmt und deren Intensität gemessen.

Abb. 13: H-1 Plasmid Standard Verdünnungsreihe von 9 Southern Blots

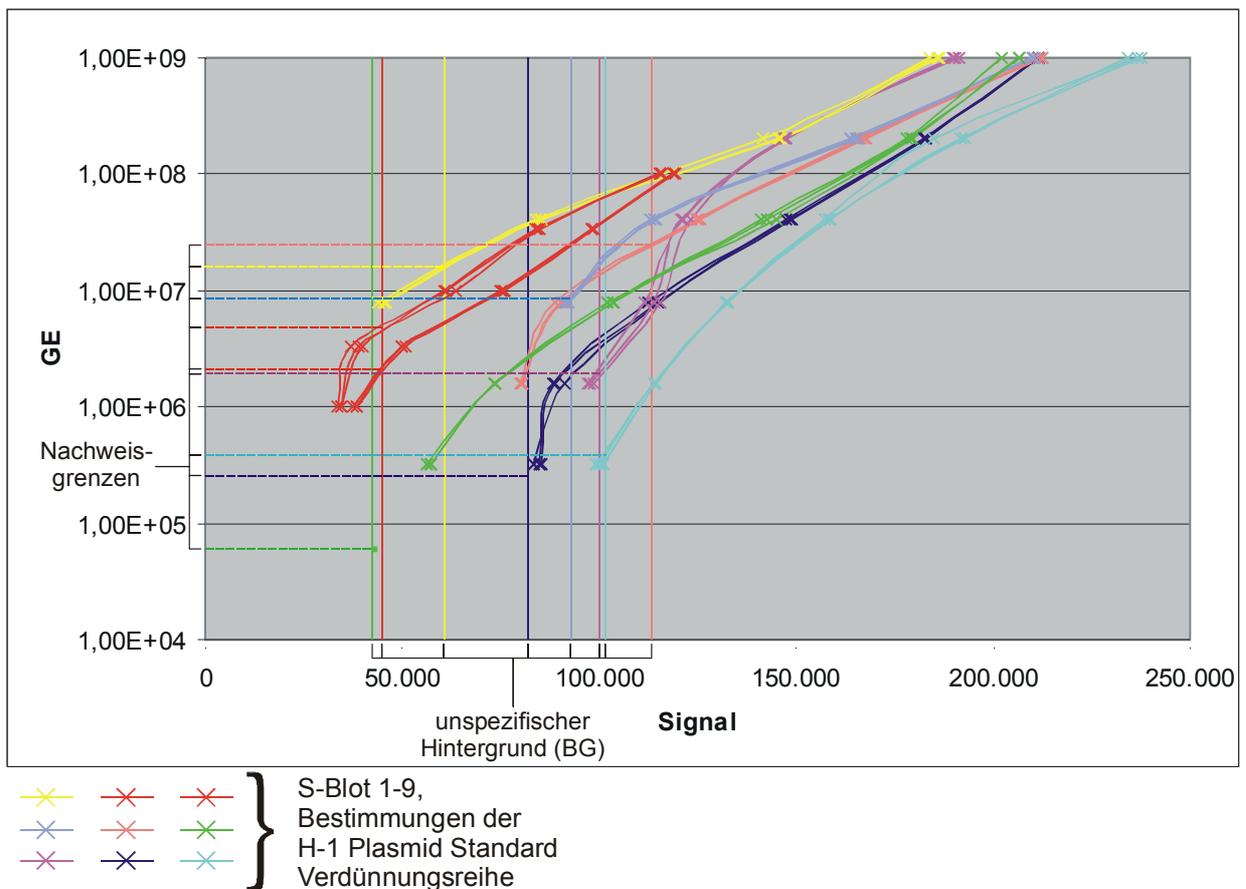
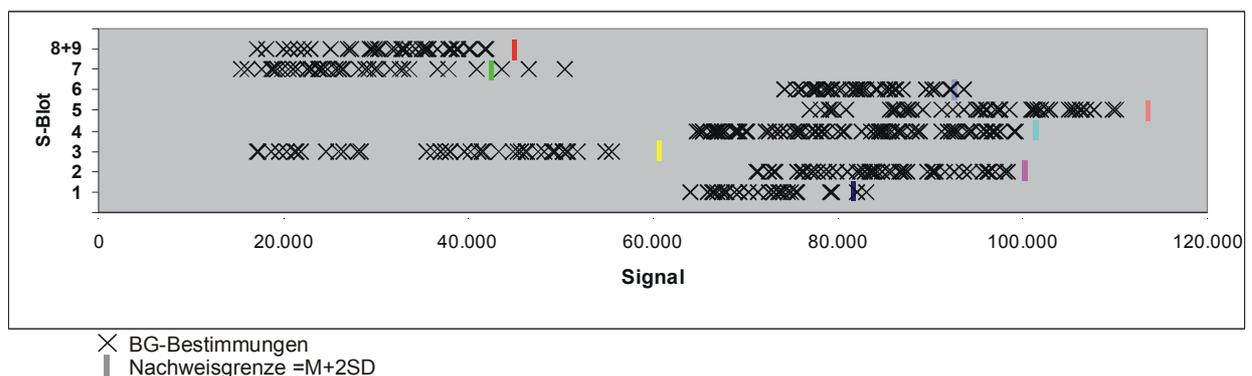


Abb. 14: Southern Blot, Hintergrund Analyse von 9 Southern Blots

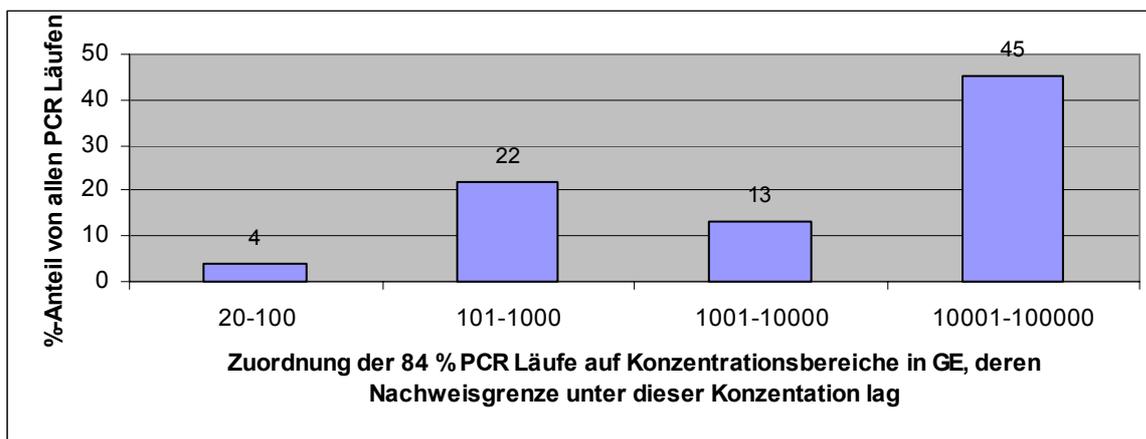


Die Intensität des unspezifischen Hintergrundes, der die Signale überlagerte, wurde durch die Analyse mehrerer Areale bestimmt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen und Schwankungsbreiten wurden 9 Southern Blots ausgewertet und die Signale im Diagramm (Abb. 13) dargestellt. Die Banden wurden jeweils dreimal quantifiziert, um die Schwankungen durch das Einrahmen der Signale zu bestimmen. Sie betrug, als Abweichung um den Mittelwert angegeben, ca. 1%. Wie im Dot Blot wurde der DNA-Nachweis im Southern Blot durch unspezifische Hintergrundsignale limitiert. Weil für einen Ansatz die Signalintensität mehrerer Banden gemessen werden musste, war der Einfluss des Hintergrundes auf die quantitative Messung relativ hoch.

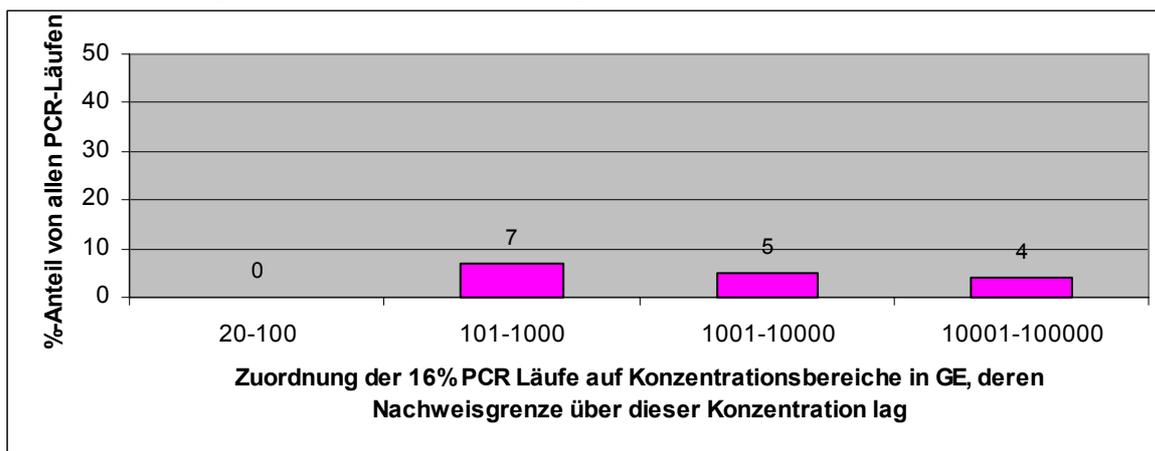
Als Schwellenwert wurde die Summe von Mittelwert und 2-facher Standardabweichung mehrerer Hintergrundbestimmungen („BG“) gewählt (Abb. 14). Die Nachweisgrenze des Southern Blot in GE (Genomäquivalenten) ergibt sich im Diagramm aus dem Y-Wert des Schnittpunktes, der bei Kreuzung der Standardkurve mit dem Schwellenwert entsteht. Er nimmt Werte zwischen ca. 6×10^4 und $1,7 \times 10^7$ GE ein und liegt im Mittel bei ca. $5,7 \times 10^6$ GE. Vergleicht man Dot Blot und Southern Blot zeigt sich, dass der Southern Blot eine relativ geringere Schwankungsbreite, jedoch aufgrund der etwas höher liegenden Nachweisgrenze ($5,7 \times 10^6$ GE) eine geringere Empfindlichkeit hat. Die Methode wurde daher zur Überprüfung der Ergebnisse nach Voranalyse mit Dot Blot oder PCR eingesetzt. Sie eignete sich gut zum Virusnachweis aus ungereinigtem Material, wie z.B. aus Zellkompartimenten infizierter Zellen die neben der Virus-DNA auch zelluläre Nukleinsäuren enthalten.

3.1.3 PCR

Für die Standard-Verdünnungsreihe der PCR wurde das H-1 Plasmid eingesetzt, wobei die Standardreihen aller vorhandenen PCRs - versuchsabhängig - nicht nach einem einheitlichen Titrationsschema erstellt worden sind. Die geringste Konzentration der Standardreihen aller PCR-Analysen ist überwiegend positiv nachgewiesen worden, wobei nicht über die Nachweisgrenze hinaus titriert wurde. Hierbei nahm die kleinste Konzentration der Verdünnungsreihen Mengen zwischen $3,12 \times 10^4$ und 20 H-1 Plasmiden ein (Abb. 15:). Die Nachweisgrenze der PCR-Läufe, bei denen nicht über die Nachweisgrenze hinaus titriert wurde, lag somit unterhalb der kleinsten noch nachzuweisenden Standardkonzentration. Aus dem oberen Diagramm in Abb. 15: ist erkennbar, mit welchem Prozentanteil von allen PCR-Durchführungen die Nachweisgrenze unterhalb der angegebenen GE-Konzentrationsbereiche lag. Im unteren Diagramm wurden die PCR-Läufe selektiert, bei denen die Standardreihenkonzentrationen über die Nachweisgrenze hinaus titriert wurden. Es ist daher aus dem unteren Diagramm erkennbar, mit welchem Prozentanteil aller PCR-Läufe die Nachweisgrenze oberhalb der angegebenen GE Konzentrationsbereiche lag.



Das Diagramm stellt die prozentuale Verteilung der kleinsten Standardreihenkonzentrationen aller PCR-Analysen auf H-1 Genomkonzentrationsbereiche dar, die positiv nachgewiesen wurden. Die x-Achse gibt Konzentrationsbereiche in GE an, in die die PCR Analysen, ausgewählt nach ihrer geringsten Standardreihenkonzentration, fallen. Z. B. hatten 22 % aller PCR Analysen in der kleinsten Titrationsstufe der Standardverdünnungsreihe eine Konzentration zwischen 101 und 1000 GE, die positiv nachgewiesen wurde. Es wurden also in 22% aller PCR Analysen mindestens die Konzentrationen, die eine Zahl zwischen 101 und 1000 GE annahmen, sicher nachgewiesen. Bei 22% aller PCR Läufe lag die Nachweisgrenze unter dieser Konzentration. In 84% aller PCR Läufe wurde die kleinste Konzentration der Standardverdünnungsreihen positiv nachgewiesen. Weil hierbei nicht über die geringste Standardkonzentration hinaus titriert wurde, konnte aus diesen PCR-Analysen keine exakte Nachweisgrenze ermittelt werden.



Das Diagramm stellt die prozentuale Verteilung der Standardreihenkonzentrationen aller PCR Analysen auf H-1 Genomkonzentrationsbereiche dar, die nicht mehr nachgewiesen wurden. Die x-Achse gibt Konzentrationsbereiche in GE an, in die die PCR Analysen, ausgewählt nach ihrer nicht mehr nachzuweisenden Standardreihenkonzentration, fallen. Z. B. hatten 7 % aller PCR Analysen in der Titrationsstufe der Standardverdünnungsreihe, die nicht mehr nachgewiesen wurde, eine Konzentration zwischen 101 und 1000 GE. Es konnten also in 7% aller PCR Analysen eine Konzentration zwischen 101 und 1000 GE nicht nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze lag bei diesen PCR Läufen oberhalb dieser Konzentration. Da bei diesen PCR-Analysen (16% aller PCR-Läufe) über die Nachweisgrenze hinaus titriert wurde, konnte hierbei eine hinreichende Angabe zur Nachweisgrenze gemacht werden.

Abb. 15: Nachweisgrenze der PCR

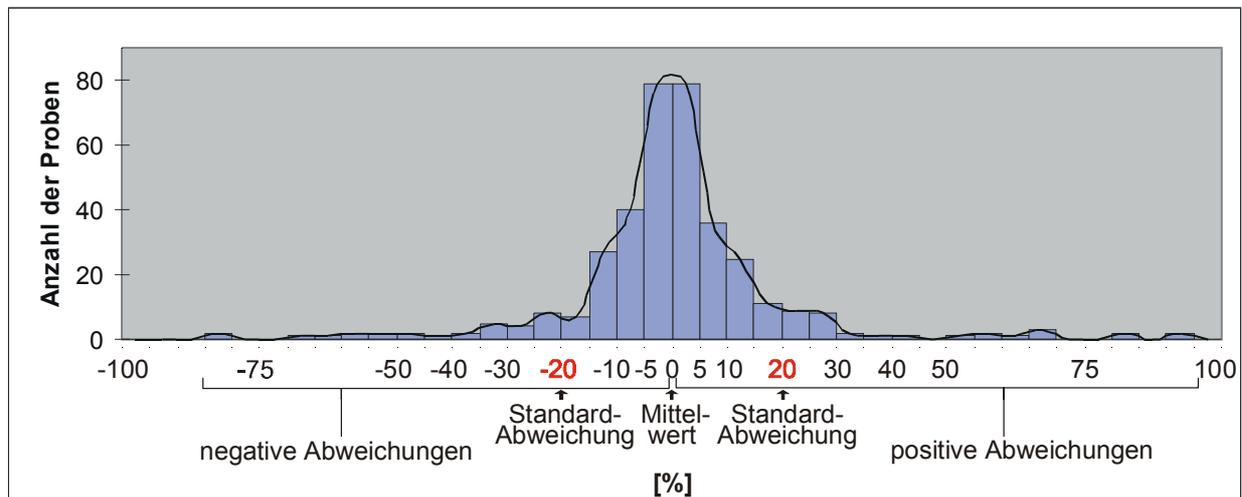
Zur exakten Ermittlung der Nachweisgrenze konnten nur solche PCR-Befunde verwendet werden, deren Standardreihen unter die Nachweisgrenze titriert wurde.

Da in ca. 96% aller PCR Analysen mindestens 10^5 GE nachgewiesen werden konnten, war die Nachweisgrenze der PCR im Vergleich zu den anderen DNA Nachweismethoden, Southern Blot und Dot Blot, am geringsten. Dadurch konnte unter Einsatz der PCR Material-sparend gearbeitet werden.

Intra-Test-Abweichung:

Die PCR-Analyse von Parvovirus H-1 DNA zeigt geringe Schwankungen innerhalb einer Messung.

Abb. 16: Intra-Test-Abweichung der PCR
max. Mittelwertabweichungen in % von 183 PCR Befunden (Dupletts, Tripletts u.a.)



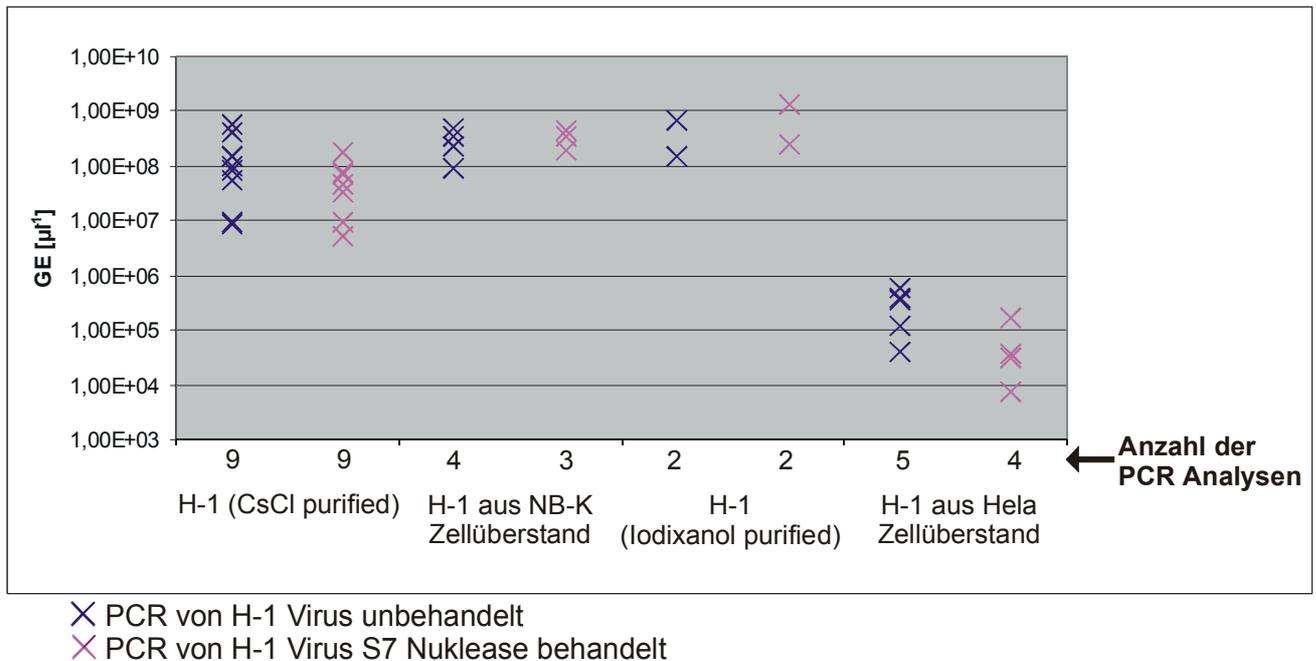
Die intra-Test-Abweichung der PCR beträgt 20% um den gemessenen Wert. Dazu wurde die Standardabweichung der Mittelwertschwankungen von PCR Proben, eingesetzt als 109 Dupletts, 65 Tripletts, 6 Quartetts, 3 Quintetts, bestimmt (Abb. 16).

Im Diagramm sind Standardabweichung und maximale Mittelwertabweichungen in Prozent angegeben, um die Werte vergleichen zu können. Die Mittelwerte der Proben wurden als 0% gesetzt.

Inter-Test-Abweichung:

Der Vergleich von Befunden verschiedener PCR-Läufe gab Aufschluss über die inter-Test-Abweichung. Zum Vergleich wurden die PCR-Analysen von unbehandelten und S7 Nuklease behandelten H-1 Viren verwendet. Die Viren entstammten aus verschiedenen Aufreinigungen unterschiedlicher Viruskonzentration. Die Virusproben wurden in unterschiedlicher Verdünnung überwiegend als Tripletts in 38 PCR-Läufen eingesetzt.

Im Diagramm (Abb. 17) sind die Mittelwerte der PCR-Ergebnisse angegeben. Um die PCR-Ergebnisse der einzelnen Virusaufreinigungen vergleichen zu können, wurden die Genomzahlen auf 1µl Viruspräparation bezogen berechnet. Die graphische Darstellung in Abb. 17 zeigt, dass jede PCR der Virusproben nicht dieselbe Genomkonzentration ergab und dass der Vergleich von PCR-Messungen einer Schwankung unterworfen war.



Es wurden unbehandelte und S7 Nuklease behandelte H-1 Viren mehrmals untersucht. Die Viren entstammen unterschiedlichen Aufreinigungen, H-1 Viren CsCl aufgereinigt, H-1 Nachkommenviren einer NB-K-Zellinfektion, H-1 Viren Iodixanol aufgereinigt und H-1 Nachkommenviren einer HeLa-Zellinfektion. Die Nachkommenviren der HeLa-Zellinfektion wurden einer virushaltigen Sucrose Gradienten Fraktion des Zellüberstandes entnommen.

Abb. 17: Inter- Test-Abweichung der PCR – Analyse von 1µl Viruslösung aus diversen Aufreinigungen

Um diese Schwankung zu quantifizieren wurde die Standardabweichung aller 38 PCR-Befunde berechnet. Dazu mussten die PCR-Ergebnisse prozentual als Abweichung um den Mittelwert angegeben werden (Abb.18). Die Standard-Abweichung der 38 PCR-Befunde und damit Inter-Test-Abweichung der PCR betrug ca. 90%.

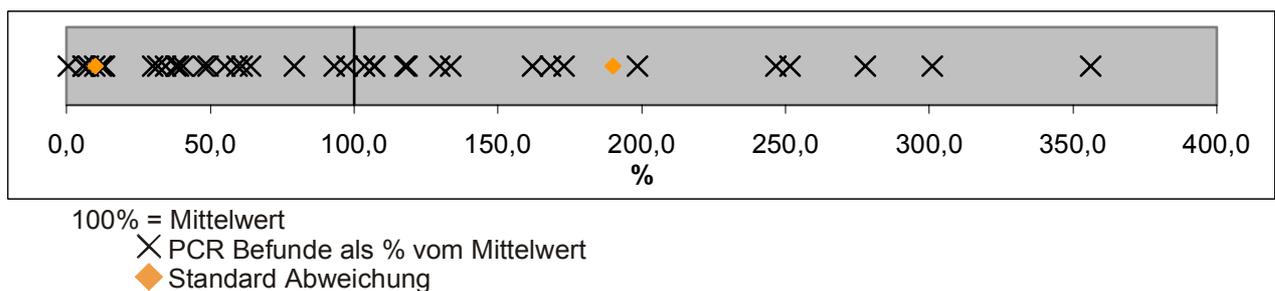


Abb.18: Inter-Test-Abweichung der PCR – Mittelwertabweichungen in % von 38 PCR Befunden

Die PCR Schwankung beim Einsatz von Viren aus hohen Stammkonzentrationen (10^8 GE/ μ l) betrug ca. 92%. Beim Viruseinsatz aus niedrigen Stammkonzentrationen (10^5 GE/ μ l) war die Schwankung ca. 85%. Die Schwankungen der PCR waren demnach bei Analyse von hohen wie von niedrigen Genomkonzentrationen der allgemeinen Schwankung ähnlich.

Insgesamt zeigte sich, dass die PCR aufgrund der hohen Sensitivität die geringste Nachweisgrenze hatte. Die Spezifität war ebenfalls hoch. Die Intra-Test-Abweichung war

gering, jedoch bestanden relativ hohe Schwankungen zwischen den Tests. Die Methode eignete sich gut zum Nachweis von Virus-DNA aus isolierten gereinigtem Material, wie z.B. aufgereinigte Viren. Der quantitative DNA-Nachweis von bereits geringen Virusmengen ermöglichte einen materialsparenden Einsatz.

3.2 Charakterisierung der eingesetzten Viren

3.2.1 Untersuchung auf Degradierbarkeit des Parvovirus H-1 Genoms durch S7 Nuklease-Behandlung mit PCR und Southern Blot

3.2.1.1 PCR-Analyse

Parvoviren besitzen ein einzelsträngiges DNA-Genom, das in das virale Capsid verpackt vorliegt. Für eine erfolgreiche Infektion ist - neben der Aufnahme in die Zielzelle – die Freisetzung des Virusgenoms in dem dafür vorgesehenen Kompartiment entscheidend. Diese Genomfreisetzung stellte auch den untersuchten Parameter in den folgenden Experimenten dar.

Die zur Infektion verwendeten Viren waren zuvor über eine Dichtegradientenzentrifugation in CsCl aufgereinigt worden. Dies ermöglichte eine hohe Reinheit der Viruspartikel und die Abtrennung leerer Capside, die in einer etablierten Infektion gegenüber genomhaltigen Capsiden im Überschuss vorliegen. Auf der anderen Seite bedarf dieser Reinigungsschritt einer hohen Konzentration an CsCl von $\sim 3 \text{ M}$ ($1,38 \text{ g/cm}^3$) (Paradiso 1981), welches die Struktur der Capside ändern oder den Zusammenhalt der Capsidproteine auflockern könnte. Ein derartiger Zerfall ist z.B. bei Capsiden des humanen Hepatitis B Virus zu beobachten (Bischof 1999). Da das parvovirale Genom vermutlich unter Energieaufwendung in präformierte Capside verpackt wird (Hoque, Ishizu et al. 1999; Lombardo, Ramirez et al. 2000) ist davon auszugehen, dass eine derartige Auflockerung eventuell zu einer

zumindest partiellen Freisetzung des Genoms führen würde, wie in Abbildung 19 (oben rechts) als eine mögliche Virusform dargestellt. Daher wurde zunächst untersucht, ob die H-1 Genome innerhalb der Capside geschützt vorlagen, bzw. ob freie Genome die Präparation kontaminierten. Hierzu wurde die Sensibilität des H-1 Genoms auf S7 Nuklease mehrfach untersucht (Schema Abb. 19). Der S7 Nuklease-Verdau wurde mit im CsCl-Dichtegradienten aufgereinigten H-1 Viren und unaufgereinigten Viren aus den Überständen infizierter Zellen (NB-K und HeLa) in verschiedenen Viruskonzentrationen durchgeführt. Die in den Verdauen eingesetzte Konzentration der CsCl-aufgereinigten Viren betrug ca. 2×10^7 bis 4×10^8 Partikel, die Konzentration der

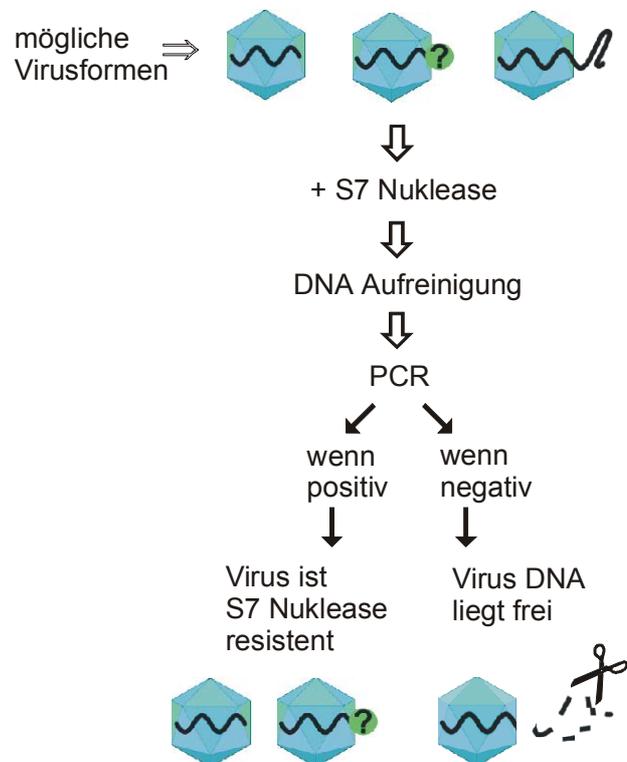


Abb. 19: Versuchsschema:

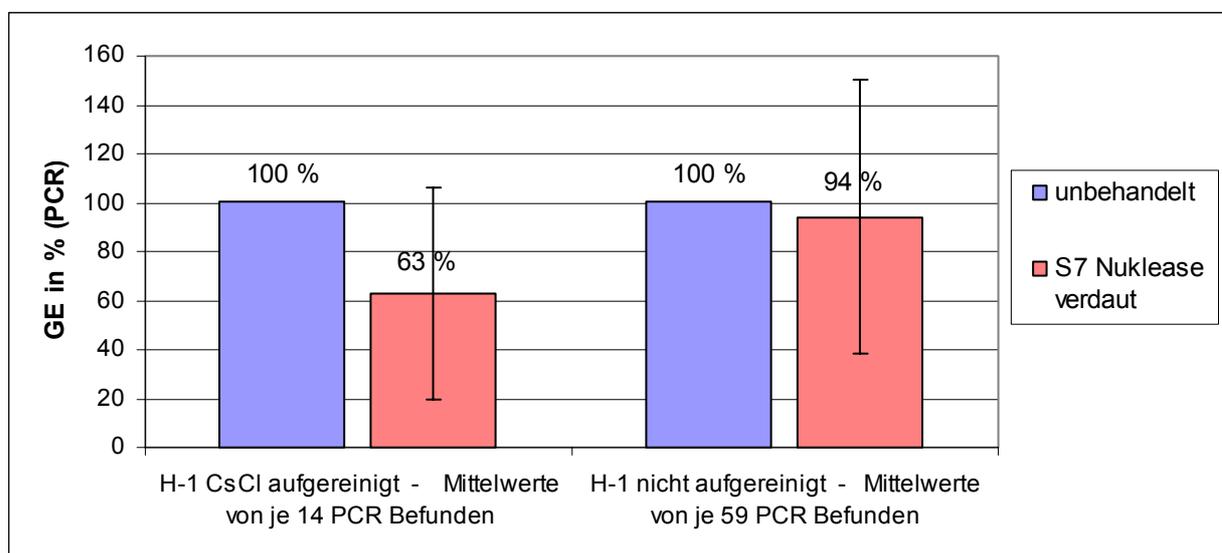
Viruscharakterisierung – Untersuchung der Sensibilität des H-1 Genoms auf S7-Nuklease

unaufgereinigten Viren betrug ca. 500 bis $2,5 \times 10^{11}$ Partikel.

Die Viren wurden mit S7 Nuklease für ca. 13 h verdaut. Nach Verdau wurde die virale DNA durch Proteinase K-Verdau aus dem H-1 Capsid freigesetzt und aufgereinigt. Ein Virusansatz in der gleichen Konzentration wurde zum Vergleich ohne S7 Nukleasebehandlung DNA aufgereinigt. Nach Aufreinigung wurden die Ansätze in Wasser verdünnt und die H-1 Genome über PCR nachgewiesen. Die PCR ließ den Nachweis geringer Genomkonzentrationen und damit ein Material sparendes Arbeiten zu. Da der PCR-Genomnachweis Schwankungen unterlag, wurden die beiden Ansätze als Triplets in einen PCR-Lauf eingesetzt.

Die PCR-Werte der unbehandelten Viren wurden jeweils mit denen der S7 Nuklease behandelten verglichen. Zur Auswertung wurde der Wert der unverdauten Proben als 100 % gesetzt.

Abb. 20: PCR Analyse von Parvovirus H-1 auf Degradierbarkeit des H-1 Genoms durch S7 Nuklease Behandlung (Viren unterschiedlicher Aufreinigung)



Es wurden die PCR Befunde von insgesamt 73 unverdauten und 73 Nuklease verdauten Virusansätzen ausgewertet, die aus 36 PCR-Läufen resultierten. Es wurden 14 Ansätze von in CsCl aufgereinigten Viren und 59 Ansätze von unaufgereinigten Viren auf S7 Nuklease Sensibilität untersucht. In Blau sind die Mittelwerte der unbehandelten Virusansätze, in Rot sind die der Nuklease behandelten Ansätze dargestellt. Die Mittelwerte sind in % angegeben, wobei der Befund der unverdauten Virusansätze 100% gesetzt wurde. Die Markierungen über den Säulen der Nuklease verdauten Virusansätze geben die Standardabweichung an. Sie beträgt für die Messergebnisse der CsCl-aufgereinigten Viren 43% und für die der unaufgereinigten Viren 56%.

Aus der Abb. 20 geht hervor, dass nach S7-Nuklease-Verdau von CsCl-aufgereinigten Viren im Mittel von 14 PCR-Befunden nur ca. 63 % der eingesetzten Genome nachweisbar waren. Nach S7 Nuklease Behandlung der unaufgereinigten Viren waren im Mittel von 59 PCR-Befunden ca. 94% der eingesetzten Genome nachweisbar, was anzeigt, dass im Zellkulturüberstand keine freie virale DNA durch Zellyse freigesetzt wurde.

Die Analyse der 14 PCR-Befunde der CsCl-aufgereinigten Viren im T-Test ergab eine Prüfgröße von 0,928, die der 59 Befunde der unaufgereinigten Viren ergab eine Prüfgröße von 0,538. Beide Prüfgrößen belegen keinen signifikanten Unterschied der Genomkonzentration der

Viren nach S7 Nuklease-Verdau gegenüber der unbehandelten H-1 Viren. Durch den Einsatz von Viren verschiedener Aufreinigungen in hoher und niedriger Partikelzahl konnte gezeigt werden, dass der S7 Nuklease-Verdau unter unterschiedlichen Bedingungen die gleiche Wirkung hatte.

Auf der anderen Seite zeigten sich Schwankungen innerhalb der PCR mit einer Standardabweichung von 20%, so dass eine mögliche Degradation evtl. nicht erfassbar gewesen wäre. Daher wurde der Anteil an freien viralen Nukleinsäuren in einem Virusansatz CsCl-aufgereinigter Viren in Relation zum Gesamtgehalt an viralen Genomen im Virusansatz analysiert. Die Proteine eines Ansatzes mit ca. 2×10^6 Viruspartikeln wurden durch Proteinase K bei 65°C für 4 h verdaut, die degradierten Virusproteine durch Phenol/Chloroform extrahiert und die freigesetzte Virus-DNA durch Ethanol-Präzipitation eingeeengt. Der zweite Virusansatz wurde ohne vorherigen Proteinase K- Verdau Phenol/Chloroform extrahiert. Dadurch konnte anschließend nur noch frei vorliegende DNA durch Ethanol präzipitiert werden. Die aufgereinigten Ansätze wurden als Triplets durch PCR untersucht (Abb. 21).

Aus Abb. 21 ist erkennbar, dass durch alleinige Phenol/ Chloroform Extraktion des Virusansatzes immer noch 27% virale DNA nachzuweisen waren. Es musste sich hierbei um frei vorliegende Virus-DNA handeln, da die im Viruscapsid lokalisierten Genome durch den fehlenden Proteinase K- Verdau nicht freigesetzt werden konnten. Der Nachweis von 27% freien Genomen zeigt, dass die statistische

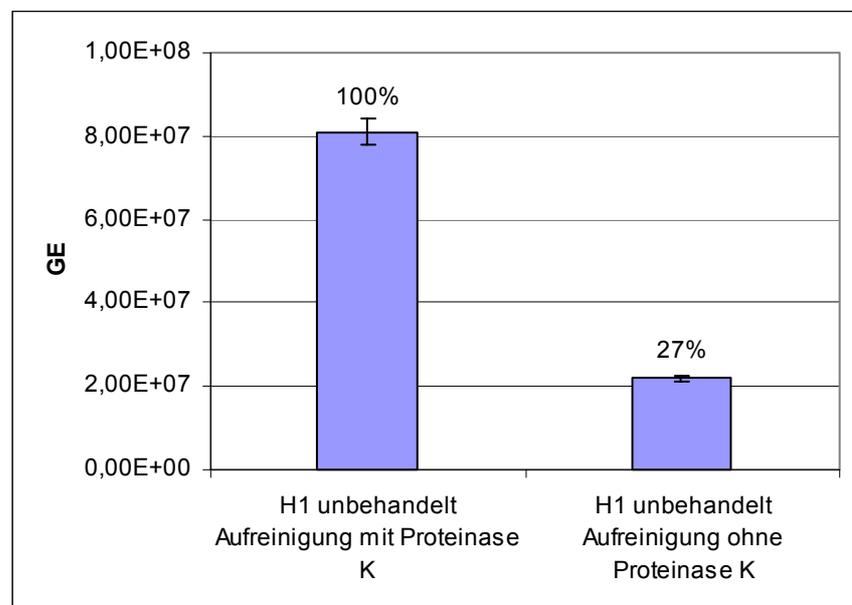


Abb. 21: PCR-Analyse auf freie Virus-DNA im Versuchsansatz CsCl-aufgereinigter Viren.

Der Ansatz wurde als Triplett analysiert, die senkrechten Markierungen geben Mittelwertabweichungen an.

Der Nachweis von 27% freien Genomen zeigt, dass statistische Übereinstimmung im S7 Nuklease-Verdau von CsCl-aufgereinigten Viren in Abb. 12 nur auf die Fehlerbreite der PCR zurückzuführen war.

Übereinstimmung im S7 Nukleaseverdau von CsCl aufgereinigten Viren in Abb. 20 nur auf die Fehlerbreite der PCR zurückzuführen war.

Der Anteil an frei vorliegender Virus-DNA nach Untersuchung der unaufgereinigten Viren, die aus dem Zellüberstand einer Infektion stammten, lag unter 0,1% (Daten nicht gezeigt). Dieses

Ergebnis steht im Einklang mit der fehlenden Degradierbarkeit des H-1 Genoms durch S7 Nuklease, wie sie in Abb. 20 dargestellt wurde.

In den folgenden Experimenten zur Untersuchung von Virus-DNA, wurden die Viren vor Versuchseinsatz mit S7 Nuklease verdaut, um Kontaminationen durch Nukleinsäuren, die Einfluss auf das Ergebnis haben könnten, zu beseitigen.

3.2.1.2 Southern Blot-Analyse

Die PCR zum H-1 DNA Nachweis konnte jedoch nur Aufschluss über die Degradation der amplifizierten Region liefern, die an Position 3479 - 3707 des 5176 Basen-Genoms liegt. Da jedoch eventuell auch mit einer nur partiellen Exposition des H-1 Genoms aus dem Virus-Capsid zu rechnen war, wurde die Länge des H-1 Genoms nach S7-Nuklease-Verdau durch Southern Blot-Hybridisierung überprüft. Hierbei wurden ca. 7×10^9 Viruspartikel pro Ansatz wie zuvor beschrieben mit S7 Nuklease inkubiert, diese danach inhibiert und die geschützte DNA aufgereinigt.

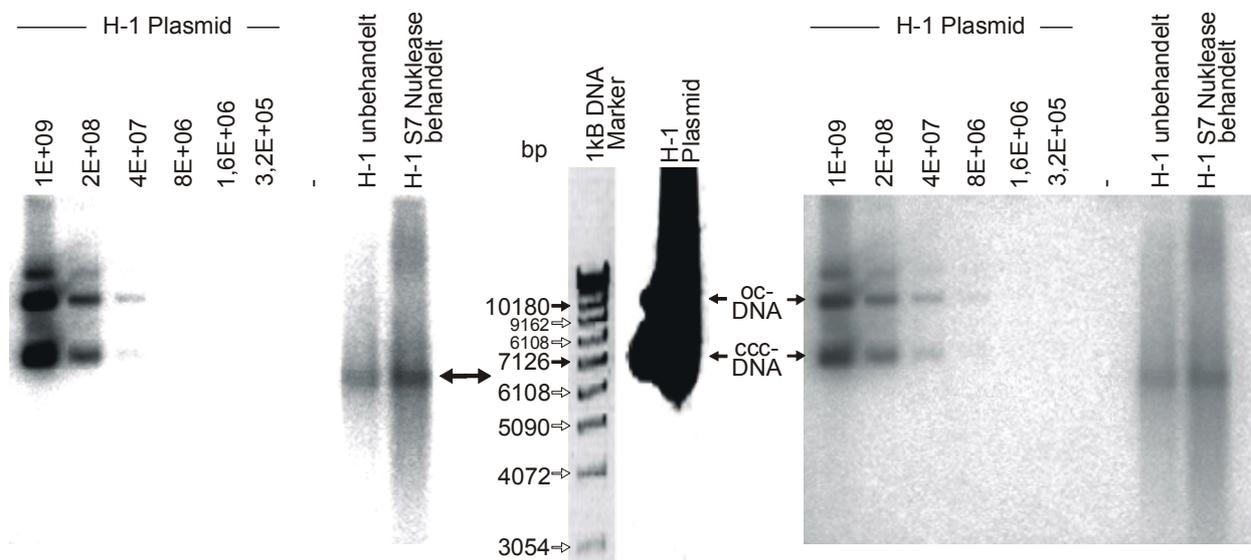


Abb. 22: Southern Blot-Hybridisierung von unbehandelten und S7 Nuklease verdauten H-1 Viren (Viren aus NB-K-Zellüberstand) mit Darstellung des H-1 Plasmid im Ethidium-Bromid gefärbten Agarosegel

In der Mitte ist die Auftrennung des H-1 Plasmid und eines 1 kb DNA-Markers im Ethidium-Bromid gefärbten Agarosegel abgebildet. Im rechten Southern Blot sind ccc-DNA und oc-DNA der H-1 Plasmid Standardverdunnungsreihe dargestellt, die eine Größe von ca. 10180 bp und 7126 bp haben. Der linke Blot ist stärker kontrastiert. Das Einzelstrang-DNA Genom des Virus mit einem Doppelpfeil markiert kommt besser zur Darstellung. Dieses wandert im elektrischen Feld des Agarosegels wie eine lineare doppelsträngige Nukleinsäure mit einer Größe zwischen 6108 und 7126 bp Länge.

Es zeigte sich (Abb. 22), dass das H-1 Plasmid der Standardverdunnungsreihe in zwei Hauptbanden aufgetrennt wurde, die eine Größe von ca. 10180 bp und 7126 bp aufwiesen. Die einzelsträngige virale DNA beider Virusansätze wurde in eine Hauptbande aufgetrennt, die schneller als die ccc-DNA Bande des H-1 Plasmid lief und in ihrem Laufverhalten einer ca. 6600 bp ds-DNA entspricht. Der S7-Nuklease Verdau zeigte keine sichtbare Degradation des Genoms.

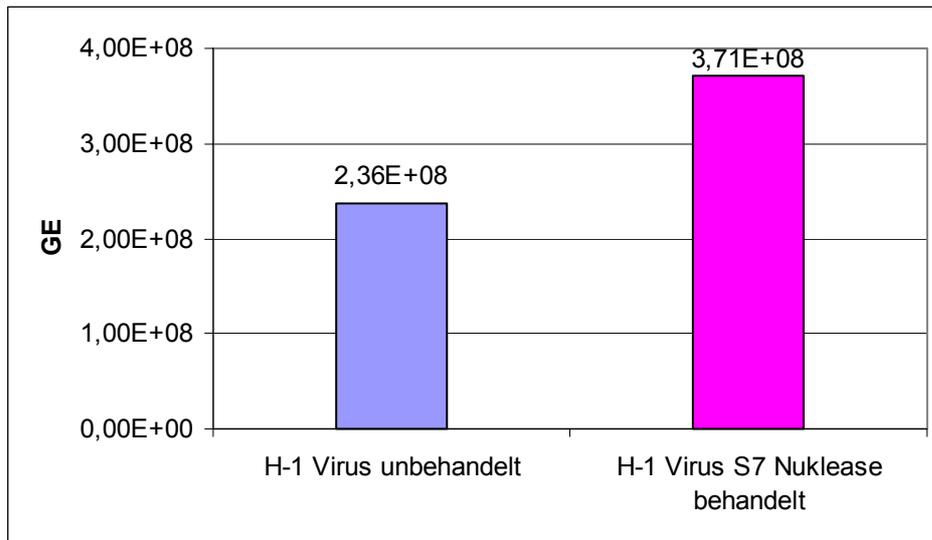


Abb. 23: Quantifizierung der Hybridisierungssignale im Southern Blot (Abb. 22) von unbehandelten und S7 Nuklease verdauten H-1 Viren (Viren aus NB-K-Zellüberstand)

Die Signalstärken der Banden wurden anschließend im Vergleich zu denen der Standardreihe ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abb. 23 dargestellt und gibt ebenfalls keinen Hinweis auf eine Degradation der H-1 Genome durch den Nuklease-Verdau. Im Gegenteil wurde ein leicht stärkeres Signal nach Verdau festgestellt, wobei dies am ehesten durch den heterogenen Hintergrund des Blots im Bereich der Banden erklärbar ist. Dessen ungeachtet bestätigt dieses Ergebnis die PCR-Befunde der Undegradierbarkeit des H-1 Genoms. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis konnten bei einem später aufgeführten Infektionsversuch von NB-K-Zellen (Abb. 38) zu keinem Infektionszeitpunkt S7 Nuklease sensible Viren nachgewiesen werden.

3.2.2. Analyse der Proteinassoziation der H-1 Genome durch Phenol-Extraktion

Für das MVM ist beschrieben, dass bei einem Teil der Viruspopulation das Nichtstrukturprotein NS1 kovalent mit dem 5'-terminalen Ende des Virusgenoms verbunden ist (Cotmore and Tattersall 1988). In dieser Population intakter Viren ist dieses Protein auf der Capsidoberfläche exponiert und wird erst während der Endozytose in neuinfizierten Zellen vom Genom abgespalten (Cotmore and Tattersall 1989). Die fehlende Degradierbarkeit des H-1 Virusgenoms könnte also auch auf einer sterischen Blockade der Virus-DNA zurückzuführen sein, obwohl bereits das 5'-Ende des Genoms auf der Oberfläche des Capsids vorliegt.

Um zu untersuchen, ob das 5'-Genomende der H-1 Viren kovalent an ein Protein gebunden ist, wurden Nuklease vorbehandelte Capside mit Harnstoff desintegriert (Abb. 24). Die dadurch freigesetzte Virus-DNA ließ sich durch Phenol/Chloroform-Extraktion mit folgender Überlegung auf gebundene Protein-Strukturen hin untersuchen:

Bei Vorliegen von Protein-assoziiierter DNA ließe sich diese durch Phenol-Chloroform-Extraktion abtrennen und wäre im hydrophilen Ansatz nicht mehr nachweisbar gewesen. War dagegen Virus-DNA nachweisbar, hätte ein Protein assoziiertes Virusgenom wahrscheinlich ausgeschlossen werden können. Jedoch könnte dennoch ein Teil der Viruspopulation ein Protein assoziiertes Genom gehabt haben, das dem DNA-Nachweis nach Phenol/Chloroform-Extraktion entgeht. Deshalb wurde zum quantitativen Vergleich ein Virusansatz ohne Phenol/Chloroform-Extraktion der freigesetzten Virus-DNA untersucht.

Ca. 4×10^5 Viruspartikel pro Virusansatz wurden mit S7 Nuklease vorbehandelt, um mögliche Kontaminationen durch freie virale Nukleinsäuren im Versuchsansatz zu besei-

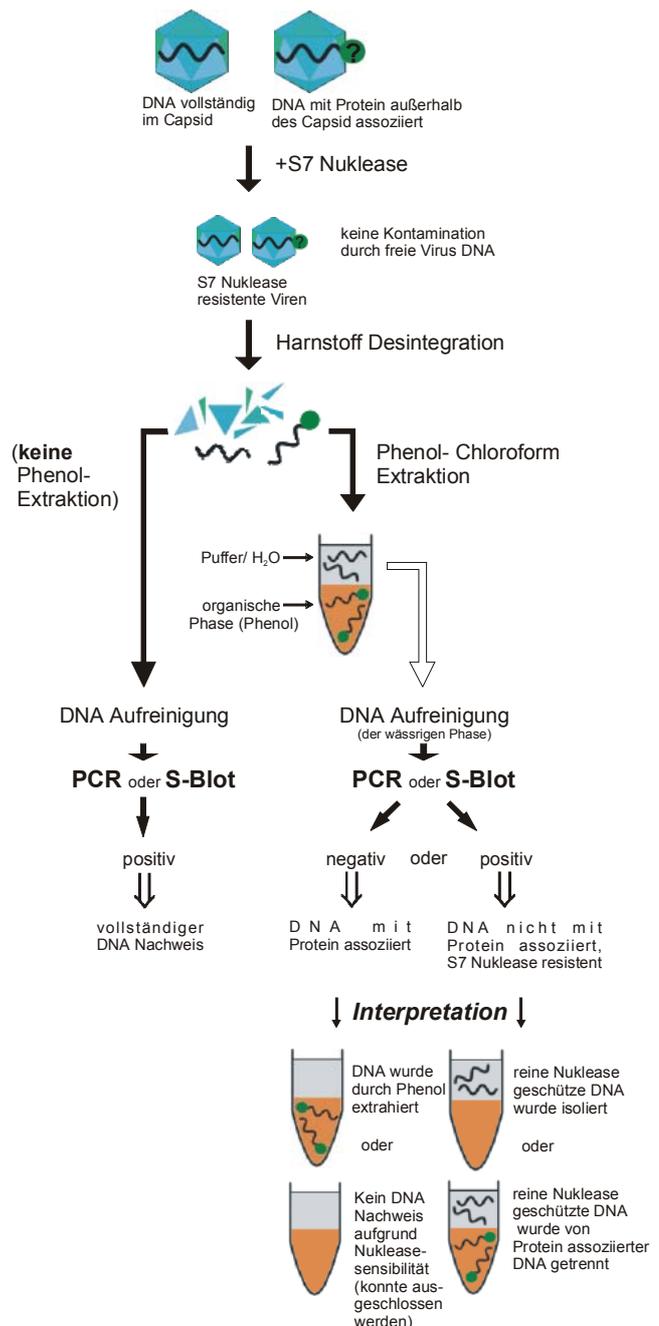


Abb. 24: Versuchsschema:

Untersuchung auf Phenolextrahierbarkeit des H-1 Genoms

tigen. Zudem wurden nicht CsCl-exponierte Viren verwendet, sondern H-1 Viren eines HeLa-Zellkulturüberstandes eingesetzt. Anschließend wurden die Viruspartikel mit Harnstoff desintegriert und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Davon wurde die hydrophile Phase isoliert und weiterverwendet (Ansatz b in Abb. 25). Ein zweiter Versuchsansatz mit Harnstoff desintegrierten Viruscapsiden wurde nicht Phenol/Chloroform

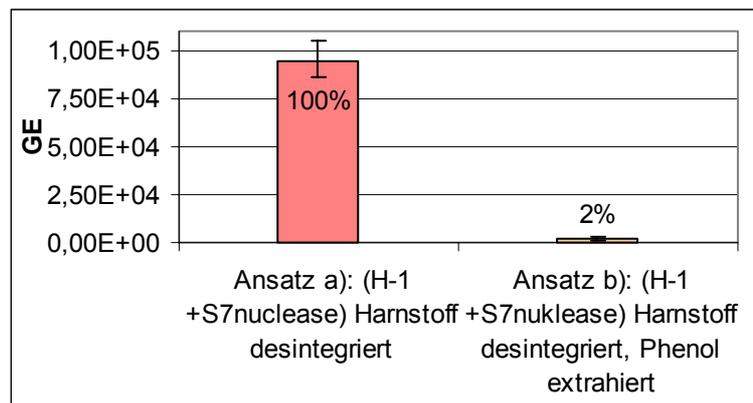


Abb. 25: PCR von Parvovirus H-1 zur Analyse auf Protein assoziiertes Virusgenom
Viren entstammten aus einem HeLa-Zellüberstand
Ansatz a) ist Harnstoff desintegriert
Ansatz b) ist Harnstoff desintegriert und Phenol/Chloroform extrahiert
Das Ergebnis zeigt, dass das Gros der Genome Protein-assoziiert ist.

extrahiert (Ansatz a in Abb. 25). Letzterer Ansatz sollte auch Protein gebundene DNA enthalten. Nach DNA-Aufreinigung wurden die aufgereinigten Virusansätze als Triplets in die PCR eingesetzt.

Das Diagramm (Abb. 25) zeigt, dass die meisten der in Harnstoff freigesetzten Virusgenome durch anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion abtrennbar waren. Gegenüber dem nicht Phenol/Chloroform extrahierten Virusansatz waren nach Phenol-Extraktion der Harnstoff desintegrierten Viruscapside nur ca. 2% nachweisbar. Der Großteil der Virusgenome wurde durch Phenol/Chloroform extrahiert. Unter Berücksichtigung der intra-Test-Abweichung der PCR von ca. 20% lagen die unterschiedlichen Genomkonzentrationen nicht im Bereich der Schwankungen der PCR-Messung. Das Gros der H-1 Viruspopulation scheint demnach ein Protein-assoziiertes Genom zu haben.

Um das Ergebnis zu überprüfen wurde das Experiment nach gleichem Versuchsschema wiederholt. Der Nachweis der Genome erfolgte wie im vorletzten Experiment, über eine Southern-Hybridisierung nach Auftrennen der DNA auf einem Agarosegel. Aufgrund der höheren Spezifität des Southern Blot sollte eine genauere Aussage über ein Protein-assoziiertes Virusgenom möglich sein. Pro Versuchsansatz wurden ca. $1,8 \times 10^9$ Viruspartikel eingesetzt.

Das einzelsträngige H-1 Genom in allen Virusansätzen wurde in eine Hauptbande aufgetrennt (Abb. 26), die wie ein ds-DNA-Fragment von ca. 6600 bp läuft.

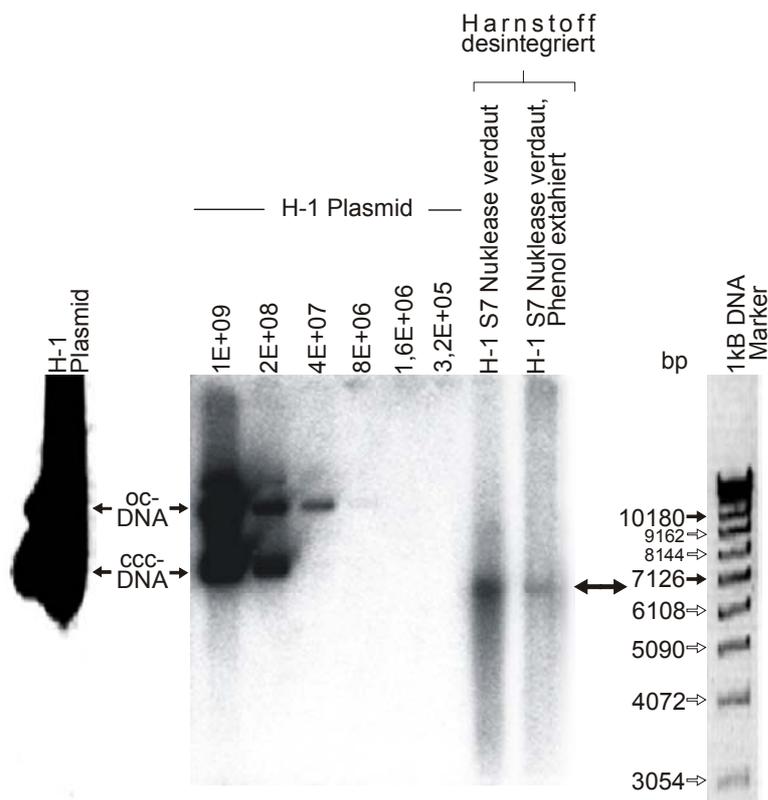


Abb. 26: Southern Blot zur Analyse auf Protein assoziiertes Virusgenom

Es wurden Viren aus dem Überstand infizierter NB-K-Zellen verwendet.

Links ist die Auftrennung des H-1 Plasmid, rechts die eines 1 kb DNA-Markers im Ethidium-Bromid gefärbten Agarosegel abgebildet. Im Southern Blot (Mitte) sind ccc-DNA und oc-DNA der H-1 Plasmid Standardverdünnungsreihe dargestellt, die eine Größe von ca. 10180 bp und 7126 bp haben. Der Blot ist stärker kontrastiert, so dass das Einzelstrang-DNA-Genom des H-1 Virus besser dargestellt wird. Der schwarze Doppelpfeil (rechts) markiert das Einzelstrang-DNA-Genom des Virus, das im elektrischen Feld des Agarosegels wie eine ca. 6600 bp DNA läuft.

Alle Viren wurden vor Versuchsbeginn mit S7 Nuklease vorverdaut. Anschließend erfolgte eine Harnstoffdesintegration und entweder eine direkte DNA-Aufreinigung (H-1 +S7 Nuklease) oder eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender DNA-Aufreinigung (H-1 +S7 Nuklease, Phenol extrahiert)

Die Signalstärken der Banden in Abb. 26 wurden im Vergleich zu denen der Standardreihe ausgewertet (Abb. 27). Aus der Auswertung ergibt sich, dass in jedem Virusansatz H-1 Genom nachweisbar war, wobei die nachgewiesenen Genome im Phenol/Chloroform-extrahierten Ansatz nicht mit einem Protein assoziiert waren.

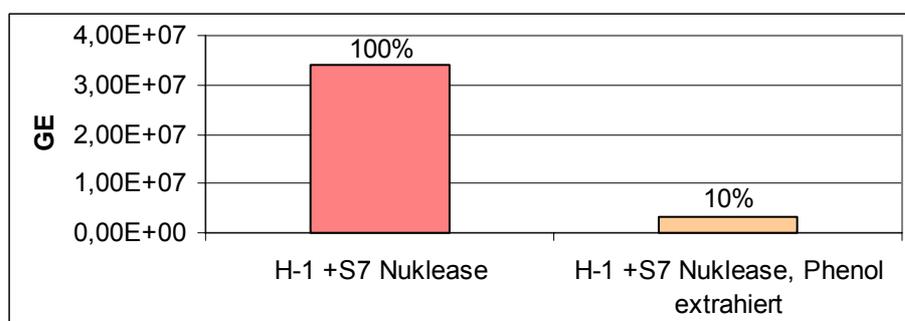


Abb. 27: Quantifizierung der Hybridisierungssignale des Southern Blot (Abb. 26) zur Analyse auf Protein-assoziiertes Virusgenom (Viren aus NB-K-Zellüberstand)

Es wird gezeigt, dass nach Phenol/Chloroform-Extraktion von in Harnstoff desintegrierten Viruscapsiden weniger Virusgenome (10%) nachweisbar waren. Das Gros der Genome ist Protein-assoziiert und konnte aufgrund Phenol/Chloroform-Extraktion nicht mehr nachgewiesen werden.

Der quantitative Vergleich zeigt, dass der Genomgehalt im Phenol/Chloroform extrahierten Nuklease-vorbehandelten Virusansatz auf 10% reduziert wurde. Das Ergebnis entspricht weitgehend dem der PCR (Abb. 25), bei dem nur 2% Virusgenome nach Phenol/Chloroform Extraktion von desintegrierten Virus-Capsiden nachgewiesen wurden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Plasmid Standardreihe des Southern Blot (Abb. 26) nur bis zur Konzentration von $4E+07$ optimal dargestellt wurde. Signalstärken, die einer geringeren Genomkonzentration entsprachen, konnten daher nicht exakt quantifiziert werden.

Das Southern Blot-Ergebnis konnte durch ein weiteres Experiment, das nach gleichem Versuchsschema zur Untersuchung der Phenol/Chloroform-Extrahierbarkeit des H-1 Genoms durchgeführt wurde, bestätigt werden, wie in Abb. 30 (dritte Spur von rechts) dargestellt. Hierbei wurden ca. $3,9 \times 10^9$ Viruspartikel pro Ansatz eingesetzt und 9% Protein-freie Genome nachgewiesen (Abb. 31).

Unter Einbezug der PCR- und Southern Blot-Ergebnisse (Abb. 25, Abb. 27) ist das Virusgenom einer geringen Virusteilpopulation frei von einer kovalenten Proteinbindung. Der Großteil der H-1 Viruspopulation besitzt im Einklang mit den Befunden, die für das MVM beschrieben wurden, ein Protein-assoziiertes Genom, aufgrund dessen diese Viren durch Phenol/Chloroform Extraktion abgetrennt wurden.

3.2.3 Fehlende Immunpräzipitation des H-1 Genom mit α NS1 nach in vitro Genomfreisetzung aus dem Capsid

Die vorherigen Experimente deuten darauf hin, dass das Gros der H-1 Viruspopulation ein Protein-assoziiertes Genom hat, aufgrund dessen Virus-DNA von desintegrierten Virus-Capsiden durch Phenol extrahiert werden kann. Um zu untersuchen, ob es sich bei diesem Protein um das NS1 Protein handelt, wurde versucht, die Virus-DNA nach Harnstoffdesintegration des Virus Capsids mit einem α NS1 Antikörper zu präzipitieren. Eine Immunpräzipitation von NS1 aus desintegrierten H-1 Viren wurde mit Hilfe von biomagnetischen Partikeln (Dynabeads) durchgeführt. Nach in vitro Freisetzung des Virusgenoms durch Harnstoff könnte ein NS1 assoziiertes Virusgenom mit dem Partikel- α NS1-Ak-Komplex immunpräzipitiert werden, während sich alle Strukturen ohne NS1 Protein im Überstand isolieren ließen (Versuchsschema, Abb.). Ist im Überstand Virus-DNA nachweisbar, ist diese nicht NS1 Protein gebunden.

Vor Durchführung des Experiments musste geklärt werden, dass Harnstoff, das zur Virusdesintegration eingesetzt wurde, weder die Bindung des Partikel-AK-Komplexes noch die Proteinase K-Aktivität bei der DNA Aufreinigung stört. Es wurde dazu ein Kaninchen Anti HBV-Core-AK (DAKO, Hamburg) mit magnetischen Partikeln (anti Kaninchen IgG) in

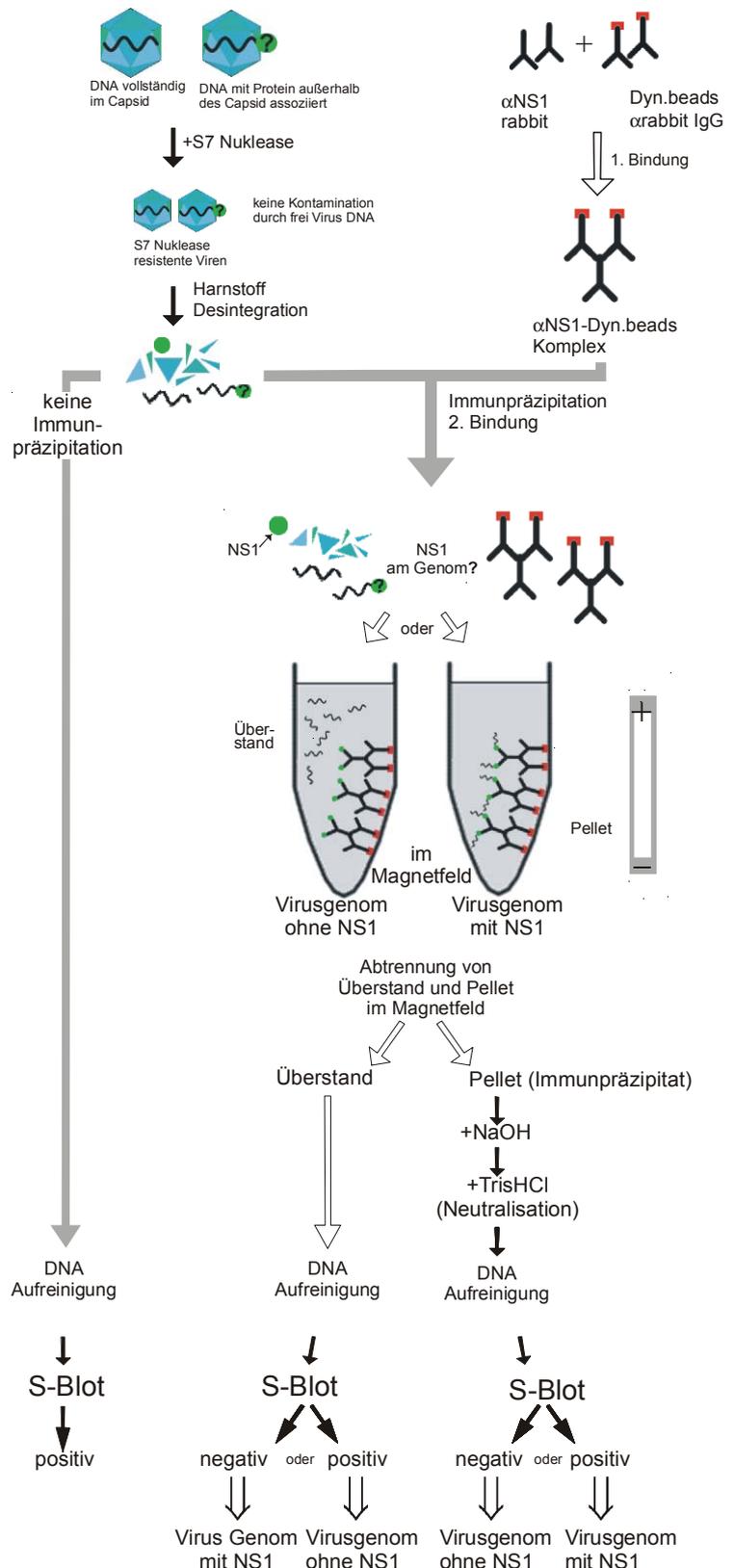
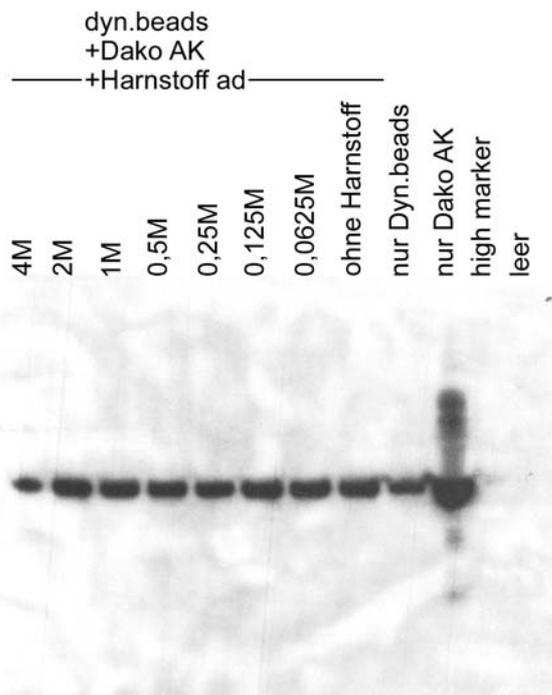


Abb. 28: Versuchsschema: Immunpräzipitation des Protein NS1

Gegenwart von verschiedenen Harnstoffkonzentrationen ad 4 - 0,6 M gebunden. Um zu sehen, ob sich Harnstoff auf die Bindung beider AK auswirkt, wurden die Versuchsansätze und ein hoch molekularer Proteinmarker auf einem SDS Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden im Elektroblob auf eine PVDF Membran übertragen. Entwickelt wurde der Blot nach ECL mit einem $\text{POD}\alpha$ Kaninchen-AK und mit einem Fluoroimager in Gegenwart eines Cy5-markierten α Kaninchen AK.

ECL - Einfluß von Harnstoff auf Dyn.beads



Einfluß von Harnstoff auf Dyn.beads W-Blot (2.AK =Cy5 anti-rabbit)

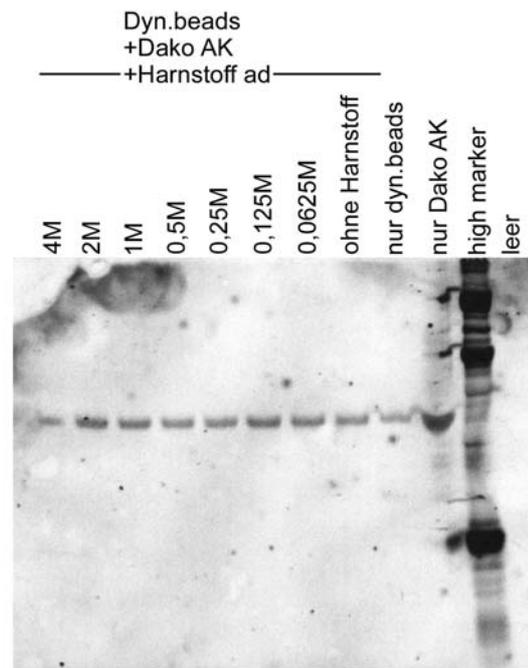


Abb. 29: Untersuchung von Harnstoffeinfluss auf Partikel-AK-Komplex

Der Western Blot zeigt, dass Anti HBV-Core-AK (DAKO) und Dynabead-AK in Höhe von ca. 56 kD aufgetrennt werden. Bei keiner Harnstoffkonzentration stellt sich eine gestörte Dynabead-AK-Bindung dar.

Im Western Blot (Abb.) zeigte sich, dass Anti HBV-Core-AK (DAKO) und Dynabead-AK in Höhe von ca. 56 kD aufgetrennt wurden. Nach Inkubation von Dynabeads α Kaninchen IgG mit dem DAKO-AK in diversen Harnstoffkonzentrationen bei 4°C für 12 h zeigte der Western Blot keinen Einfluss von Harnstoff auf die Dynabead- AK Bindung.

Der Einfluss von Harnstoff auf Proteinase K-Aktivität wurde beim Proteinase K-Verdau eines niedrig molekularen Proteinmarkers mit und ohne Zusatz von Harnstoff in 4 molarer Konzentration untersucht. Es zeigte sich bei Auftrennung des Proteinmarkers im SDS-PAGE nach verschiedenen Zeiten (10', 20', 40', 80') bei 65°C kein Unterschied zwischen der Proteinase K-Aktivität ohne Harnstoff und der Enzymaktivität in Gegenwart von Harnstoff (keine Abbildung).

Für die Immunpräzipitation wurden ca. $1,16 \times 10^{10}$ Viruspartikel aus Zellkulturüberstand in einem Ansatz für ca. 3 h mit S7 Nuklease verdaut. Danach wurde der Virusansatz zur in vitro Genom-Freisetzung mit Harnstoff behandelt. Anschließend wurde der Ansatz in drei Teile mit je ca. $3,9 \times 10^9$ Viruspartikeln

aufgeteilt. In einem Ansatz wurde die DNA aufgereinigt. Der zweite Teil wurde wie im letzten Kapitel beschrieben (Versuchsschema, Abb.24) für eine Phenol-Extraktion von Protein-gebundenen Virusgenomen verwendet und diente zum quantitativen Vergleich.

Der dritte Anteil wurde für eine Immunpräzipitation verwendet (Versuchsschema in Abb.). Im Magnetfeld wurden nicht an den Partikel-AK-Komplex gebundene Strukturen als Überstand vom Immunpräzipitat getrennt. Der Überstand wurde DNA aufgereinigt. Das Immunpräzipitat wurde zur Lösung der Protein-DNA-Bindung mit NaOH ad 0,1 M (bei 65°C für 1h) behandelt. Im Anschluss wurde mit 1M TrisHCl (pH 6,8) neutralisiert und DNA aufgereinigt. Die DNA-Aufreinigung erfolgte durch Proteinase K-Verdau.

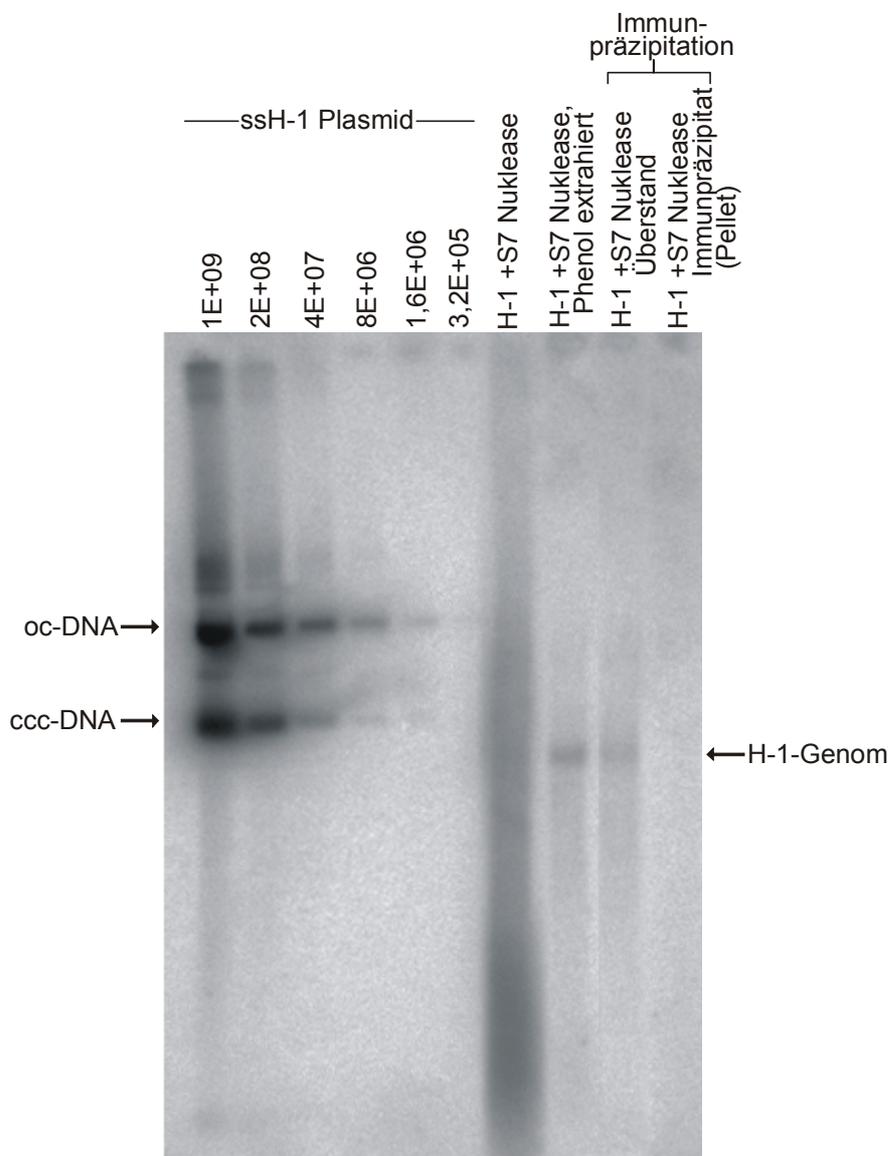


Abb. 30: Southern Blot:

Immunpräzipitation von Parvovirus H-1 mit α NS1 AK

Oberer linker Pfeil: oc-DNA ~10180 bp

unterer linker Pfeil: ccc-DNA ~7126 bp

rechter Pfeil: Hauptbande durch H-1 DNA: ~ 6600 bp

Es wurden Viren aus dem Zellüberstand infizierter NB-K-Zellen verwendet. Alle Viren wurden mit S7 Nuklease vorverdaut und anschließend in Harnstoff desintegriert.

Die Auftrennung der H-1 Viren (H-1 +S7 Nuklease) in eine verwischte Bande ist durch Protein-assoziierte Nukleinsäuren erklärbar.

Zum Vergleich wurden zusätzlich Viren aufgetragen, die wie nach dem Versuchsschema in Abb. 24 auf Phenolextrahierbarkeit untersucht wurden (H-1 +S7 Nuklease, Phenol extrahiert).

Nach α -NS1-Immunpräzipitation konnten wenige Virusgenome ohne NS1-Proteinassoziation nachgewiesen werden (H-1 +S7 Nuklease, Überstand) Das Gros der Viren (H-1 + S7 Nuklease, Pellet) war präzipitierbar und mit dem NS1 Protein assoziiert.

Die aufgereinigten Proben (Überstand und Immunpräzipitat) und eine Standardverdünnungsreihe eines 7862 bp H-1 Plasmid wurden auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und die Nukleinsäuren im Kapillarblot auf eine Nylon-Membran übertragen. (Wie zuvor erfolgte der Nachweis parvoviraler DNA durch Hybridisierung mit einer ^{32}P markierten Plasmid-Sonde gegen das H-1 Genom. Die Darstellung der radioaktiven Banden erfolgte durch Exposition eines Phosphoimagerscreens.)

Im Southern Blot (Abb. 30) ist die Auftrennung der Plasmid Standardreihe in 2 Hauptbanden, ca. 10180 bp und 7126 bp, dargestellt. Der zum quantitativen Vergleich dienende Nuklease vorbehandelte Virusansatz wurde in eine verwischte Hauptbande aufgetrennt, die durch Protein-assoziierte Nukleinsäuren verursacht wird. Der Phenol/Chloroform extrahierte Virusansatz wurde in eine Hauptbande aufgetrennt. Die ungebundenen Genome der Immunpräzipitation wurden ebenfalls in eine Hauptbande aufgetrennt, während Virus-DNA im αNS1AK -gebundenen Zustand nicht nachgewiesen werden konnte. Das Laufverhalten der abgebildeten Banden entspricht einer ca. 6600 bp ds-DNA.

Die Banden des Southern Blot wurden wieder im Vergleich zu den Signalstärken der Standardreihe quantifiziert. In Relation zu den Nuklease vorbehandelten Viren ohne Immunpräzipitation, blieben nach Immunpräzipitation nur ca. 7 % der Viren übrig, die nicht durch den $\alpha\text{NS1-AK}$ abgetrennt werden konnten (Abb. 31, rechte Säule). Dieser Teil der zur Immunpräzipitation eingesetzten Viren war nicht mit dem NS1 Protein verbunden und entsprach dem Anteil nicht durch Phenol/Chloroform extrahierbarer Viren, die 9% der Viren repräsentierten (Abb. 31, mittlere Säule). Im Präzipitat selbst konnten keine Virusgenome nachgewiesen werden, was versuchstechnisch bedingt ist und in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Dynabead-Immunpräzipitationen mit HBV-Capsiden steht.

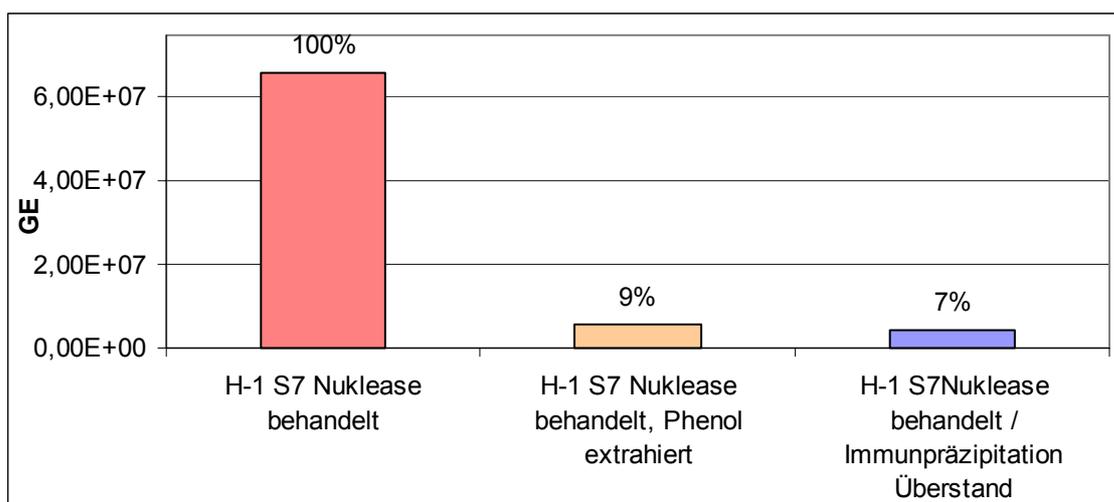


Abb. 31: Quantifizierung der Hybridisierungssignale des Southern Blot (Abb. 33) – $\alpha\text{NS1-AK}$ -Immunpräzipitation von Parvovirus H-1

Es wurden Viren aus einem NB-K-Zellüberstand verwendet. Alle wurden mit S7 Nuklease vorverdaut und anschließend in Harnstoff desintegriert. Das Diagramm zeigt, dass nach αNS1 -Immunpräzipitation nur 7% der Viren ohne NS1 Protein assoziiert waren. Der Rest bzw. das Gros der Viren war präzipitierbar aufgrund der kovalenten Bindung zum NS1-Protein.

Dessen ungeachtet bestätigt dieses Ergebnis die Phenol/Chloroform Extrahierbarkeit der Virus-DNA von in Harnstoff desintegrierten Viruscapsiden. Der Großteil der H-1 Viruspopulation weist eine Assoziation des Genoms zu einem Protein auf. Durch die Immunpräzipitation mit einem α NS1-AK konnte dieses Protein als NS1 identifiziert werden.

3.2.4 Infektion von HeLa-Zellen mit unbehandelten und Nuklease vorbehandelten H-1 Virus

Die S7 Nuklease-Behandlung bewirkte anscheinend keine beobachtbare Degradation der H-1 DNA, wobei eine geringe Verkürzung des Genoms nicht hätte dargestellt werden können. Eine geringe Degradation der Genomenden sollte jedoch zu einer Inhibition der Infektiösität der Viren führen, da die palindromischen Enden des Genoms unerlässlich für die Replikation sind. Daher wurde der Infektionserfolg von unbehandelten H-1 Viren mit dem von S7 Nuklease vorbehandelten H-1 Viren in HeLa-Zellen verglichen. Es wurden Viren aus dem Überstand einer HeLa-Zellinfektion eingesetzt. Der Infektionserfolg wurde an der Lyse der infizierten Zellen gemessen. Vierzehn Ansätze mit 5×10^4 HeLa-Zellen wurden vorbereitet. 6 Zellansätze wurden mit unbehandelten Parvoviren ab 5×10^6 Partikel (100 Viren/Zelle) in abnehmender Konzentration (1:3) infiziert. Sechs weitere Zellansätze wurden mit S7 Nuklease vorbehandelten H-1 Viren in gleicher Weise infiziert. Zwei Zellansätze blieben uninfiziert, um die Morphologie der infizierten Zellen mit der uninfizierter Zellen vergleichen zu können.

Es bestand nach 3 Tagen Infektion kein Unterschied in der Morphologie bei Vergleich der Zellen, die mit unbehandelten Viren infiziert und den Zellen, die mit S7 Nuklease vorbehandelten Viren infiziert wurden. Es kam zur Zellyse ab Infektionen von 100 Viren pro Zelle. Ab einer Infektionsdosis von 34 Viren/Zelle und weniger stellte sich keine Zellyse ein

(Abb. 32). Der Versuch zeigte, dass S7 Nuklease keinen sichtbaren Einfluss auf die Infektiösität des Virus hat. Die Degradation der freiliegenden und zur Infektion notwendigen Genomenden der NS1-freien Viren konnte die Infektion nicht inhibieren, sodass die NS1-freie Virusform nicht infektiös erschien. Eine Infektiösität der NS-freien Viren konnte dennoch nicht ausgeschlossen werden, da der Anteil NS-1 freier

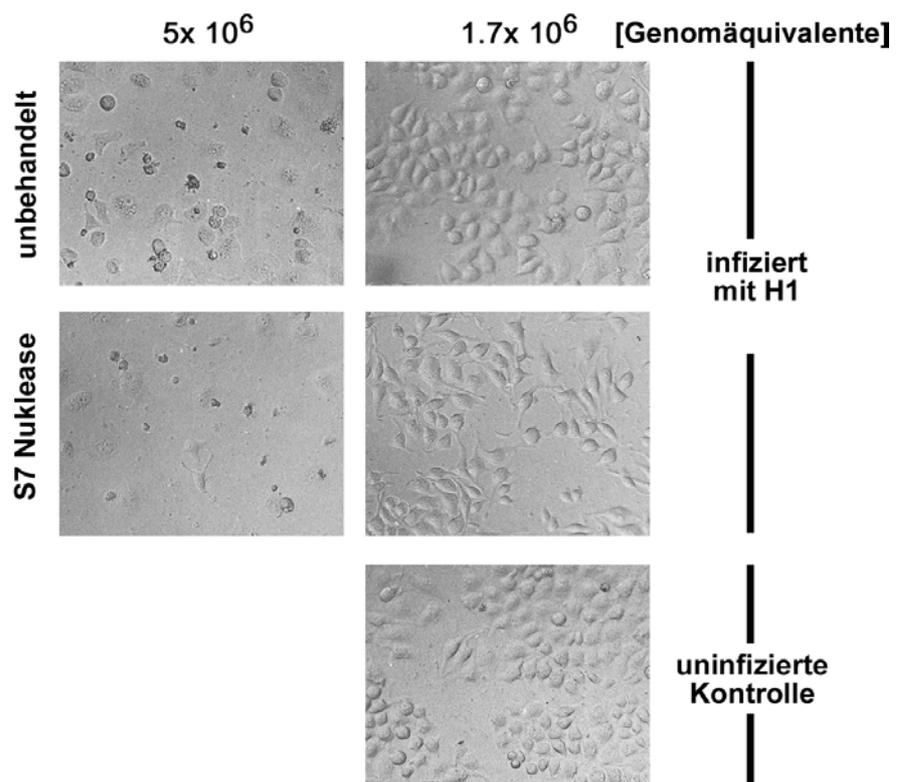


Abb. 32: Untersuchung von S7 Nuklease-Einfluss auf die Infektiösität des H-1 Virus

Die infizierenden Viren entstammten HeLa-Zellüberständen. Es wurden nur die ersten zwei Virustitrationen der infizierten Zellen abgebildet, weil ab 34 Viren/Zelle keine Lyse mehr eintrat. Das Ergebnis zeigt, dass S7 Nuklease keinen sichtbaren Einfluss auf die Infektiösität der Viren hat.

Viren so gering ist, dass eine fehlende Infektiosität dieser Virusteilpopulation im letzteren Infektionsversuch nicht exakt dargestellt werden konnte. Es kann also nicht sicher davon ausgegangen werden, dass nur die NS1-gebundenen Viren infektiös sind.

3.2.5 Relative Infektiosität des Parvovirus H-1 mit und ohne S7 Nuklease Einfluss

Um letztgenannten Unterschied der Infektiosität genauer erfassen zu können, wurden die relativen Infektiositäten der unbehandelten und Nuklease vorbehandelten Viren verglichen. Zur Berechnung der relativen Infektiositäten wurde die Endverdünnungsmethode nach Spearman/Kärber herangezogen.

Hierzu wurden 10^4 HeLa-Zellen mit unbehandelten oder S7 Nuklease vorbehandelten H-1 Viren in geometrischen Verdünnungsschritten infiziert. Nach 3 Tagen Infektion wurden die Zellen auf Zelllyse als Zeichen einer erfolgreichen Infektion untersucht (Abb. 33 + Tabelle 3) und dadurch die mittleren effektiven Dosen der unbehandelten und S7 Nuklease vorbehandelten H-1 Viren berechnet.

Abb. 33: 96-Lochplatte – HeLa-Zellinfektion mit unbehandelten und S7 Nuklease vorbehandelten Parvovirus H-1, ab 400 Viren/Zelle in 1:2 Verdünnungsschritten, 10^4 Zellen pro Vertiefung zu Infektionsbeginn
Die Viren entstammten einer CsCl-Gradient-Aufreinigung

Infektions-Dosis	Infektion mit H-1 unbehandelt (Vertiefung 1-6)						Infektion mit H-1 S7 Nuklease vorbehandelt (Vertiefung 7-12)						
	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	
400 Viren/Zelle	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse
200 Viren/Zelle	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	1/3	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse
100 Viren/Zelle	Lyse	Lyse	Lyse	keine Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	Lyse	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	keine Lyse	keine Lyse	$\frac{1}{3}$
50 Viren/Zelle	keine Lyse						keine Lyse						
25 Viren/Zelle	keine Lyse						keine Lyse						
13 Viren/Zelle	keine Lyse						keine Lyse						
6 Viren/Zelle	keine Lyse						keine Lyse						
uninfizierte Zellen	keine Lyse						keine Lyse						

Tabelle 3: Schätzung der ID_{50} nach Spearman/Kärber (96-Lochplatte):

Virusverdünnung pro μ l	CPE = cytopathischer Effekt H-1 unbehandelt	CPE: H-1 S7Nuklease vorbehandelt
$10^{-1,6}$ μ l	6/6	6/6
$10^{-1,9}$ μ l	6/6	6/6
$10^{-2,2}$ μ l	5/6	4/6
$10^{-2,5}$ μ l	0/6	0/6
$10^{-2,8}$ μ l	0/6	0/6
$10^{-3,1}$ μ l	0/6	0/6
$10^{-3,4}$ μ l	0/6	0/6

$$\text{Berechnung: } ID_{50}/\text{Volumen} = x_0 - \frac{d}{2} + \frac{d}{n} \sum xi$$

x_0 = positiver Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Zellen lysiert sind (1,9)

d = Dosisabstand in Logarithmen (0,3)

n = Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Zellflächen (6)

$\sum xi$ = Summe aller auf die Infektion mit Zellyse reagierenden Zellflächen, ab und einschließlich der bei x_0 (5+6 bzw. 4+6)

ID_{50} H-1 Virus unbehandelt:

$$1,9 - \frac{0,3}{2} + \frac{0,3}{6} \times (5 + 6) = 2,3 \rightarrow 10^{2,3} ID_{50} = \sim 200 ID_{50} \text{ in } 10^{-2,3} \mu\text{l Virusstammlösung} = \\ \sim 4 \times 10^7 \text{ bzw. } 10^{7,6} ID_{50} \text{ (infektiöse Einheiten) pro ml}$$

ID_{50} H-1 Virus S7 Nuklease vorbehandelt:

$$1,9 - \frac{0,3}{2} + \frac{0,3}{6} \times (4 + 6) = 2,25 \rightarrow 10^{2,25} ID_{50} = \sim 178 ID_{50} \text{ in } 10^{-2,25} \mu\text{l Virusstammlösung} = \\ \sim 3,2 \times 10^7 \text{ bzw. } 10^{7,5} ID_{50} \text{ pro ml}$$

Die Berechnungen ergaben in etwa die gleiche mittlere effektive Dosis von unbehandelten und S7 Nuklease vorbehandelten H-1 Viren. Die Infektiösität der S7 Nuklease verdauten Viren betrug $10^{7,5} ID_{50}/\text{ml}$, die der unbehandelten Viren $10^{7,6} ID_{50}/\text{ml}$. Eine geringe Degradation der Genomenden durch Nukleaseverdau ist somit auszuschliessen, so dass keine aus dem Viruscapsid raushängenden Genomenden vorliegen.

Weil die Virusstammlösung eine Konzentration von ca. $1,5 \times 10^8$ GE/ μl hatte, besagt die ID_{50} von $4 \times 10^7/\text{ml}$ bzw. $4 \times 10^4/\mu\text{l}$, dass von $1,5 \times 10^8$ Viren 4×10^4 Partikel infektiös sind. Das Partikel zu Infektiösitätverhältnis (p/i) beträgt demnach 3750. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass in diesem Versuch CsCl-gereinigte Viren verwendet wurden, die offensichtlich durch ihre Aufreinigung strukturell geschädigt sind.

3.2.6 Zusammenfassung der H-1 Charakterisierung

Zusammenfassend ergibt sich folgende Charakterisierung des Parvovirus H-1. Das Parvovirus H-1 ist nicht Nuklease sensibel, wie es Analysen über Degradierbarkeit des H-1 Genoms durch S7 Nuklease Verdau von H-1 Viren zeigen. Aufgrund der S7 Nuklease Resistenz liegt das Virusgenom nicht außerhalb des Capsid frei. Dies beweist jedoch nicht, dass das Virusgenom vollständig im Capsid vorliegt. Es wäre denkbar, dass Virusgenom außerhalb des Capsid mit einem Protein gebunden ist, wie es Untersuchungen am MVM zeigen. Durch Untersuchungen auf Phenol-Extrahierbarkeit des H-1 Genoms nach in vitro Genomfreisetzung konnte belegt

werden, dass das Virusgenom bis auf eine kleine Virusteilpopulation mit einem Protein assoziiert ist. Durch Immunpräzipitationsversuche des H-1 Genoms mit einem α NS1-Antikörper nach in vitro Genomfreisetzung konnte das Protein, das mit den meisten Virusgenomen kovalent verbunden ist, als NS1-Protein identifiziert werden.

Die Nukleaseresistenz des Virus kann durch sterische Blockade des Genoms außerhalb des Virus-Capsid erklärt werden, denn das NS1-Protein gilt als äußerster Anteil des Parvovirus-Genoms. (Cotmore and Tattersall 1989). S7 Nuklease beeinflusst nicht das Infektionsverhalten des Parvovirus H-1, was durch Infektionsversuche mit unbehandelten und S7 Nuklease vorbehandelten H-1 Viren belegt wird. Daher ist auch eine geringe Degradation der Genomenden auszuschließen, so dass keine aus dem Viruscapsid raushängenden Genomenden vorliegen.

3.3 Aufnahmekinetik des Parvovirus H-1

Das Multiplikations- und Aufnahmeverhalten des Virus wurde durch Infektion von HeLa- und NB-K-Zellen untersucht.

3.3.1 NB-K-Infektionskinetik

3×10^6 NB-K-Zellen wurden mit ca. 8×10^9 H-1 Viren infiziert (~3000 Viren/ Zelle). Die eingesetzten Viren entstammten aus dem Überstand einer NB-K-Zellinfektion. In einem Zellansatz wurde die Endozytose der Viren inhibiert, indem die Zellen 2 h bei RT gelagert wurden (Kuismanen E Sarraste J 1989 Methods Cell Biol). Im Anschluss wurde der Zellüberstand isoliert, die Zellen gewaschen, nicht-aufgenommene Viren mit Trypsin abgelöst und die Zellen auf eine neue Zellplatte umgesetzt. Sechszwanzig h nach viraler Zelladhäsion wurden die Zellkompartimente isoliert. Bei den drei übrigen Zellansätzen erfolgte die Virusadhäsion vor Umsetzung der Zellen auf neue Platten bei RT für 2 h und zusätzlich 1 h 37°C . Es sollte damit untersucht werden, ob die zusätzliche Inkubation der Zellen bei 37°C für eine Stunde zu einer Mehraufnahme der Viren in die Zelle führt, was eine Rezeptorlimitierung der Virusaufnahme anzeigen würde. Die Zellkompartimente der drei übrigen Zellansätze wurden nach unterschiedlichen Zeiten isoliert. Ein infizierter Zellansatz wurde 6 h nach Virusadhäsion aufgearbeitet, ein Zellansatz 8 h nach Virusadhäsion und ein Zellansatz 26 h nach viraler Zelladhäsion.

Das Cytosol der Zellen wurde durch Permeabilisierung der Zellmembran mit Digitonin gewonnen. Digitonin permeabilisiert nur Cholesterol-haltige Membranen und lässt die Kernmembran und das ER intakt. Anschließend wurde das Karyoplasma nebst Membran-gebundenen Viren durch Tx100 Behandlung isoliert.

Die isolierten Zellkompartimente wurden aufgeteilt, ein Teil wurde unter vorher beschriebenen Bedingungen S7 Nuklease verdaut, ein Teil blieb unbehandelt. Es sollte dadurch untersucht

werden, ob Virus DNA während des Infektionsvorganges im Cytosol oder im Karyoplasma freigesetzt wurde; damit also Nuklease-degradierbar war. Die Ansätze wurden als Dupletts zum DNA-Nachweis in der PCR eingesetzt. Durch die gleichzeitige Analyse von unbehandelten und Nuklease-verdauten Ansätzen in einer PCR wurde

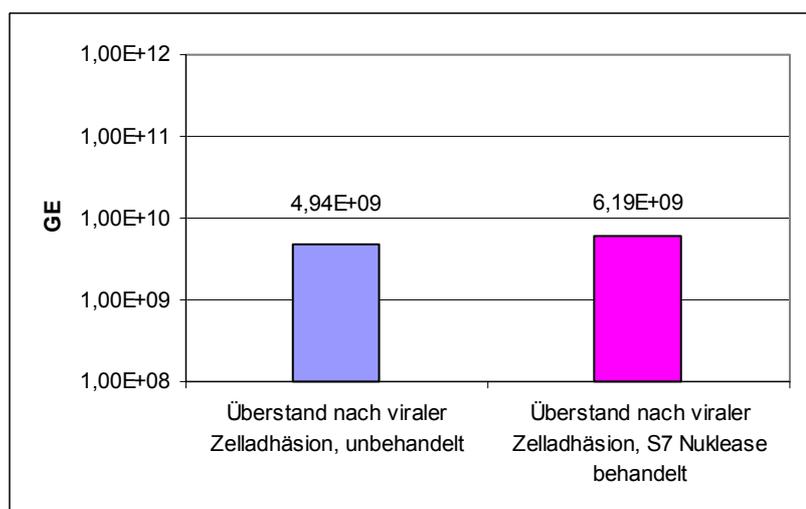


Abb. 34: PCR – H-1 Infektionskinetik mit NB-K-Zellen,

GE-Konzentration im NB-K-Zellüberstand nach Virusadhäsion. Zelladhäsionsbedingungen:

2 h RT + 1 h 37°C zur partiellen Endozytoseinhibition

- aufgrund der geringen Schwankungsbreite innerhalb eines PCR Laufs - ein quantitativer Vergleich ermöglicht.

Es wurden nach Virusadhäsion (2 h RT + 1 h 37°C) $4,94 \times 10^9$ Genomäquivalente im unbehandelten Zellüberstand, $6,19 \times 10^9$ im Nuklease behandelten wiedergefunden (Abb. 34). Das entsprach in etwa 2/3 der zur Infektion eingesetzten Viren, wobei davon ausgegangen wurde, dass der verbliebene Rest von ca. 1/3 der eingesetzten Viren in die Zellen aufgenommen wurde.

Die bestimmten Genomäquivalente von Cytosol und Karyoplasma wurden als intrazelluläre H-1 Genome zusammengezählt. Es

wurden zunächst die Zellen auf intrazelluläre H-1 Genome untersucht, die zur Virusadhäsion 2 h bei RT und 1 h bei 37°C lagerten.

6 h nach Virusadhäsion fanden sich intrazellulär im unbehandelten Ansatz

$\sim 3 \times 10^9$ Genomäquivalente, im Nuklease verdauten Ansatz

$2,7 \times 10^9$ Genomäquivalente (Abb. 35). Diese Mengen

entsprechen der angenommenen Menge an aufgenommenen Viren.

Acht h nach Virusadhäsion waren es ca. 5×10^9 GE im unbehandelten und $4,5 \times 10^9$ GE im Nuklease behandelten Ansatz (Abb. 35). Bis zu diesem Zeitpunkt hatte also nur eine geringe Multiplikation viraler Genome stattgefunden.

Sechszwanzig h nach Virusadhäsion kam es zur Genomzunahme auf $2,53 \times 10^{11}$ im unbehandelten intrazellulären Zellkompartiment und auf $2,47 \times 10^{11}$

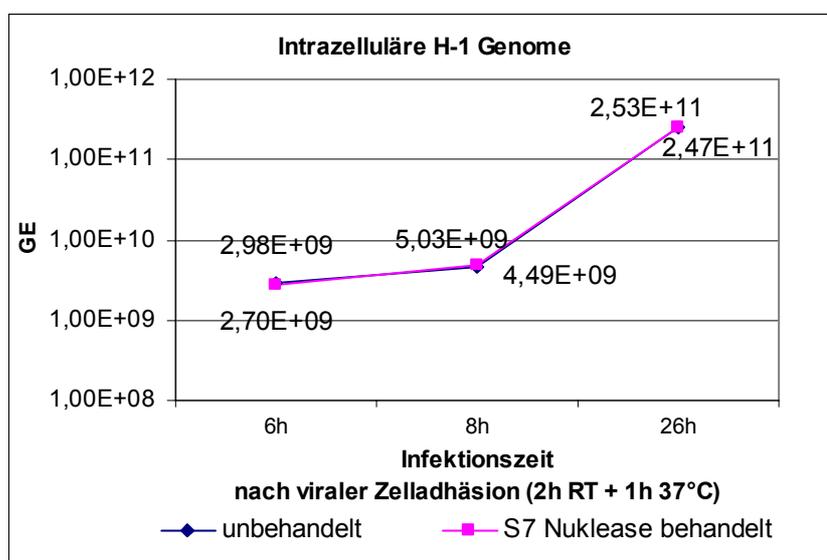


Abb. 35: PCR – H-1 Infektionskinetik mit NB-K-Zellen,

Es wurden die ermittelten GE vom NB-K-Cytosol und Karyoplasma zusammengezählt. Zelladhäsionsbedingungen: 2 h RT + 1 h 37°C zur partiellen Endozytoseinhibition

Zu allen Zeitpunkten bestand eine S7 Nuklease-Resistenz. Dies weist auf eine schnelle Verpackung der Viren hin.

Gegenüber der Inkubation 2 h RT (Abb. 39) kam es hier nach 26 h zu einer erhöhten Amplifikation, bedingt durch ein vermehrtes Rezeptor „shuttling“.

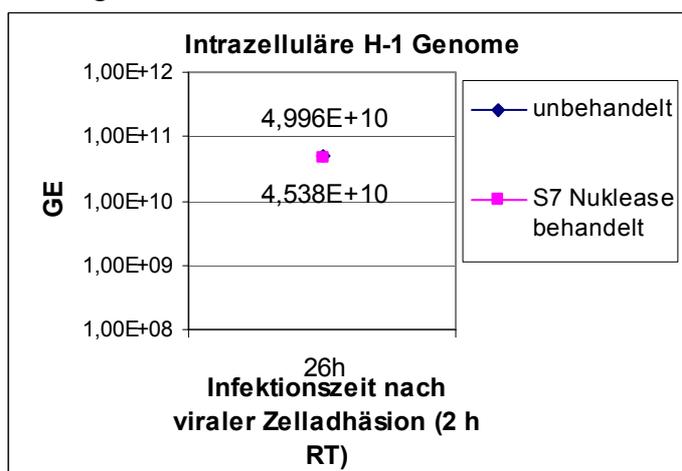


Abb. 36:

PCR – H-1 Infektionskinetik mit NB-K-Zellen, Es wurden die ermittelten GE vom NB-K-Cytosol und Karyoplasma zusammengezählt. Zelladhäsionsbedingungen: 2 h RT zur kompletten Endozytoseinhibition

GE im Nuklease verdauten intrazellulären Zellkompartiment (Abb. 35).

In den Zellen, die zur Virusadhäsion nur 2h bei RT gelagert wurden, um eine Rezeptor limitierte Virusaufnahme zu untersuchen, waren 26 h nach Virusadhäsion 5×10^{10} GE im unbehandelten Ansatz und $4,5 \times 10^{10}$ GE im S7 Nuklease verdauten Ansatz (Abb. 36) nachzuweisen, also deutlich weniger Viren als in den Ansätzen, in denen eine kontinuierliche Endozytose stattgefunden hatte.

Zur Infektion wurden 8×10^9 Viren eingesetzt. Im Überstand nach viraler Zelladhäsion waren ca. 5×10^9 der eingesetzten Viren nachweisbar (Abb. 34). Ca. 3×10^9 der eingesetzten Viren blieben zur Infektion übrig. Weil bis zu 6h nach Virusadhäsion der Zellen nicht mehr als ca. 3×10^9 GE nachweisbar waren (Abb. 35), kann es bis dahin zu keiner Neusynthese von Viren gekommen sein, so dass bis zu diesem Zeitpunkt nur infizierende Viren untersucht wurden. Nach 8h Infektion befanden sich ca. 5×10^9 Viren in den Zellen, was einer Zunahme um 67% der infizierenden Viren entsprach. Nach 26 h Infektion war eine deutliche Genomzunahme zu messen (Abb. 35), was eine Neusynthese von Viren anzeigte. Bei Virusadhäsionsbedingungen von 2 h bei RT und zusätzlich 1 h 37°C kam es nach 26 h Infektion jedoch zu einer 5-fach höheren Virusvermehrung als unter Adhäsionsbedingung von ausschließlich 2 h RT (Abb. 35 und Abb. 36), unter der die Endozytose inhibiert wurde. Dieses Aufnahmeverhalten bei derartiger endozytotischer Blockade weist auf eine Rezeptor-limitierte Aufnahme des H-1 Virus hin: Während die Rezeptoren der Zellen, die bei Virusadhäsion nach Inhibierung der Endozytose zusätzlich 1 h 37°C ausgesetzt waren, wieder an die Oberfläche gelangen konnten und auf der Zelloberfläche weiteren Viren zur Bindung zu Verfügung standen (vermehrtes Rezeptor „shuttling“), war dies bei den Zellen, deren Endozytose während der gesamten Virusadhäsionszeit inhibiert wurde, nicht möglich. Diese Zellen konnten daher nur weniger Viren synthetisieren, wie in Abb. 36 gegenüber Abb. 35 deutlich wird.

Zu allen Zeitpunkten der Infektion bestand eine weitgehende S7 Nuklease-Resistenz. Dies weist auf eine schnelle Verpackung neusynthetisierter Viren in NB-K-Zellen hin und erklärt auch, warum im Zellkulturüberstand, in den die Viren über Zellyse gelangen, keine freien Genome zu beobachten waren.

3.3.2 HeLa-Infektionskinetik

Eine messbare Nukleasesensibilität der intrazellulären Viren war nach Infektion von NB-K-Zellen nicht erkennbar, wobei bekannt ist, dass NB-K-Zellen sehr rasch Nachkommenviren produzieren. Deshalb wurde der Infektionsversuch im gleichen Vorgehen mit HeLa-Zellen wiederholt, die H-1 Viren nur langsamer synthetisieren. Hierbei wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen mit $4,5 \times 10^{10}$ Viren infiziert. Wie im vorherigen Ansatz entstammten die eingesetzten Viren dem Überstand einer NB-K-Zellinfektion. Die Zellkompartimente wurden 3 h, 5 h und 26 h nach viraler Zelladhäsion isoliert. Die Infektionskinetik ist aus den Abbildungen 37-39 erkennbar.

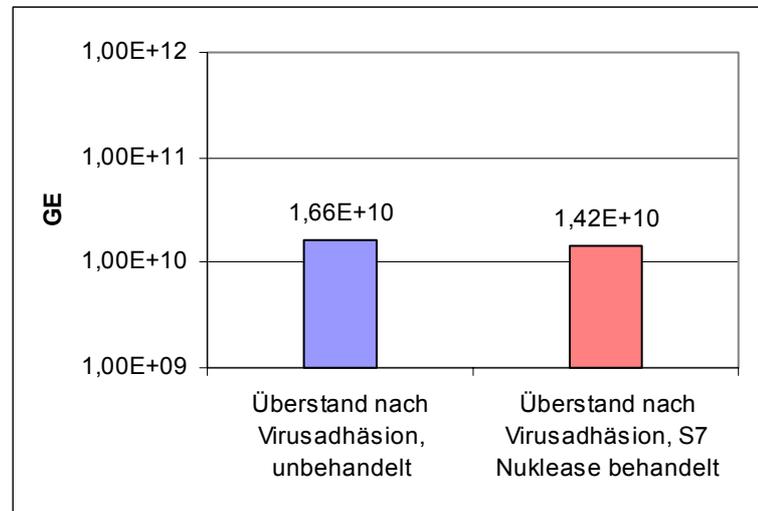


Abb. 37: PCR – H-1 Infektionskinetik mit HeLa-Zellen, GE-Konzentration im HeLa-Zellüberstand nach Virusadhäsion. Zelladhäsionsbedingungen: 2 h RT + 1 h 37°C zur partiellen Endozytoseinhibition

Im Zellüberstand direkt nach viraler Zelladhäsion waren ca. $1,6 \times 10^{10}$ GE nachweisbar (Abb. 37). Dies entsprach ca. 1/3 der zur Infektion eingesetzten Viren. Dem nach blieben ca. 3×10^{10} infizierende Viren übrig. Intrazellulär blieb die Genomkonzentration 3 h und 5 h nach Virusadhäsion gleich (Abb. 38). Sie betrug ca. 3×10^{10} GE, das der Menge an infizierenden Viren direkt nach viraler Adhäsion entsprach. Sechszwanzig h nach Virusadhäsion kam es zur deutlichen Genomzunahme von $6,9 \times 10^{13}$ GE unter Virusadhäsionsbedingungen von 2 h RT und zusätzlich 1 h 37°C, gegenüber $2,3 \times 10^{13}$ GE in den Zellen, deren

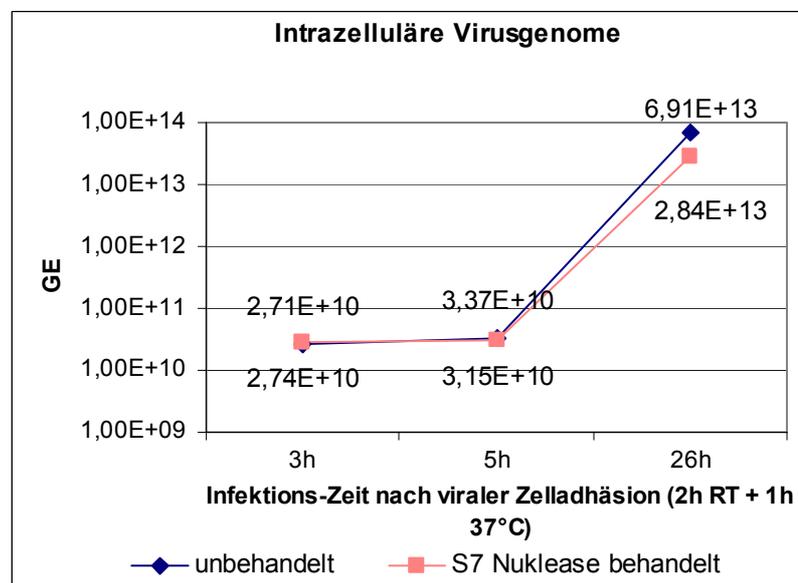


Abb. 38: PCR – H-1 Infektionskinetik mit HeLa-Zellen,

Es wurden die ermittelten GE vom HeLa-Cytosol und Karyoplasma zusammengezählt.

Zelladhäsionsbedingungen: 2 h RT + 1 h 37°C zur partiellen Endozytoseinhibition

Mit zunehmender Amplifikation kam es zu einer Zunahme der Genomfreisetzung. Zur Untersuchung der Virusaufnahme sind daher HeLa-Zellen besser geeignet.

Gegenüber der Inkubation 2 h RT (Abb. 42) kam es hier nach 26 h zu einer erhöhten Amplifikation, bedingt durch ein vermehrtes Rezeptor „shuttling“.

Endozytose während der ganzen Adhäsionszeit inhibiert wurde (Abb. 38 und Abb. 39). Die Genomzunahme unter zeitlich begrenzter Endozytoseinhibition war 3,5-fach höher als unter vollständiger Endozytoseinhibition, was bei Rezeptor-limitierter Virusaufnahme zu erwarten war. Der Versuch bestätigt das Rezeptor-„shuttling“, das bereits bei Infektion von NB-K-Zellen

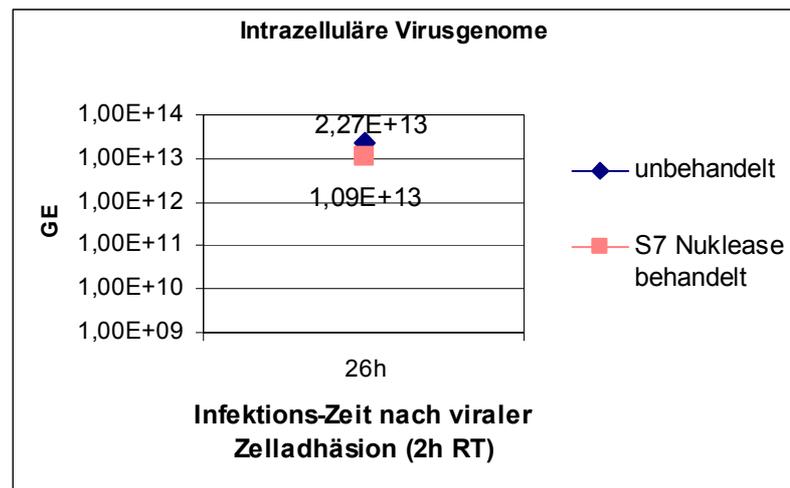


Abb. 39: PCR –H-1 Infektionskinetik mit HeLa-Zellen,

**Es wurden die ermittelten GE vom HeLa-Cytosol und Karyoplasma zusammengezählt
Zelladhäsionsbedingungen: 2 h RT + 1 h 37°C zur partiellen Endozytoseinhibition**

gezeigt wurde. Auch bei Infektion von HeLa-Zellen kam es nach 26 h Infektion zu einer Virusneusynthese.

Im Gegensatz zur Infektion der NB-K-Zellen bestand intrazellulär 26 h nach Infektion ein relativ großer quantitativer Unterschied von Virusgenomen im unbehandelten und Nuklease behandelten Ansatz. Bei einer Intra-Test-Abweichung der PCR von 20%, war dieser Unterschied als signifikant anzusehen.

Weiterhin ist hervorzuheben, dass offensichtlich HeLa-Zellen die Genome effizienter als die NB-K-Zellen replizierten, in NB-K-Zellen aber anscheinend eine bessere Verpackung in Nachkommenviren stattfand.

3.3.3 Untersuchung auf Degradierbarkeit des Parvovirus H-1 Genoms von infizierenden Viren und Nachkommenviren

Da in einzelnen PCRs geringe Mengen an freien Genomen kaum erfassbar waren, wurde nachfolgend der S7 Nuklease-Einfluss auf das Genom von cytosolischen und karyoplasmatischen Viren detaillierter in mindestens 21 Versuchen mit HeLa- und NB-K- Zellen unter Verwendung von H-1 Viren in unterschiedlicher Konzentration untersucht. Die Zellkompartimente wurden durch S7 Nukleaseverdau auf Degradierbarkeit der intrazellulären Virusgenome analysiert. Weil die Infektionsdosen der Versuche ungleich waren, wurden die PCR-Ergebnisse zum Vergleich prozentual umgerechnet, wobei der Wert der unverdauten Ansätze als 100% gesetzt wurde. Die ermittelten intrazellulären Genomkonzentrationen der Nuklease behandelten Viren wurden in zwei Gruppen, infizierende und neusynthetisierte Viren, eingeteilt.

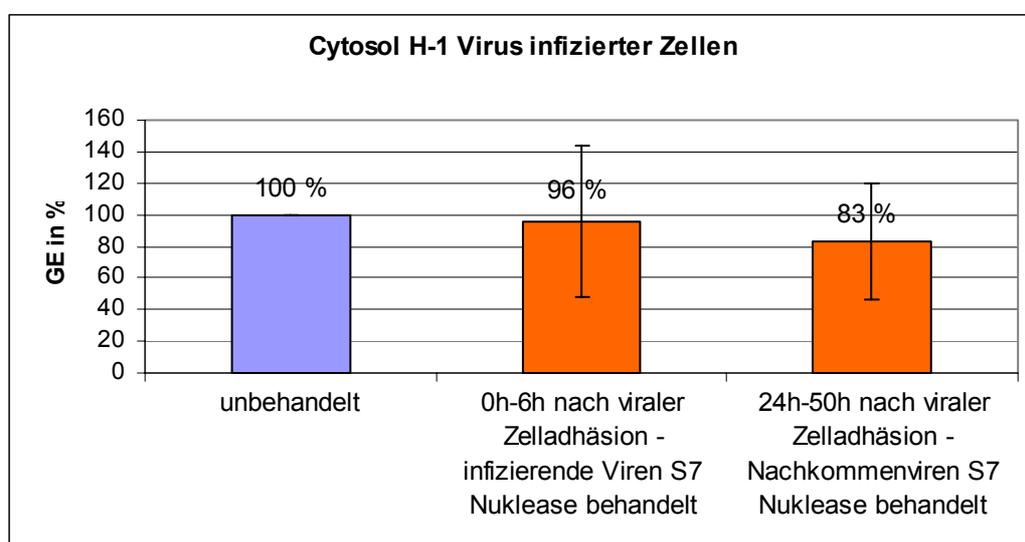


Abb. 40: PCR-Analyse auf Genomfreisetzung cytosolischer H-1 Viren durch S7 Nuklease Behandlung, (HeLa- und NB-K- Zellen)

Es wurden PCR Befunde von 26 unbehandelten und 26 Nuklease behandelten, cytosolischen Virusansätzen ausgewertet, die aus 12 PCR-Durchführungen resultierten. Die Werte der Befunde wurden in % berechnet, wobei der Befund der unverdauten Virusansätze 100% gesetzt wurde. Die Befunde der Nuklease behandelten Ansätze wurden auf zwei Säulen, infizierende Viren und Nachkommenviren, verteilt. Die Mittelwerte sind in Prozent angegeben. Die senkrechten Markierungen über den Säulen geben die Standardabweichung der Messergebnisse der Nuklease verdauten Virusansätze an.

Das Ergebnis weist auf eine mögliche S7 Nuklease-Sensitivität im Cytosol hin, die bei längerer Inkubation zunimmt.

Aus dem Diagramm in Abb. 40 geht hervor, dass nach S7 Nuklease-Verdau von cytosolischen Viren in den ersten 6 h der Infektion im Mittel 96% und nach 1 d bis 2 d 83% der unbehandelten Genome nachweisbar waren. Die Werte liegen im Schwankungsbereich innerhalb der PCR. Das Ergebnis bestätigt hiermit, dass zumindest bis 6 h nach viraler Zelladhäsion im Cytosol keine signifikante Menge an Virus-DNA aus den Capsiden freigesetzt wird.

Nach S7 Nuklease-Verdau von karyoplasmatischen Viren waren bis 6 h nach Virusadhäsion - also vor Einsetzen der Virusneusynthese - im Mittel nur 54% und 1d bis 2d nach Infektion nur 40% der unbehandelten Genome nachweisbar (Abb. 41). Diese Werte liegen außerhalb des

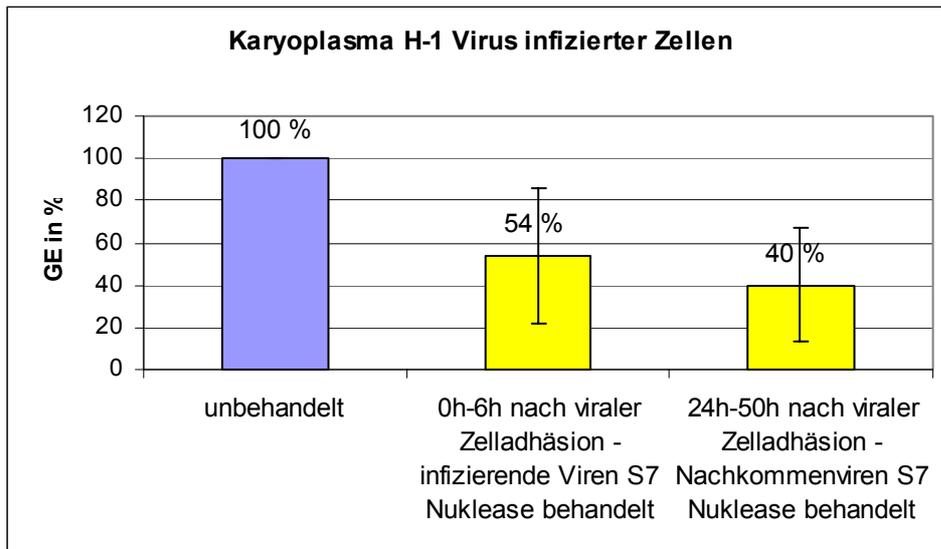


Abb. 41: PCR-Analyse auf Genomfreisetzung karyoplasmatischer H-1 Viren durch S7 Nuklease-Behandlung (HeLa- und NB-K- Zellen)

Es wurden PCR-Befunde von 21 unbehandelten und 21 Nuklease behandelten, karyoplasmatischen Virusansätzen ausgewertet, die aus 10 PCR-Durchführungen resultierten. Die Werte der Befunde wurden in % berechnet, wobei der Befund der unverdauten Virusansätze 100% gesetzt wurde. Die Befunde der Nuklease behandelten Ansätze wurden auf zwei Säulen (infizierende Viren und Nachkommenviren) verteilt. Die Mittelwerte sind in Prozent angegeben. Die senkrechten Markierungen über den Säulen geben die Standardabweichung der Messergebnisse der Nuklease verdauten Virusansätze an.

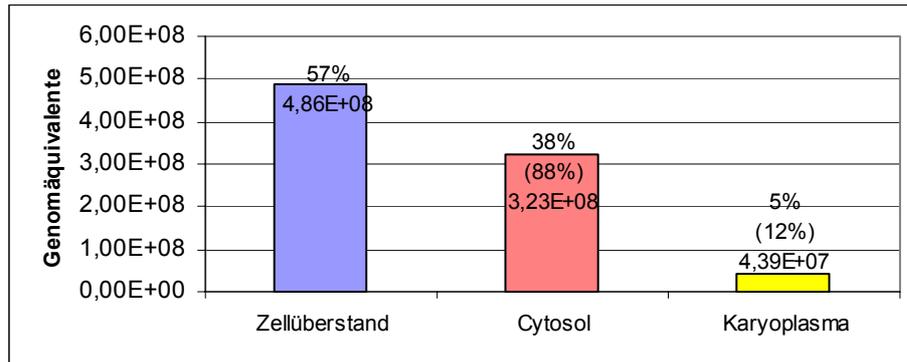
Das Ergebnis zeigt, dass im Zellkern sicher eine S7 Nuklease-Sensitivität besteht. Da in den ersten 6h eine Degradation von Virus-DNA möglich ist, kommt es bereits im Rahmen der Infektion zu einer Genomfreisetzung.

Schwankungsbereiches der intra-Test-Abweichung von 20%. Bereits zu Infektionsbeginn sind karyoplasmatische Virusgenome also durch Nuklease degradierbar. Dieser Genomanteil nahm nach 1 d - 2 d Infektion zu, wobei in allen Ansätzen zu beachten ist, dass bei der Karyoplasmaisolierung auch membrangebundene cytosolische Viren mitisoliert werden.

3.3.4 Analyse der intrazellulären H-1 Genomverteilung

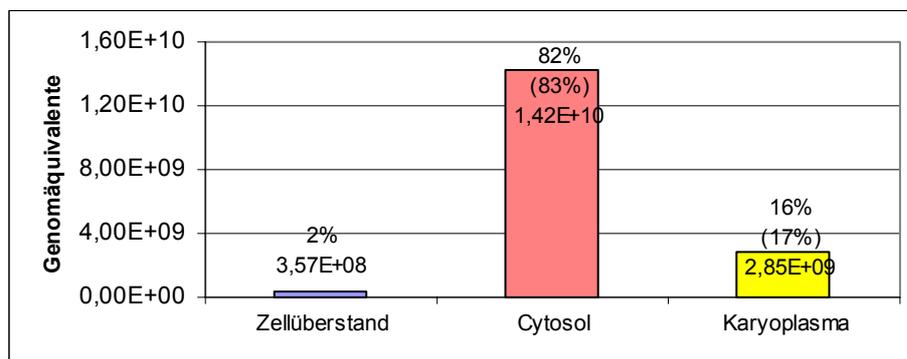
Um zu zeigen, wie viele Virusgenome tatsächlich in den Zellkern gelangten, wurde die Verteilung des H-1 Virus in HeLa-Zellen nach kurzer (1 h) und langer (2 d) Infektionszeit durch PCR-Analyse der Zellkompartimente bestimmt und ist in Abb. 42 prozentual angegeben.

Hierfür wurden HeLa-Zellen mit ca. 10^9 Viren (50 Viren pro Zelle) infiziert. Um die Verteilung infizierender H-1 Viren und Nachkommenviren zu untersuchen, wurde ein Zellansatz für 1 h infiziert, ein zweiter Zellansatz wurde für 2 d infiziert. Nach kurzer und langer Infektionsdauer wurden die Zellkompartimente isoliert.



1 h nach Virusadhäsion

Es wurde ein kleiner Anteil in die Zelle aufgenommen. Bei den nukleären Genomen handelt es sich vermutlich um zellmembrangebundene Viren.



2 d nach Virusadhäsion

Es wurden mehr Viren als 1 h nach Infektion in die Zelle aufgenommen. Die Relation der intrazellulären Virusverteilung blieb nach 2 d Infektion unverändert.

Abb. 42: HeLa-Zellinfektionsbilanz durch PCR-Analyse

Die Prozentzahlen geben die Virusverteilung auf die Zellkompartimente an, Prozentzahlen in Klammern geben die Verteilung von H-1 Genomen intrazellulär an.

Nach kurzzeitiger Infektion (1h) war über die Hälfte der Viren (57%) nicht in die Zellen aufgenommen worden, 38% der Virusgenome befanden sich im Cytosol, 5% im Kern. Nach einer Infektionsdauer von 2 Tagen war der überwiegende Teil der H-1 DNA im Cytosol der Zelle (82%), im Karyoplasma waren 16%, ein geringer Teil (2%) war im Zellüberstand nachzuweisen. Während nach kurzer Infektionszeit der Hauptteil aller infizierenden Viren noch nicht in die Zelle aufgenommen worden ist, sind nach 2 Tagen Infektion überwiegend im Cytosol H-1 Genome nachweisbar. Das Ergebnis entspricht den vorher beschriebenen Infektionskinetiken mit NB-K- und HeLa-Zellen, die beschreiben, dass nach Viruszelladhäsion im Zellüberstand 1/3 - 2/3 der

eingesetzten Viren vorkommen (Abb. 34, Abb. 35, Abb. 37, Abb. 38). Der absolute GE-Gehalt 2 d nach Virusadhäsion hat im Cytosol um das 44-fache zugenommen, im Karyoplasma um das 65-fache. Aufgrund der hohen cytosolischen und karyoplasmatischen Genomzunahme muss es sich um neu synthetisierte Virus-DNA handeln. Das Ergebnis deckt sich mit denen der Infektionskinetik in Abb. 35 und Abb. 38, die eine Neusynthese viraler DNA 26 h nach Virusadhäsion beschreiben.

Wird nur der Virusgenomgehalt in der Zelle ohne Berücksichtigung des Zellüberstandes analysiert, sind 1 h nach Virusadhäsion im Cytosol ca. 88%, im Karyoplasma ca. 12% nachzuweisen, nach 2 d sind es 83% im Cytosol und 17% im Karyoplasma (Abb. 42). Das Genomverhältnis vom Cytosol gegenüber dem Karyoplasma änderte sich nach 2 d Infektion nicht.

3.3.5 Zusammenfassung der Infektionskinetiken

Zusammenfassend wird gezeigt, dass sich bis zu 5 - 6 h nach viraler Zelladhäsion nur infizierende Viren in der Zelle befinden. 8 h nach viraler Zelladhäsion sind bereits mehr als 50% neu synthetisierte Viren in der Zelle, wie es die Infektionskinetik mit NB-K-Zellen in Abb. 35 beschreibt. Das Zeitintervall, in dem es nicht zu einer Überlappung mit Nachkommenviren kommt, beträgt daher ab Infektionsbeginn ca. 6 h. Während dieser Zeit kommt es zumindest beim Hauptteil der Capside nicht zu einer viralen Genomfreisetzung, wie es Untersuchungen auf Degradierbarkeit von intrazellulärer Virus-DNA durch S7 Nuklease in Abb. 40 zeigen. Nach 8 h kam es zu einer leichten Amplifikation, die nach 26 h massiv zunahm. Intrazellulär kommt es nach 1 - 2 d zu einer ca. 50-fachen Genomzunahme, wie es durch Infektion von NB-K- (Abb. 35) und HeLa-Zellen (Abb. 42) dargestellt wird. Im Gegensatz zur Infektion mit NB-K- Zellen konnte bei Infektion von HeLa-Zellen mit zunehmender Amplifikation eine Zunahme der S7 Nukleasesensibilität als Ausdruck einer Genomfreisetzung beobachtet werden. In NB-K-Zellen findet vermutlich eine bessere Verpackung der Genome in Nachkommenviren statt. Daher sind HeLa-Zellen zur Untersuchung der Virusaufnahme besser geeignet.

Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass stets nur ein geringer Anteil von ca. 10% aller Virusgenome im Kern gefunden wurde, sowohl kurz nach Virusadhäsion wie auch nach 2 d Infektion (Abb. 42). Für CPV ist ein langsamer Entpackungsvorgang des Virus beschrieben worden (Parker and Parrish 2000; Vihinen-Ranta, Yuan et al. 2000; Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002). Nur ca. 15 % aller infizierenden Viruscapside geht in das Karyoplasma über. Der Rest scheint im Cytosol am weiteren Kerntransport blockiert zu sein. Durch Blockierung der Endozytose während der ganzen Zelladhäsionszeit wurden innerhalb 26 h Infektion ca. 3,5 - 5 mal weniger Viren produziert im Vergleich zur Virusneusynthese unter Adhäsionsbedingungen mit zeitlich begrenzter Endozytoseinhibition. Dies weist auf eine Rezeptor-limitierte Aufnahme des H-1 Virus hin, wie sie für andere Parvoviren bekannt ist (Parrish 1990; Brown, Anderson et al. 1993).

3.4 Charakterisierung der viralen genomhaltigen Komponenten während der Aufnahme in die Zelle

Während der Infektion müssen Viren Barrieren überwinden, um ihr Genom in die geeignete Zellregion zur Replikation freizugeben. Parvoviren werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und erfordern einen niedrigen pH für Viruspenetration und produktive Infektion (Parker and Parrish 2000). Es ist wenig bekannt, wie Parvoviren aus den Endosomen ins Cytoplasma übergehen und wie ihr Genom vor der Replikation in den Zellkern gelangt.

Es wurde deshalb versucht, das Aufnahmeverhalten des H-1 Virus zu charakterisieren. Dies erfolgte im Infektionsversuch mit HeLa-Zellen, da letztere zur Untersuchung des parvoviralen Aufnahmeprozesses geeignet waren, wie vorherige Untersuchungen zeigten. Es wurden zunächst die genomhaltigen Komponenten des Virus während der Zellaufnahme durch Dichtegradientenzentrifugation untersucht. Drei Ansätze mit ca. 2×10^7 HeLa-Zellen wurden vorbereitet. Zwei Zellansätze wurden mit 450 H-1 Viren pro Zelle infiziert, wobei ein Zellansatz vor der Infektion mit NH_4Cl vorbehandelt wurde. NH_4Cl inhibiert eine Infektion mit Parvoviren, indem die essentielle endosomale Ansäuerung unterdrückt wird. Der dritte Zellansatz blieb ohne Infektion. Zur Infektion wurden im CsCl -Gradient aufgereinigte Viren verwendet.

Durch die vorherigen Untersuchungen konnte an HeLa- und NB-K-Zellen gezeigt werden, dass es erst später als 5 h - 6 h nach viraler Zelladhäsion zu einer signifikanten Neusynthese von Viren kommt. Um nur die infizierenden Viren zu untersuchen, wurden die Zellkompartimente, Cytosol und Karyoplasma, 2 h nach Virusadhäsion isoliert. Das Cytosol der Zellen wurde - wie in den vorherigen Versuchen - durch Permeabilisierung der Zellmembran mit Digitonin gewonnen. Anschließend wurden die verbleibenden Zellkerne mit Tx100 behandelt und Karyoplasma von Tx unlöslichen Bestandteilen durch Abzentrifugation voneinander getrennt.

3.4.1 Untersuchung von H-1 Virus und H-1 Genom im Sucrosegradienten

Bevor die Zellkompartimente durch Sucrosegradientenzentrifugation untersucht wurden, wurden erst H-1 Viren und proteinfreie H-1 DNA zum Dichte-Vergleich auf einem Sucrose Gradienten (15-60%) aufgetrennt. Die geernteten 25 Fraktionen wurden zum DNA-Nachweis mit der PCR durch Proteinase K Verdau aufgereinigt. Das quantitative Ergebnis der Analyse ist in Abb. 43 dargestellt und zeigt, dass die Viren bei einer Dichte von 29,5 - 37% bandieren (Abb. 43).

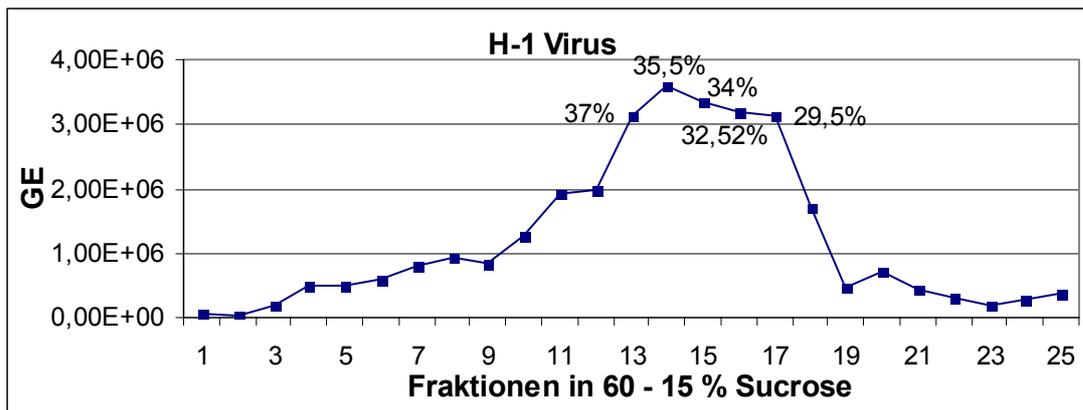


Abb. 43: PCR-Analyse eines Sucrose Gradienten vom HeLa-Zellüberstand 2 d nach Virusadhäsion
Dichteangabe in %, liegt für H-1 Virus bei 29,5 – 37%, es migriert schneller als H-1 DNA

Ein paralleler Versuch mit proteinfreier H-1 DNA (Abb. 44) zeigte eine Migration der DNA bis zu einer Sucrosedichte von 28,5 - 34,5% an.

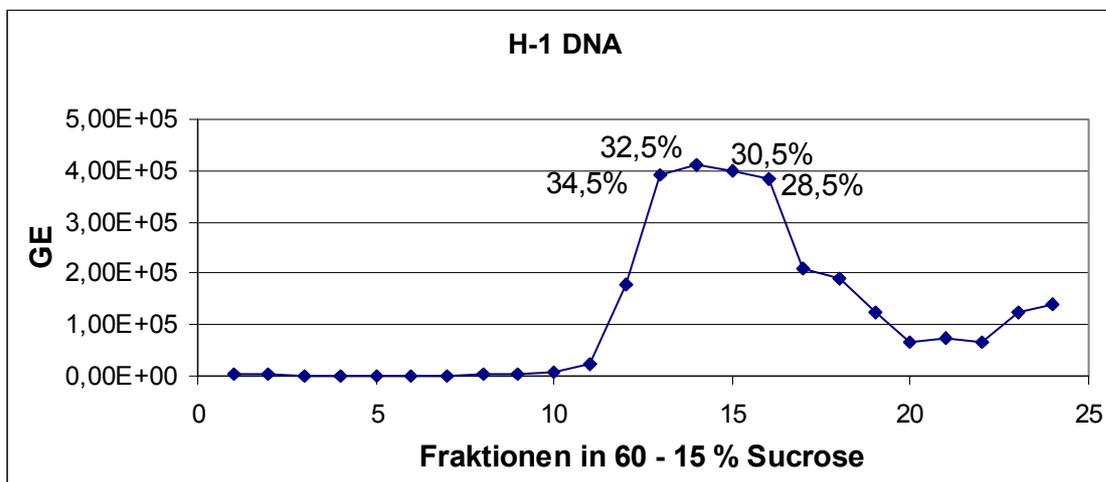


Abb. 44: H-1 Genom Standardgradient in Sucrose
Dichteangabe in %, liegt für H-1 Genom bei 28,5 – 34,5%

3.4.2 Untersuchung der viralen genomhaltigen Komponenten im Sucrose-Gradienten

Die isolierten Zellkompartimente wurden analog aufgetrennt aber - aufgrund der hohen Schwankungsbreite im Dot Blot analysiert (Abb. 46), jedoch wurde zuvor analysiert, ob das Viruscapsid während des Infektionsvorganges im Rahmen der Ansäuerung prozessiert wird. Als Kontrolle diente hierbei - neben uninfizierten Zellen - eine Infektion in Gegenwart von NH_4Cl , welches die Acidifizierung in den Endosomen unterbindet.

Der Immunblot in Abb. 45 zeigt die Auftrennung des H-1 infizierten HeLa-Cytosol in 2 Banden. Es handelt sich hier um die zwei Formen des Capsid Proteins VP2. VP3 mit einer Größe von 65 kD ist ein proteolytisches Abspaltungsprodukt von VP2 mit einer Größe von 68 kD (Paradiso 1981). Die Abspaltung von VP2 in VP3 geschieht nur in DNA-haltigen Viruspartikeln. Der Immunblot belegt, dass NH₄Cl oder die endsomale Ansäuerung kein Einfluss auf das VP2 des H-1 Virus-Capsid haben.

Die anschließenden Dot Blots der cytoplasmatischen und karyoplasmatischen Sucrosegradient-Fractionen (Abb. 46, Abb. 47 a) + b)) zeigten, dass H-1 DNA im infizierten Cytosol (Abb. 47 a) in einen Dichtebereich von 31 % – 47 % sedimentierte, wobei der "Peak" bei 41,5 % lag. Im cytosolischen Gradienten der NH₄Cl vorbehandelten Zellen wurde Virus-DNA im Dichtebereich von 30,75 % - 47 % nachgewiesen, jedoch in geringerer Konzentration. Der "Peak" lag auch bei 41,5 %.

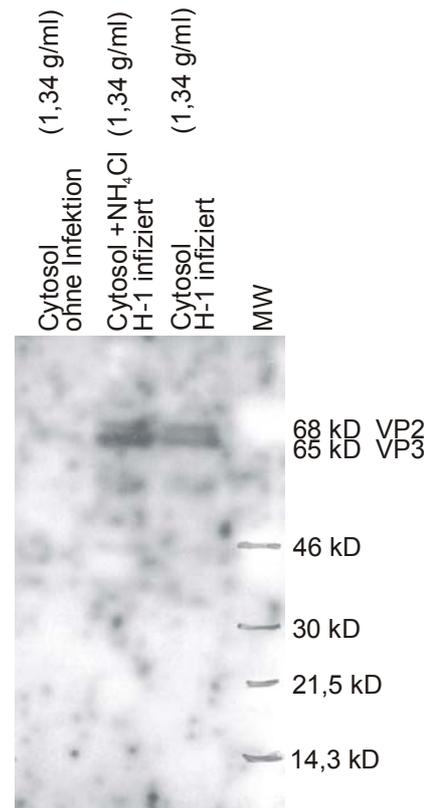


Abb. 45: Immunblot von cytosolischen CsCl Fractionen mit einem anti H-1 Capsid AK
Die Dichte in CsCl ist in [g/ml] angegeben. NH₄Cl führt zu keiner Prozessierung des Capsidproteins

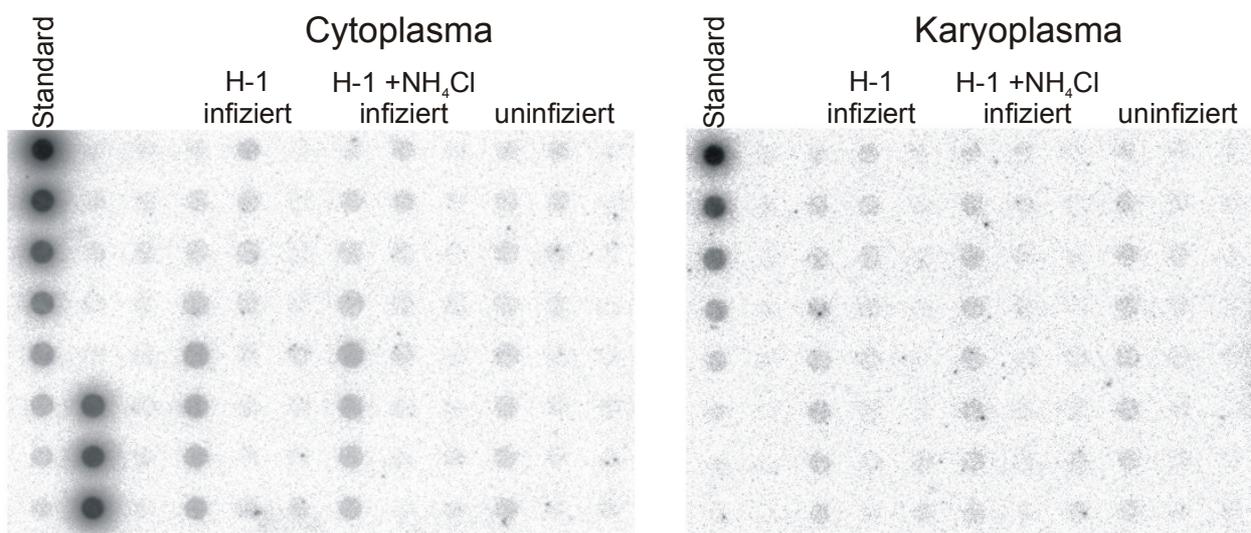
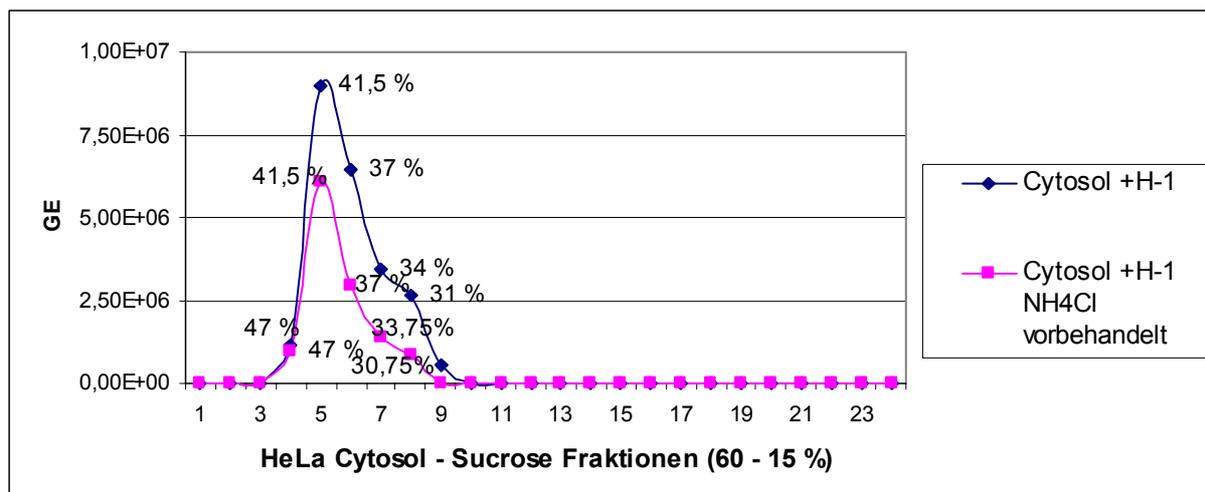
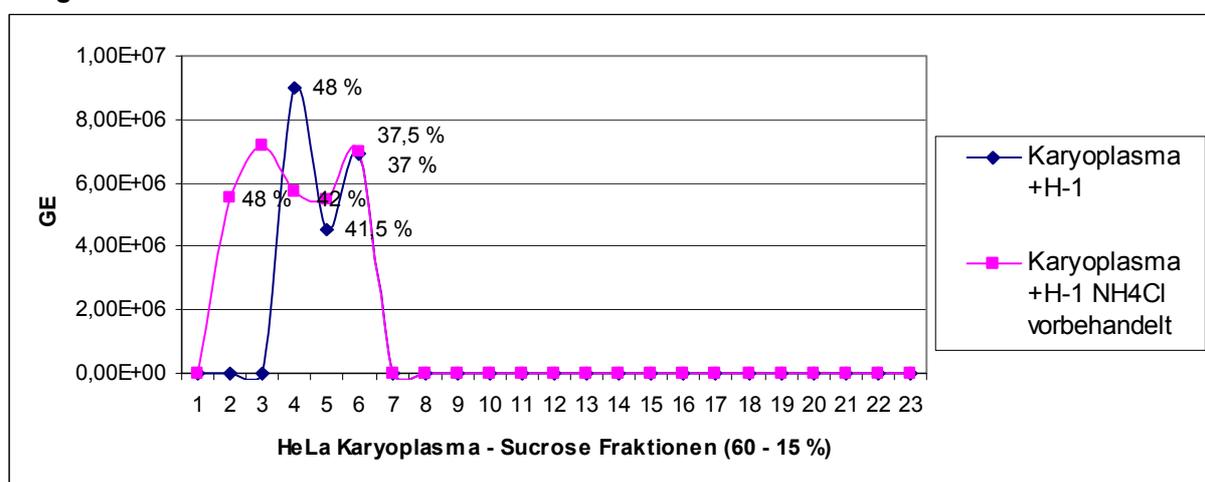


Abb. 46: Dot Blot Hybridisierung der Sucrosegradient-Fractionen



a) Sucrose Gradient vom HeLa-Cytosol 2 h nach viraler Zelladhäsion
Dichteangabe in %, liegt für cytosolische H-1 DNA bei ~41,5%, migriert schneller als H-1 Virus möglicherweise durch Assoziation mit zellulären Bestandteilen.



b) Sucrose Gradient vom HeLa-Karyoplasma 2 h nach viraler Zelladhäsion
Dichteangabe in %, liegt für nukleäre H-1 DNA bei 37% und 48%, migriert somit teilweise schneller als cytosolische H-1 DNA und ist weder Virus noch nackte H-1 DNA, möglicherweise liegt ein Protein-DNA Komplex vor.

Abb. 47: Quantitative Auswertung der Dot Blots, Dichteangabe in %

Da cytosolische H-1 DNA schneller als H-1 Virus (29,5 – 37%, Peak bei 35,5 %, Abb. 43) migriert, ist eine Assoziation zu zellulären Bestandteilen anzunehmen, wobei eine Bindung an Mikrotubuli oder Endosomen möglich erscheint. Die Dichte von Endosomen in Sucrose liegt jedoch nur bei ~ 35,5 % (Fuchs, Ellinger et al. 1994; Enrich, Pol et al. 1999)(Rickwood, D.; Evans, W.H. 1978), so dass eher eine geringere Dichte zu erwarten gewesen wäre.

Im HeLa-Karyoplasma - oder Membran-assoziiert - (Abb. 47 b) bandierte H-1 Virus bei zwei Dichtepeaks von 37% und 48 %, während im Kern NH₄Cl vorbehandelter Zellen Virus-DNA im gleichen Dichtebereich zwischen 37,5 % und 48 % nachgewiesen wurde. Letzterer Dichtepeak liegt weder im Bereich von H-1 Virus (29,5% - 37%) noch von nackter H-1 DNA (28,5 – 24,5%), so dass eventuell ein Protein-DNA-Komplex vorliegt.

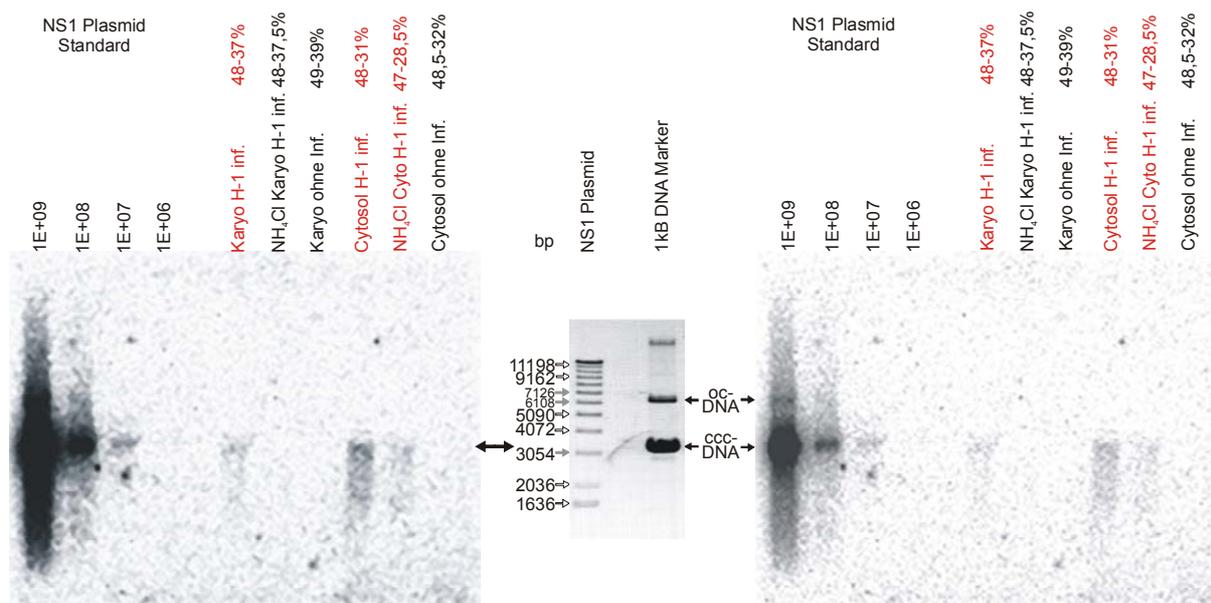


Abb. 48:

Southern Blot-Hybridisierung von cytosolischen und karyoplasmatischen Sucrosegradient Fraktionen und Darstellung des NS1 Plasmid im Ethidium Bromid gefärbten Agarosegel, Isolation der Zellkompartimente 2 h nach Virusadhäsion

Die Sucroседichten sind in % angegeben. H-1 genomhaltige Fraktionen sind in Rot beschriftet. In der Mitte ist die Auftrennung des NS1 Plasmid und eines 1 kB DNA-Markers im Ethidium Bromid gefärbten Agarosegel abgebildet. Im rechten Southern Blot sind ccc-DNA und oc-DNA der NS1 Plasmid Standardverdunnungsreihe dargestellt, die eine Größe von ca. 6600 bp und 3300 bp haben. Der linke Blot ist stärker kontrastiert. Das Einzelstrang-DNA-Genom des Virus mit einem Doppelpfeil markiert kommt besser zu Darstellung. Dieses wandert im elektrischen Feld des Agarosegels wie eine lineare doppelsträngige Nukleinsäure mit einer Größe von ca. 3300 bp Länge.

In Gegenwart von NH_4Cl konnte keine nukleäre Virus-DNA nachgewiesen werden, da eine Infektion durch NH_4Cl unterbunden wurde. In Gegenwart von NH_4Cl wurde weniger cytoplasmatisches Virusgenom nachgewiesen, da das Rezeptor-„shuttling“ durch NH_4Cl vermutlich reduziert wurde.

Aufgrund relativ hoher unspezifischer Hintergrundsignale im Dot Blot, wurden die Dot Blot positiven und negativen Fraktionen mit ähnlicher Dichte durch Southern Blot-Hybridisierung überprüft. Die DNA-Aufreinigung der Ansätze für den Southern Blot erfolgte durch Proteinase K-Verdau.

Auf dem Southern Blot (Abb. 48) ist die Auftrennung der Plasmid NS1 Standardreihe in 2 Hauptbanden entsprechend der ccc- und oc-Form des Plasmid dargestellt. Der Southern Blot zeigt den H-1 DNA-Nachweis im Cytosol unbehandelter Zellen im Dichtebereich von 48 - 31%. Ein schwächeres Signal durch H-1 DNA im Dichtebereich von 47 - 28,5% ist im Cytosol von NH_4Cl vorbehandelten Zellen erkennbar. Dies bestätigt die Rezeptor-limitierte Aufnahme des H-1 Virus. Der Dichtepack im Cytosol unbehandelter wie auch NH_4Cl vorbehandelter Zellen lag dem Dot Blot zufolge bei 41,5 % (Abb. 47 a). Im Unterschied zum Dot Blot zeigt der Southern Blot, dass karyoplasmatische H-1 DNA nur in infizierten unbehandelten Zellen im Dichtebereich von 48-37% in Sucrose nachweisbar ist.

Bemerkenswerterweise konnte im Southern Blot keine H-1 DNA in den karyoplasmatischen Fraktionen der NH_4Cl behandelten Zellen nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass

die Ansäuerung einen Einfluss auf das Entkommen der Viren aus den Endosomen hat, oder eine Umfaltung bewirkt, die den nukleären Import des Virusgenoms erst ermöglicht.

Die Quantifizierung der Signale in Abb. 49 ergibt, dass ca. 80% der Genome im Cytosol gefunden wurden, während es im Kern ca. 20% waren. Diese intrazelluläre Genomverteilung

deckt sich mit dem Ergebnis der Infektion in Abb. 42, dem zufolge ca. 15% der intrazellulären Genome in den Zellkern gelangten, sowohl nach 1 h wie auch nach 2 d Infektionsdauer. In NH_4Cl

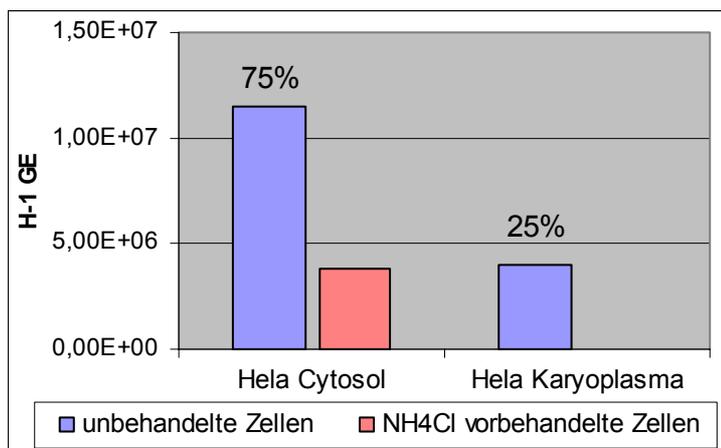


Abb. 49: Quantifizierung des Southern Blot

Das GE Verhältnis von unbehandelten Cytosol und Karyoplasma ist in % angegeben

Durch NH_4Cl wurde eine Infektion inhibiert, sodass auch keine nukleären Genome nachgewiesen werden konnten. Durch Reduktion des Rezeptor-„shuttlings“ in Gegenwart von NH_4Cl wurden weniger cytosolische Genome nachgewiesen

vorbehandelten Zellen wurde die virale Genomaufnahme um das 3-fache reduziert (Abb. 49). Wie schon in den Infektionskinetiken der NB-K- (Abb. 35+Abb. 36) und HeLa-Zellen (Abb. 38+Abb. 39) über PCR-Analyse dargestellt wurde, sind nach 26 h Infektion 3,5 bis 5 mal weniger Virusgenome nachzuweisen, wenn die Endozytose bzw. das Rezeptor-Recycling während der viralen Zelladhäsion inhibiert wird.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass ca. 3-mal mehr H-1 Viren in unbehandelte Zellen aufgenommen werden als in NH_4Cl vorbehandelte Zellen. Wahrscheinlich führt NH_4Cl -Behandlung zu einer Blockade des pH-abhängigen Rezeptor-Recycling, die die Aufnahme von Viren reduziert. Karyoplasmatische H-1 DNA ist nur in unbehandelten Zellen nachzuweisen, wie durch Southern Blot-Hybridisierung in Abb. 48 erkennbar ist. NH_4Cl , das die Ansäuerung der Endosomen inhibiert, unterdrückt nicht vollständig die cytoplasmatische Aufnahme von genomhaltigen Capsiden, jedoch wird eine nukleäre Aufnahme verhindert. Dieser Vorgang ist im Einklang mit der Literatur, als dass die Ansäuerung der Endosomen für eine produktive Infektion essentiell ist, wie es für das CPV und AAV beschrieben ist (Basak and Turner 1992; Vihinen-Ranta, Kalela et al. 1998; Bartlett, Wilcher et al. 2000; Douar, Poulard et al. 2001).

3.4.3 Untersuchung der Parvovirus H-1 Infektiösität in Gegenwart von Bafilomycin A₁ und Nystatin

Zur Überprüfung, ob die NH₄Cl-bedingte Inhibition tatsächlich auf das Unterbinden der Ansäuerung in den Endosomen und nicht auf unspezifische Effekte zurückzuführen ist, wurde eine H-1 Virusinfektion in Gegenwart von 100 nM Bafilomycin A₁ durchgeführt. Bafilomycin ist ein spezifischer Inhibitor vakuolärer H⁺-ATPasen, die einen niedrigen pH in endozytotischen und exozytotischen Kompartimenten bewirken. Weil sich HeLa-Zellen in Gegenwart von Bafilomycin von der Zellplatte lösten, wurden zur Infektion NB-K-Zellen eingesetzt.

Die Infektion wurde mit ca. 1000 Viren pro Zelle in abnehmender geometrischer Verdünnung durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein uninfizierter Zellansatz mit und ohne Bafilomycinzusatz mitgeführt. Nach 2 d Infektionsdauer wurden die Zellen auf Zellyse als Zeichen einer erfolgreichen Infektion untersucht und fotografiert.

Da es keine detaillierte Beschreibung des Aufnahmeweges von Parvovirus H-1 gibt, wurde zusätzlich eine Zellinfektion mit und ohne Zusatz von Nystatin ad 25 µg/ml durchgeführt. Nystatin ist eine sterolbindende Substanz und unterbricht selektiv die Cholesterol-reiche und Caveolae-haltige Membran Mikrodomän und stört dadurch die Caveolaeformation (Rothberg, Heuser et al. 1992). Nystatin hat keinen Einfluss auf die Clathrin-vermittelte Endozytose. Es sollte damit untersucht werden, ob die H-1-Infektiösität neben der Inhibition des Endozytoseweges über „Clathrin Coated Vesicles“ auch durch Inhibition der Caveolae unterdrückt werden kann.

Abb. 50 zeigt in der linken Reihe die Infektion von unbehandelten NB-K-Zellen in abnehmender Konzentration. Die Zellen, die mit 1000 Viren pro Zelle infiziert wurden, lysierten vollständig. Die Zellen, die mit 100 Viren pro Zelle infiziert wurden, lysierten zu ca. 50 %, die Zellen, die mit 10 Viren pro Zelle infiziert wurden, zeigten kaum lytische Zellen. Dem gegenüber zeigten alle uninfizierten und infizierten Zellen in Gegenwart von Bafilomycin, in der mittleren Reihe abgebildet, keine Zellyse und keinen Unterschied in ihrer Morphologie. Eine Zellyse ähnlich der unbehandelter infizierter Zellen wurde durch Bafilomycinzusatz ad 100 nM verhindert. Die Zellen in Bafilomycin hatten im Vergleich zu den uninfizierten, unbehandelten Zellen einen aufgelockerten Zellverband, der möglicherweise auf das DMSO zurückzuführen war, in dem das Bafilomycin gelöst wurde.

Die rechte Reihe zeigt die infizierten Zellen in Gegenwart von Nystatin. Die Zellen unterschieden sich in ihrer Morphologie nicht von den infizierten unbehandelten Zellen, wie sie in der linken Reihe abgebildet sind. Die Infektion von Nystatin behandelten Zellen mit 1000 Viren pro Zelle führte zur vollständigen Zellyse. Die Infektion von 100 Viren pro Zelle führte zur geringer ausgeprägten Lyse. Bei Infektion mit 10 Viren pro Zelle stellte sich kaum eine Lyse von Zellen ein. Uninfizierte NB-K-Zellen wurden nicht sichtbar durch Nystatin beeinflusst. Nystatin hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Infektiosität des Parvovirus H-1.

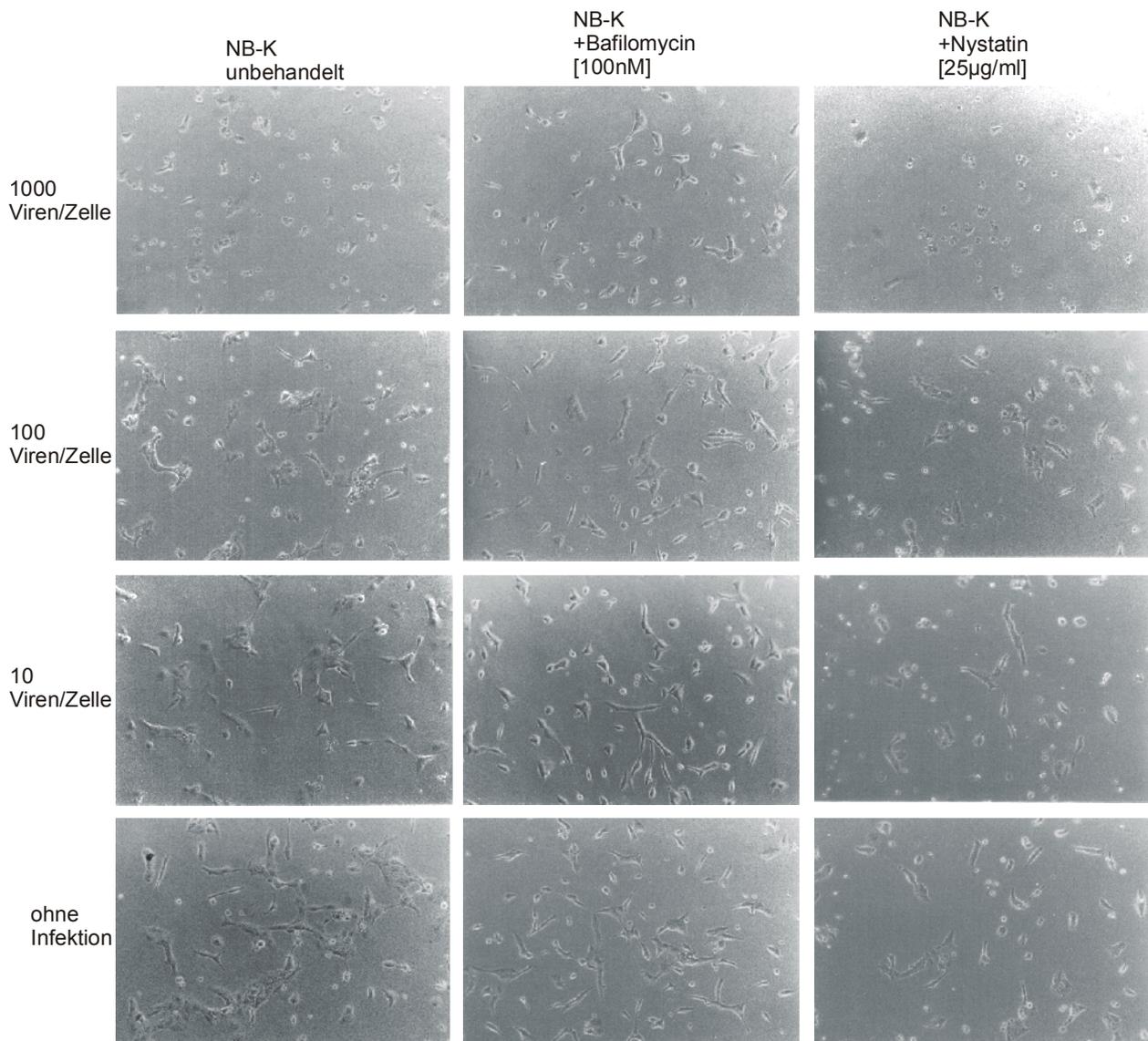


Abb. 50: H-1 Infektion von NB-K-Zellen unter verschiedenen Bedingungen

Die Zellen wurden ca. 2 d nach Infektion photographiert.

linke Reihe: H-1 Infektion von unbehandelten NB-K-Zellen

mittlere Reihe: H-1 Infektion in Gegenwart von Bafilomycin A1 ad 100 nM

rechte Reihe: H-1 Infektion in Gegenwart von Nystatin [25 µg/ml]

In Gegenwart von Bafilomycin konnte eine Zellyse verhindert werden. Das Ergebnis bestätigt den Endozytose-vermittelten Aufnahmepfad des H-1 Virus. Der aufgelockerte Zellverband in Gegenwart von Nystatin ist auf DMSO zurückzuführen, in dem die Substanz gelöst wurde

3.4.4 Immunfluoreszenzuntersuchung von H-1 Capsiden während der Infektion

Da anscheinend nur ein geringer Anteil von ca. 10 - 20 % der Virusgenome, die in die Zelle eingedrungen waren, in das Karyoplasma gelangte (Abb. 42 und Abb. 49), sollte der Hauptteil der Capside untersucht werden. Hierzu wurde - um H-1 Capsid-Proteine während des Infektionsvorganges direkt zu untersuchen - die Lokalisation von genomhaltigen Viren in HeLa-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert.

Mit der Methode der konfokalen Laser-Scan Mikroskopie konnten die H-1 Capside und Zellkerne nach indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden, wobei eine Mindestanzahl an Capsiden notwendig war, um sichtbar zu werden. Damit ließ sich visuell darstellen, ob Capsid-Proteine das Cytoplasma und den Zellkern erreichten.

Hierzu wurden HeLa-Zellen mit aufgereinigten vollen, DNA-haltigen, H-1 Viruspartikeln infiziert. Als Kontrolle wurden Zellansätze durchgeführt, in denen der Capsid-AK separat zugesetzt wurde. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden die Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 51 dargestellt. In der oberen Bildreihe ist in Grün die spezifische Immunfärbung der H-1 Capside erkennbar. Die Kontrollanfärbung des Kernporen-Komplexes ist in der mittleren Bildreihe in Rot dargestellt. Die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle ist in der unteren Bildreihe zu sehen.

Bindung und Aufnahme von Parvovirus H-1

(vorinkubiert mit einem anti-Capsid AK)

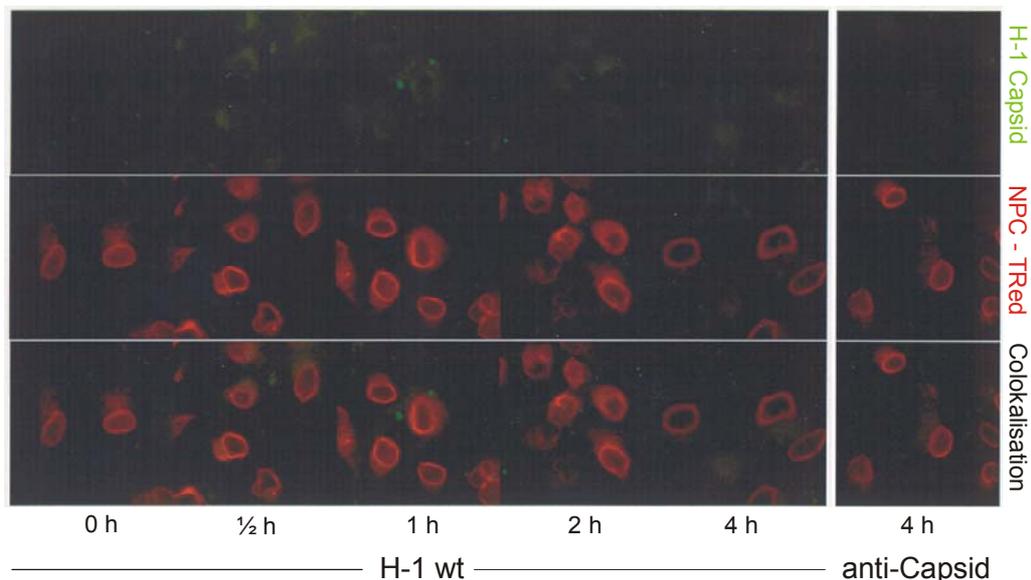


Abb. 51: Immunfluoreszenz

obere Reihe: H-1 Capsid-spezifische Immunfluoreszenz in Grün

mittlere Reihe: Kernporen-spezifische Immunfluoreszenz in Rot

untere Reihe: Colokalisation beider Fluoreszenzen in Gelb (schwach)

Es konnten keine Capside im Zellkern sichtbar nachgewiesen werden, was für eine vorherige Freisetzung des Virusgenoms spricht.

Es ist erkennbar, dass angehäufte Mengen von vollen Capsiden im Cytoplasma zu finden sind, die überwiegend perinukleär lokalisiert sind. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine sichtbare Menge von Viruscapsiden oder Capsid-Proteinen im Kern beobachtet werden.

Das Ergebnis ist mit den vorherigen Ergebnissen der Gradienten-Zentrifugation deckungsgleich, die im Cytoplasma Protein-assoziierte Genome beschreiben. Im Zellkern wurden keine Capside sichtbar, obwohl nach Sucrosegradientenzentrifugation des Karyoplasmas infizierter Zellen Protein-assoziierte Virusgenome nachzuweisen waren, die jedoch nur ca. 10 - 20 % der gesamten intrazellulären Virus-DNA repräsentierten. Dieser Anteil an Capsiden hätte jedoch durch die Immunfluoreszenz sichtbar werden müssen. Die Beobachtung spricht daher für eine vorherige Freisetzung des viralen Genoms. Aufgrund dieser Beobachtung lokalisierten die nukleären Virusgenome in den ersten 4 h p. i. wahrscheinlich mehr an der cytosolischen Seite der Kernmembran. Es kann aufgrund der Immunfluoreszenz in Abb. 51 nicht ausgeschlossen werden, dass bis 4 h p. i. Viruscapside im Zellkern vorliegen, weil erst eine Mindestanzahl an markierten Capsiden zur Darstellung kommt.

4. Diskussion

4.1 Nachweismethoden der Parvovirus H-1 DNA

In der vorliegenden Arbeit sollte die Freisetzung parvoviraler Genome im Rahmen des Infektionsprozesses untersucht werden. Daher wurden zunächst die verschiedenen Nachweismethoden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit und Schwankungsbreite evaluiert, um die zu dem jeweiligen Versuch am besten geeignete einzusetzen.

Als Methoden wurden die Hybridisierung nach Dot Blot oder Southern Blot, sowie die PCR untersucht. Die Hybridisierungen erfolgten mit einer radioaktiven Sonde, um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erzielen. Im Einzelnen zeigte sich beim Dot Blot eine Nachweisgrenze von im Mittel $3,8 \times 10^6$ GE, wohingegen die Hybridisierung nach Southern Blot geringfügig insensiver mit ca. 6×10^6 GE war. Der vergleichsweise weniger aufwendige Dot Blot zeigte bei wiederholten Auswertungen allerdings eine höhere Schwankungsbreite von 2,5%, gegenüber 1% beim Southern Blot, und war zudem durch die unspezifische Hybridisierung zellulärer Nukleinsäuren in seiner Anwendung auf gereinigte Viruspräparationen limitiert.

Für die PCR wurden zwei H-1 spezifische Oligonukleotid-Primer (Besselsen, Besch-Williford et al. 1995) verwendet. Der Einsatz von zwei H-1 spezifischen Hybridisierungssonden erlaubte die Durchführung als real time PCR im „Light Cycler“. In der PCR konnten DNA-Konzentrationen nachgewiesen werden, die 10^4 -fach unterhalb der Nachweisgrenzen des Dot Blot und Southern Blot lagen. Die Parvovirus H-1 real time PCR unterlag einer intra-Test Abweichung von 20% um den gemessenen Wert. Es bestand jedoch eine relativ hohe inter-Test Abweichung von 90%, so dass ein Vergleich zwischen verschiedenen PCR-Läufen nur statistisch zu erfassen war. Auf der anderen Seite war die real-time-PCR spezifisch, sensitiv und universell einsetzbar. Die geringe Nachweisgrenze erlaubte einen materialsparenden Einsatz von Proben und Virus-DNA-Nachweis in Versuchen, in denen ein hoher Verlust von Virusgenomen zu erwarten war. Von Vorteil war auch die schnelle Durchführung und gleichzeitige Quantifizierung der eingesetzten Proben. Da allerdings nur ein Teil des Virusgenoms - die amplifizierte Region - nachgewiesen wurde, war zur Bestätigung des PCR-Ergebnisses eine Southern Blot Hybridisierung notwendig, die die Virus-DNA in gesamter Länge nachweisen konnte.

4.2 Charakterisierung des H-1 Virus

Parvoviren müssen im Rahmen einer Infektion verschiedene Modifikationen durchlaufen. Dies ist schon durch die Notwendigkeit der Säure-Exposition zur produktiven Infektion impliziert (Basak and Turner 1992; Bartlett, Wilcher et al. 2000; Parker and Parrish 2000; Hansen, Qing et al. 2001), wie sie auch für z.B. Adenoviren gegeben ist (Varga, Weibull et al. 1991; Whittaker, Kann et al. 2000). Desweiteren ist offensichtlich, dass zu einem definierten Zeitpunkt das virale Genom aus dem Capsid freigesetzt werden muss, schon um die Replikation und Transkription des Genoms zu erlauben. Parvovirus-spezifisch hingegen ist die Abspaltung des NS1-Proteins.

Um Änderungen des H-1 Virus während früher Schritte der Infektion untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst das H-1 Virus näher charakterisiert. Da ein entscheidender Analyseparameter die Freilegung des Virusgenoms war, wurde insbesondere untersucht, ob die Capsidstruktur in aufgereinigten Viren möglicherweise schon aufgelockert ist und schon vor der Infektion eine Exposition des Virusgenoms vorlag. Obwohl Parvoviren gegenüber Umwelteinflüssen sehr stabil sind, erschien eine derartige Änderung nicht ausgeschlossen, da die Viren zuvor in einer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt worden waren. Dabei sind die Viren ~3 M hoher Konzentration an Salz ausgesetzt, so dass eine chaotrope Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann. Ähnliche Phänomene sind z.B. für das Capsid des Hepatitis B Virus beschrieben (Bischof 1999). Daher wurde die Sensibilität von aufgereinigten (vollen, DNA-haltigen Capsiden) und unaufgereinigten H-1 Viren durch Behandlung mit S7 Nuklease untersucht.

Der Literatur zufolge ist maximal ein Anteil von 0,5 % der Parvoviruspartikel infektiös, ohne dass jedoch bekannt ist, ob dies eine intrinsische Eigenschaft der Viren darstellt, oder ob ein Prozess während der Infektion ineffektiv abläuft. Damit musste gerechnet werden, dass nur ein geringer Teil der aufgenommenen Viren z.B. den Zellkern erreicht, so dass eine möglichst sensitive Nachweisteknik ggf. benötigt wurde, um z.B. freigesetzte Genome nachzuweisen. Daher wurde zur Bestimmung des Genomgehalts nach S7 Nukleasebehandlung zunächst die PCR als Nachweismethode gewählt. Um auch einen geringen Anteil Nuklease-sensitiver Genome nachweisen zu können, der aufgrund der Schwankungen individueller PCRs nicht sicher hätte identifiziert werden können, wurde eine statistische Auswertung von 73 PCRs mit dem T-Test durchgeführt. Hier ergab sich kein Einfluss des Nukleaseverdau, anscheinend daraufhindeutend, dass alle H-1 Genome in den Ansätzen innerhalb der Viruscapside geschützt vorlagen.

Auf der anderen Seite war die Aussagekraft dieser Untersuchungen zum einen durch die hohe Schwankungsbreite der PCR limitiert, zum anderen konnte nur die 3' nahe Region des H-1 Genoms nachgewiesen werden. Eine Degradation eines Genomteils außerhalb der amplifizierten Region, z.B. eine partielle Exposition des H-1 Genoms aus dem Capsid wäre im PCR-Nachweis verborgen geblieben. Um eine derartige Degradation auszuschließen, wurden die Ergebnisse durch Southern Blot Hybridisierung mit Hilfe eines Plasmids des H-1 Genoms untersucht, wobei keine Degradation des Genoms durch Nukleaseverdau beobachtet werden konnte.

Für die Parvoviren MVM, CPV und AAV2 ist bekannt, dass deren NS1 Protein außerhalb des Virus-Capsid lokalisiert ist, wobei es kovalent an das 5' Ende des Genoms gebunden vorliegt. (Cotmore and Tattersall 1988; Prasad and Trempe 1995; Wang and Parrish 1999). Bei diesen Viren wird die Verbindung zum NS1 Protein über 20 bis 30 Nukleotide hergestellt, die außerhalb des Capsid exponiert werden. Für das MVM z.B. ist ein NS1 Protein-assoziiertes (s1) DNA-

Genom des Virus beschrieben worden, das jedoch während der Infektion in eine Protein freie s2 Form konvertiert wird (Cotmore and Tattersall 1989).

Es sollte deshalb untersucht werden, ob eine derartige Proteinassoziation auch beim H-1 Virus vorliegt. Dazu wurden Nuklease-behandelte H-1 Capside zunächst mit Harnstoff desintegriert und die Proteine anschließend mit Phenol extrahiert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine Harnstoff-Konzentration, bei der das Capsid zerfällt auch gleichzeitig die Lösung einer nicht-kovalenten Bindung zwischen Proteinen und Virusgenom bewirken würde. Die nachfolgenden Untersuchungen der Extraktionsüberstände durch PCR und Southern Blot zeigten hierbei, dass das Genom trotz vorhergehendem Nukleaseverdau zu 95 % mit einem Protein kovalent verbunden ist. Bei gleicher Versuchsdurchführung mit H-1 Capsiden ohne vorherigen Nukleaseverdau war das Ergebnis konsistent. (Daten nicht gezeigt).

Eine Bindung zum NS2 Protein erschien hierbei unwahrscheinlich, da NS2 keine Genombindung eingeht, so dass davon ausgegangen wurde, dass auch bei H-1 Viren das NS1 das genomassoziierte Protein ist, aber ein engerer Abstand zwischen Capsid und NS1 vorliegt, der verhindert, dass die S7-Nuklease Zugriff auf das Genom hat. Überprüft wurde diese Proteinassoziation durch Immunpräzipitation der in vitro freigesetzten Genome aus in Harnstoff desintegrierten Viruscapsiden mit einem anti-NS1 Antikörper und magnetischen Partikeln (Dynabeads). Hierbei wurden durch Southern Blot Hybridisierung ca. 7 % der eingesetzten Virusgenome im Überstand gefunden, die also nicht an den anti-NS1 Antikörper banden. Ein der Desintegration vorausgegangener Nukleaseverdau schloss dabei aus, dass es sich um eine Kontamination freier Nukleinsäuren handelte.

Schließlich sollte der S7 Nuklease-Einfluss auf das Infektionsverhalten des H-1 Virus untersucht werden. Dazu wurde die Morphologie von HeLa-Zellen, die mit unbehandelten und S7 Nuklease vorbehandelten Viren infiziert wurden, beurteilt und die relativen Infektiösitäten bzw. infektiösen Einheiten (ID_{50}) der Viren bestimmt. Hierbei hat sich gezeigt, dass S7 Nuklease keinen sichtbaren Einfluss auf das Infektionsverhalten des H-1 Virus nimmt. Die Titerberechnungen ergaben für unbehandelte H-1 Viren $10^{7.6} ID_{50}$ und für Nuklease vorbehandelte Viren $10^{7.5} ID_{50}$. Die relativen Infektiösitäten der unbehandelten und Nuklease vorbehandelten H-1 Viren waren also in etwa gleich.

Durch Berechnung des Virustiters der eingesetzten unbehandelten H-1 Viren konnte ein Partikel zu Infektiösität (p/i) Verhältnis von ca. 3750 ermittelt werden. Es tragen also nur wenige Partikel der gesamten Viruspopulation zur Infektion bei. Ein ähnlich hohes Partikel zu Infektiösität-Verhältnis von ~ 1067 pro PFU der H-1 Viren wurde durch Plaque assay Analysen mit NB-K Zellen ermittelt (unpublizierte Daten, J. Cornelius 2001). In Übereinstimmung damit postulieren die Ergebnisse von Plaque assay Untersuchungen mit H-1 Virus infizierten THK (SV40 transformed hamster kidney) und NB-K Zellen, dass das Partikel zu Infektiösität (p/i) Verhältnis von Parvovirus H-1 zwischen 500 und 1000 Partikeln pro PFU schwankt (Paradiso 1981). Da der Virustiter bei Infektion von HeLa-Zellen ein ähnlich hohes p/i Verhältnis ergab,

wie bei Infektion von anderen Zelllinien, muss das relativ hohe p/i Verhältnis der H-1 Viren ein Zelltyp unabhängiges Phänomen sein und ist viel mehr eine intrinsische Eigenschaft der Viren. Da wie für CPV gezeigt, das Gros infizierender Viren im lysosomalen Kompartiment der Zellen verbleibt, scheint es sich aber um ein insuffizientes Entkommen der Viren aus dem degradierenden Milieu zu handeln und weniger um per se infektionsinkompetente Viren.

4.3 Infektionskinetik des Parvovirus H-1

Die Aufnahme des H-1 Virus in die Zelle wurde im Infektionsversuch unter unterschiedlichen Zelladhäsionsbedingungen untersucht. Um zu analysieren, wieviele der eingesetzten Viren in die Zelle aufgenommen wurden, wurde die Genomkonzentration im Zellüberstand kurz nach viraler Zelladhäsion über PCR analysiert. Die Virusvermehrung wurde durch Bestimmung der intrazellulären GE in verschiedenen langen Zeitabständen nach viraler Zelladhäsion über PCR analysiert. Hierbei sollte in Zeitintervallen von 5 – 26 h ermittelt werden, bis zu welchem Zeitpunkt nur infizierende Viren in der Zelle sind und ab welchem Zeitpunkt neusynthetisierte DNA zu beobachten war. Die real-time-PCR wurde als DNA-Analysemethode gewählt, da sie unter Berücksichtigung der inter-Test und intra-Test Abweichung eine exakte quantitative Aussage lieferte.

Kurz nach viraler Zelladhäsion wurden ca. 50 % der eingesetzten Viren in die Zelle aufgenommen. Bis zu 5 - 6 h nach viraler Zelladhäsion konnte keine messbare Veränderung der intrazellulären Genomkonzentration ermittelt werden. Erst 8 h nach viraler Zelladhäsion konnte bei Infektion von NB-K Zellen ein leichter Genomanstieg um mehr als 50 % der infizierenden Viren intrazellulär ermittelt werden. Zellinfektionsversuche, die das Verhalten von infizierenden H-1 Viren in Zellen untersuchen, können daher nur bis 5 - 6 h nach viraler Zelladhäsion durchgeführt werden, weil danach neben den infizierenden Viren mehr neusynthetisierte Viren dazukommen. Nach 26 h Infektion kam es zu einer ca. 50- fachen intrazellulären Genomzunahme in NB-K- und einer 2000fachen Amplifikation in HeLa-Zellen.

4.3.1 Kinetik der Rezeptor vermittelten Aufnahme des Parvovirus H-1

Für verwandte Parvoviren wurden verschiedene Rezeptoren beschrieben. AAV2 und AAV3 z.B. benutzen Heparansulfatproteoglycan (HSPG) zur Bindung der Zellen und Infektion (Summerford and Samulski 1998; Qiu, Handa et al. 2000), wobei noch andere Corezeptoren z.B. $\alpha\beta 5$ Integrin und der humane „fibroblast growth factor receptor“ mit der AAV2 Infektion assoziiert sind (Qing, Mah et al. 1999; Summerford, Bartlett et al. 1999). Das humane Parvovirus B19 benötigt zur Infektion das Erythrozyten P Antigen und repliziert nur in humanen Erythrozytenvorläuferzellen (Brown, Anderson et al. 1993; Brown, Young et al. 1994). CPV und FPV brauchen den Transferrin-Rezeptor (TfR) zur Zellinfektion (Parrish 1990). Ebenso wie diese Parvoviren wird scheinbar auch das H-1 Virus durch Rezeptor vermittelte Endozytose

schnell in die Zelle zur Infektion aufgenommen, wobei für H-1 bislang kein Rezeptor bekannt ist. Zu Beginn der Virusaufnahme werden Rezeptor und Ligand (das Virus) an der Plasmamembran in sogenannten Clathrin coated pits konzentriert. Diese formieren sich zu Clathrin umhüllten Vesikeln (CCV). Innerhalb kurzer Zeit verlieren die Vesikel ihre Clathrinhülle und fusionieren mit anderen Endosomen zu „sorting Endosomen“. Z.B. sind Transferrinrezeptoren in 1-2 min nach Aufnahme von der Zelloberfläche in sorting Endosomen angereichert. Die sorting Endosomen sind die erste Stelle im Rezeptor vermittelten Endozytoseprozess, von der mehrere Wege ausgehen. In diesen Endosomen werden Moleküle zu drei verschiedenen Zielen geleitet – die Plasmamembran, die „späten Endosomen“ (LE) und das „Endosomen Recycling Kompartiment“ (ERC). Durch das saure Milieu im sorting Endosom (pH 5,9 - 6,0) werden die Liganden von den Rezeptoren freigesetzt, die meistens das sorting Endosom wieder schnell verlassen, um zur Zelloberfläche zurückzukehren. Für den Rücktransport gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder werden die Rezeptoren auf dem direkten Weg innerhalb von ca. 2 min unter Ausbildung von tubulären Vesikeln zur Plasmamembran zurücktransportiert (Dunn, McGraw et al. 1989; Mayor, Presley et al. 1993; Hao and Maxfield 2000), oder die Rezeptoren werden vom sorting Endosom zum ERC transportiert. Das ERC ist eine Ansammlung tubulärer Organellen, die mit Mikrotubuli assoziiert sind, von dem aus die meisten Moleküle zur Plasmamembran zurückkehren. Es wurde gezeigt, dass der Transferrinrezeptor in ca. 10 min vom ERC zur Plasmamembran zurücktransportiert wird (Mayor, Presley et al. 1993). Der Rücktransport des Rezeptors zur Zelloberfläche ist also ein wenige Minuten dauernder Vorgang. Bei Inkubation von Zellen 20°C wird der Mikrotubuli abhängige Transport zwischen frühen „sorting“ Endosomen und späten Endosomen oder Recycling Endosomen inhibiert (Gruenberg, Griffiths et al. 1989; Ren, Xu et al. 1998).

Um zu untersuchen, ob die Aufnahme des H-1 Virus durch Rezeptoren begrenzt wird, wurde verglichen, inwieweit ein „Recycling“ des/der Rezeptoren eine erhöhte Aufnahme bzw. Infektion hervorruft. Dazu wurde die Multiplikation der Virus-DNA in zwei Ansätzen verglichen, wobei in einem Infektionsansatz die aktiven Transportprozesse wie Endozytose und Rezeptor-„Recycling“ inhibiert wurden. Dies geschah durch Inkubation des Infektionsansatzes bei RT, bei der zwar Anheftung der Viren erfolgen sollten, nicht jedoch deren Aufnahme.

Es zeigte sich, dass Zellen, deren Endozytose während der viralen Adhäsion inhibiert wurde, nach 26 h Infektion ca. 4 bis 5 mal weniger Viren produzierten als Zellen unter normalen, unveränderten Infektionsbedingungen, wobei diese Relation in HeLa- und NB-K-Zellen identisch war. Dieser Unterschied der Virusmultiplikation weist daraufhin, dass die Aufnahme des H-1 Virus in Zellen durch Exposition seines/seiner Rezeptoren begrenzt wird. Offensichtlich verhinderte also die temperaturbedingte Transportinhibition zu Beginn der H-1 Zellinfektion ein Recycling des Rezeptors und machte damit eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme des Virus nicht möglich, vorausgesetzt, dass eine Virus-Rezeptor-Bindung erfolgte. Auf der anderen Seite

erscheint es auch möglich, dass erst bei 37°C der Rezeptor eine Faltung einnimmt, die die Bindung des Virus ermöglicht.

4.3.2 Aufnahmeweg des Parvovirus H-1

Um zu untersuchen, inwieweit der Aufnahmeprozess des Parvovirus H-1 mit dem anderer Parvoviren analog ist, wurde die Notwendigkeit der Ansäuerung während der Infektion untersucht. Für MVM und CPV ist beschrieben, dass diese essentiell für eine produktive Infektion ist (Basak and Turner 1992; Parker and Parrish 2000). So wurde gezeigt, dass die Ansäuerung ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Parvovirusaufnahme in Zellen ist, weil Substanzen, die den endosomalen pH anheben eine produktive Infektion blockieren (Basak and Turner 1992; Vihinen-Ranta, Kalela et al. 1998; Bartlett, Wilcher et al. 2000; Douar, Poulard et al. 2001; Hansen, Qing et al. 2001). Im H-1 Infektionsversuch wurde gezeigt, dass die virale Genomaufnahme in NH_4Cl vorbehandelten Zellen um das 3-fache reduziert und die karyoplasmatische Genomaufnahme vollständig inhibiert wurde. Um auszuschliessen, dass der inhibitorische Effekt von NH_4Cl auf unspezifische Effekte zurückzuführen war, wie z.B. eine Veränderung des Virus, wurde überprüft, ob auch Bafilomycin A1 die H-1 Infektion unterdrückte. Bafilomycin A1 ist ein spezifischer Inhibitor vakuolärer H^+ -ATPasen, die einen niedrigen luminalen pH in endozytotischen und exozytotischen Kompartimenten bewirken (Pressman 1976; Mellman 1996; Pillay, Elliott et al. 2002). Sekundär wirkt Bafilomycin A1 u.a. inhibierend auf die Dissoziation von Rezeptor und Ligand, auf die Abknospung der ECV von frühen Endosomen (Clague, Urbe et al. 1994) und auf die Fusion der späten Endosomen mit Lysosomen (van Weert, Dunn et al. 1995), wobei die Effekte vom Zelltyp abhängig sind (Bayer, Schober et al. 1998). Tatsächlich blieb eine Lyse von H-1 infizierten Zellen durch Behandlung mit Bafilomycin aus. Die Infektionsblockade durch lysosomotrope Substanzen weist auf einen klassischen Endozytosepfad hin, und zeigt, dass der niedrige endosomale pH für Infektion oder endosomalen Transport notwendig ist. Das gleiche Verhalten durch lysosomotrope Agentien wie NH_4Cl und Bafilomycin A1 wurde für Infektionen mit CPV und AAV beschrieben (Basak and Turner 1992; Bartlett, Wilcher et al. 2000; Parker and Parrish 2000; Hansen, Qing et al. 2001). Allerdings wurde die Inhibition der produktiven Infektion für CPV und MVM in der Form gedeutet, dass eine Ansäuerung des Virus während der Endocytose erfolgen muss. Nicht beachtet wurde, dass ein veränderter vesikulärer pH auch eine Änderung des vesikulären Transports und damit auch des Rezeptor-„Recyclings“ bewirken könnte. Dies wurde z. B. für das Recycling des Transferrinrezeptors durch Neutralisation von endosomalen Kompartimenten mit Bafilomycin (Johnson, Dunn et al. 1993) und für den Parathormonrezeptor (PTH/PTHrP Rezeptor) (Tawfeek and Abou-Samra 2004) gezeigt.

Daher wurde, wie bereits oben erwähnt, untersucht, inwieweit eine Behandlung mit NH_4Cl schon die Aufnahme der H-1 Viren beeinflussen könnte. In der Tat zeigte sich 2 h nach viraler Zelladhäsion, dass 3-mal weniger GE im Cytosol NH_4Cl behandelter Zellen nachgewiesen

wurden als in unbehandelten Zellen. Dies zeigt an, dass durch NH_4Cl vermutlich der Rücktransport des H-1 Rezeptors gehemmt worden ist.

4.3.3 Entpackungsvorgang des Parvovirus H-1 Genom während der Aufnahme

Zur Untersuchung des Entpackungsvorganges wurde die Freisetzung viraler Genome aus dem Capsid während des Infektionsvorganges durch nukleolytischen Verdau der intrazellulären Viren der Infektionskinetik analysiert. Hierbei zeigte sich, dass 5 h nach Virusadhäsion intrazellulär keine Virus-DNA durch Nuklease degradierbar war. In diesem Zeitraum befanden sich, wie vorher gezeigt, nur infizierende Viren in der Zelle. Nach 26 h waren intrazelluläre H-1 Genome durch Nuklease degradierbar. Da die Analyse der Virusgenome über PCR geführt worden war, die eine hohe Schwankungsbreite aufweist, wurde dieses Experiment 20-fach wiederholt. Unbehandelte und Nuklease verdaute Ansätze wurden zum besseren Vergleich in einem PCR-Lauf analysiert, da die intra-Test Abweichung der PCR geringer als die inter-Test Abweichung ist. Die Auswertung ergab, dass die infizierenden H-1 Viren im Cytosol in den ersten 6 h p. i. nicht durch nukleolytischen Verdau degradierbar sind, während dies bei ca. 46 % der karyoplasmatischen Virusgenome möglich ist.

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass es sich bei den durch Triton-X-100 isolierten karyoplasmatischen Virusgenomen auch um Kernmembran assoziierte Genome handeln könnte. Die Virusgenome, die die Kernmembran bzw. den Zellkern erreichen, machen jedoch nur einen kleinen Anteil (15%) der intrazellulären Genome aus, wie Berechnungen der intrazellulären Virusgenomverteilung ergaben.

Die Genomfreisetzung aus dem Capsid während des Infektionsvorganges erscheint ungewöhnlich lange, da Virusaufnahme und intrazellulärer Transport bei z.B. Adenoviren oder HSV1 innerhalb von Minuten ablaufen (Sodeik, Ebersold et al. 1997; Suomalainen, Nakano et al. 1999). Auf der anderen Seite könnte jedoch auch die Freisetzung aus dem endozytotischen Pfad nur einem Teil der Viren gelingen.

Die Arbeiten mit anderen Parvoviren suggerieren, dass auch diese die gleiche Aufnahmekinetik wie H-1 zeigen. So konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen den Transferrinrezeptor, den CPV zur Zellinfektion nutzt, die Infektion reduzierten, wenn sie erst 4 h nach Infektion in die Zellen injiziert wurden. Es bleiben demnach viele infizierende Capside mit dem Transferrinrezeptor in endozytotischen Kompartimenten assoziiert (Parker and Parrish 2000). Wurden Antikörper gegen das CPV Capsid vier oder mehr h nach Inokulation in das Cytoplasma injiziert, wurde ebenso eine Infektion verhindert, was zeigt, dass die Capside die endosomalen Vesikel langsam verlassen (Vihinen-Ranta, Yuan et al. 2000; Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002).

Experimente mit MVM, das auch durch das endosomale System aufgenommen wird, belegen, dass der virale intrazelluläre endozytotische Transport durch Bafilomycin A1 oder Chloroquin,

die die Endozytose blockieren, bis zu mehrere Stunden nach viraler Zellaufnahme inhibiert werden kann (Ros, Burckhardt et al. 2002).

Ein schnellerer intrazellulärer Transport im Vergleich zu CPV, MVM und vermutlich auch H-1 ist für AAV bekannt. Für AAV sind verschiedene Infektionswege des Capsids beschrieben. In einer Studie schienen die AAV Capside von den frühen Endosomen in das Cytoplasma freigesetzt zu werden und waren innerhalb von 2 h im Zellkern lokalisiert (Bartlett, Wilcher et al. 2000). Eine andere Studie, in der die Infektionswege von einzelnen markierten AAV Capsiden verfolgt wurden, ergab, dass manche Capside innerhalb von 15 min in den Kern aufgenommen wurden (Seisenberger, Ried et al. 2001). Bei letzter Studie ist jedoch zu beachten, dass, im Gegensatz zu der erst erwähnten Studie über AAV, nur einzelne Viruspartikel untersucht wurden. Aufgrund des relativ hohen Partikel zu Infektionsverhältnisses der Parvoviren kann es sich bei dem Virus, das nach 15 min im Kern lokalisierte, mit hoher Wahrscheinlichkeit gerade um ein Partikel handeln, das nicht zur Infektion beiträgt.

Die Nukleasesensibilität der karyoplasmatischen Viren zeigt, dass virale DNA erst an Kernmembran oder intranukleär aus dem Viruscapsid freigesetzt wird. Am MVM und CPV wurde beobachtet, dass das 3' Ende der viralen DNA außerhalb des Capsids nach Harnstoff- oder Hitzebehandlungen, die nicht die Capsidstruktur desintegrieren, exponiert werden kann, wobei vermutlich die 3' terminale Haarnadelstruktur des Genoms als Template für die DNA-Synthese dient (Christensen, Cotmore et al. 1997; Cotmore, D'Abramo A et al. 1999; Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002). Somit ist eine intrazelluläre Modifikation des Parvoviruscapsid denkbar, die zu einer Exposition des 3' Genomendes führt. Beim H-1 Virus würde eine derartige Capsidmodifikation unter Rücksicht seiner cytosolischen Nukleaseresistenz erst nach Penetration aus dem endosomalen Kompartiment erfolgen.

1-2 d p. i. war die Nukleasesensibilität der H-1 Nachkommenviren im Cytosol ebenfalls nicht signifikant. Im Karyoplasma war mehr als die Hälfte der Genome 1-2 d p. i. degradierbar mit Zunahme der Nukleasesensibilität gegenüber den ersten Stunden nach Virusadhäsion. Die Ergebnisse zeigen, dass im Cytosol kein H-1 Genom durch Nuklease degradierbar ist und dort nicht aus dem Capsid entpackt wird, zumindest nicht bis zum Ort der Kernmembran. An der Kernmembran oder intranukleär, dem Ort der Replikation, liegt Virusgenom frei, das zum einen aus Capsiden entpackt wurde, zum anderen aber auch neusynthetisierte Virus-DNA sein kann. Im Einklang mit den Daten anderer Parvoviren (Wistuba, Weger et al. 1995) (Cotmore and Tattersall 1988; Hoque, Ishizu et al. 1999; Lombardo, Ramirez et al. 2000) zeigen diese Befunde an, dass neusynthetisierte Virus-DNA im Kern verpackt wird und im Cytosol im Capsid vor Nukleaseverdau geschützt vorliegt.

4.3.4 Ausschluss einer Caveolae-vermittelten Aufnahme des Parvovirus H-1 in die Zelle

Der lange Aufnahmeprozess des Parvovirus H-1 in die Zelle könnte auch über die Verwendung eines anderen Transportweges als der Endozytose über Clathrin-coated Vesicles bedingt sein.

Im Gegensatz zu dem schnellen Aufnahmeprozess über Clathrin vermittelte Endozytose wird z.B. SV40 über Caveolae in die Zelle aufgenommen und benötigt 2,5 h, bis die Hälfte der gebundenen Viren die Zelloberfläche verlässt (Anderson, Chen et al. 1996). Die Aufnahme von Liganden durch Caveolae ist charakteristischerweise langsam (Anderson, Kamen et al. 1992).

Um die Aufnahme über Caveolae auszuschliessen, wurde eine Infektion unter Zugabe von Nystatin, einem Inhibitor der Caveolae-Formation (Rothberg, Heuser et al. 1992; Anderson, Chen et al. 1996), durchgeführt. Es zeigte sich, dass Nystatin die Parvovirus H-1 Infektion nicht beeinflusste. Zusätzlich zeigten neue Daten von Rabe, dass eine H-1 Infektion in Gegenwart von Chlorpromazin inhibiert wird (Rabe, 2004 Promotion). Chlorpromazin zerstört die Clathrinmoleküle und wirkt dadurch Endozytose inhibierend (Wang, Rothberg et al. 1993). Damit erscheint es am wahrscheinlichsten, dass H-1 über Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen wird, aber nur ein Teil der Viren an den Zellkern gelangt und sein Genom entlässt.

4.4 Charakterisierung der viralen genomhaltigen Komponenten während der Aufnahme in die Zelle durch Dichtegradientenzentrifugation

Um diese Befunde zu erhärten, wurden die infizierenden H-1 Capside in verschiedenen Dichtegradientenzentrifugationen untersucht. Im Zellinfektionsversuch mit Sucrosegradientenzentrifugation der Zellkompartimente 2 h nach viraler Zelladhäsion wurden die genomhaltigen Komponenten von infizierenden H-1 Viren während der Zellaufnahme zunächst detaillierter analysiert. Auf gleiche Weise wurden zum Vergleich H-1 infizierte Zellen aufbereitet, deren Infektion durch NH_4Cl inhibiert wurde, um zu ermitteln, ob sich die Dichte der H-1 Partikel durch Unterbindung der Ansäuerung änderte. Die Gradientenfractionen von Cytosol, Karyoplasma wurden mit Dot Blot und Southern Blot Hybridisierung auf H-1 DNA untersucht, so dass nur volle, DNA-haltige Viruspartikel analysiert wurden. Im Vergleich zu den Dichten von H-1 Virus und H-1 Genom in Sucrose wurden die Dichten der genomhaltigen Fractionen analysiert. H-1 Viren nahmen eine Dichte von 29,5 – 37 % (1,12 – 1,15 g/ml) in Sucrose ein. Erwartungsgemäß migrierte isolierte H-1 DNA langsamer (Dichtebereich von 28,5 – 34,5 % [1,12 – 1,16 g/ml] in Sucrose).

4.4.1 Dichteanalyse der cytosolischen Viruspartikel

Im Cytoplasma lag die Dichte, in der H-1 Genome beobachtet wurden im Bereich zwischen 31 % und 47 % (1,13 - 1,21 g/ml) mit einem Peak bei 41,5% (1,18 g/ml). Dichteanteile von unter 40 % deuten dabei eine Aufnahme in Endosomen an, da diese eine Dichte von ca. 31% (1,13 g/ml) haben (Evans and Enrich 1988; Fuchs, Ellinger et al. 1994; Enrich, Pol et al. 1999; Fuller, Eaton et al. 2001) (Rickwood, D.; Evans, W.H. 1978). Der im Mittel jedoch hohe Dichtebereich der cytosolischen H-1 Viren im Vergleich zu reinen H-1 Viren (29,5 – 37 %) könnte mit der

Virusaufnahme in Lysosomen zu erklären sein, da diese eine Dichte von ca. 42 – 49 % (1,19 – 1,22 g/ml) in Sucrose haben (Rickwood, D.; Evans, W.H. 1978). H-1 Viren in CCV mit einer Dichte von 47 – 56 % (1,21 - 1,26 g/ml) (Fuchs, Ellinger et al. 1994) sind auszuschließen, weil CCV innerhalb von 1 - 3 min ihre Clathrinhülle verlieren (Mellman 1996) und 2 h nach Zelladhäsion längst nicht mehr vorkommen sollten.

Die Aufnahme in Lysosomen würde bedeuten, dass das Gros der H-1 Partikel über den degradativen Endozytoseweg in Richtung Zellkern transportiert wird. Dieser Weg könnte für das Virus notwendig sein, um Konformationsänderungen anzunehmen, die für die Membranpenetration vom Lysosom in das Cytoplasma erforderlich sind. Da H-1 Viren die Clathrin umhüllten Vesikel vermutlich in Assoziation mit dem Rezeptor, über den die Zellaufnahme vermittelt wird, erreichen, könnte der niedrige pH im Lysosom auch für die Freisetzung des Virus vom Rezeptor notwendig sein. Demgegenüber kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die lysosomalen H-1 Capside die nicht-infektiösen Einheiten darstellen, die nicht in der Lage waren, vorher den Endozytosepfad zu verlassen.

4.4.2 Dichteanalyse der karyoplasmatischen Viruspartikel

Im Karyoplasma lag der Dichtebereich der H-1 Genome zwischen 37 % und 48 % (1,16 – 1,22 g/ml). Es kam zu keiner Verschiebung zu leichteren Sucrosedichten ähnlich der von H-1 Virus (29,5 – 37 % ; 1,12 – 1,15 g/ml) und H-1 DNA (28,5 – 34,5 % ; 1,12 – 1,16 g/ml). Scheinbar deutet dies darauf hin, dass die karyoplasmatischen Virusgenome in Partikel-assoziiierter Form vorliegen und nicht als freie ungebundene DNA.

In den vorher beschriebenen Untersuchungen über den Entpackungsvorgang des H-1 Virus wurde bereits beschrieben, dass H-1 Viren relativ langsam in die Zelle aufgenommen werden und die karyoplasmatische Virus-DNA wahrscheinlich mit der cytoplasmatischen Seite der Kernmembran assoziiert ist. Da die Kernmembran in Sucrose eine Dichte von 41 – 48 % (1,18 – 1,22 g/ml) hat, liegt vermutlich diese Bindung dem Sedimentationsverhalten der karyoplasmatischen H-1 Genome 2 h p. i. zugrunde. Diese Interpretation ist damit konsistent, dass die Virus-DNA der meisten karyoplasmatischen Viren durch nukleolytischen Verdau degradierbar ist, so dass das Virusgenom nicht verpackt vorliegt.

4.4.3 Dichteanalyse der Viruspartikel unter Infektionsinhibition in Gegenwart von NH₄Cl

In Gegenwart von NH₄Cl, das den endozytotischen pH neutralisiert, änderte sich der Dichtebereich der genomhaltigen Viruspartikel im Cytosol 2 h nach viraler Zelladhäsion kaum (30,75 % - 47 % ; 1,13 - 1,21 g/ml). Da die endosomale Ansäuerung keinen Einfluss auf die Dichte der genomhaltigen cytosolischen H-1 Partikel nimmt, scheint das H-1 Capsid während der endozytotischen Aufnahme nicht vollkommen instabil oder prozessiert zu werden. Dies steht in Übereinstimmung mit der fehlenden Nukleasesensibilität der cytosolischen infizierenden Viren, die vorher beschrieben wurde. Gleichbedeutend wird CPV als überwiegend intaktes

Partikel in das Cytosol übertragen (Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002). Weiterhin wurde für CPV-Capside nur ein geringer Unterschied in der Suszeptibilität zu Proteasen bei pH 5,5 und 7,5 beobachtet (Weichert, Parker et al. 1998).

Andererseits wurde in Gegenwart von NH_4Cl eine nukleäre Aufnahme von Virus-DNA vollständig inhibiert, was im Einklang mit der infektionsinhibierenden Wirkung von NH_4Cl steht. Dieser Effekt wurde nicht durch einen Einfluss des NH_4Cl auf eine mögliche Prozessierung der Viruscapsidproteine verursacht, denn im Immunblot konnte gezeigt werden, dass NH_4Cl keine Proteolyse der Capsidproteine induziert.

Wie die Interpretation der Dichtegradientenzentrifugation ergab, waren die meisten karyoplasmatischen Genome mit der Kernmembran assoziiert. Durch Neutralisation des endosomalen pH wurde also wahrscheinlich der Transport zur Kernmembran unterbunden. Somit muss die Exposition bei niedrigem pH für H-1 Viren notwendig sein, um aus den Endosomen oder Lysosomen in das Cytoplasma penetrieren zu können. Dass dies nur ein kleiner Teil der Viren tut, während der Rest im endozytotischen degradativen Kompartiment verbleibt, resultiert aus der allgemein geringen nukleären Genomaufnahme.

Dieser Mechanismus des parvoviralen Austritts von endozytotischen Vesikeln in das Cytosol ist noch weitgehend unbekannt. Manche Viren unterlaufen bei geringem pH einer Strukturänderung. So wird das umhüllte Influenzavirus durch den niedrigen pH beim endozytotischen Transport verändert und fusioniert mit der Endosomenmembran, um seine viralen Ribonukleoproteinkomplexe in das Cytoplasma zu entlassen (White, Kielian et al. 1983; Bui, Whittaker et al. 1996). Parvoviren haben am N-Terminus des VP1 eine Verlängerung (VP1 „unique part“ [VP1up]), die für die Infektion essentiell ist. Die Deletion des N-terminalen Endes von VP1 führt zur Formation nichtinfektöser Viren (Tullis, Burger et al. 1993; Vihinen-Ranta, Wang et al. 2002). In intakten Capsiden von CPV und MVM liegt der N-Terminus von VP1 innerhalb des Virus und ist nicht zugänglich. Unter spezifischen Bedingungen, wie Harnstoffbehandlung oder Erhitzung, ohne das Capsid vollständig zu desintegrieren, kann der VP1 N-Terminus exponiert werden (Weichert, Parker et al. 1998; Cotmore, D'Abramo A et al. 1999; Vihinen-Ranta, Yuan et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass einige Aminosäuren in der konservierten Domäne des VP1 N-Terminus Motiven entsprechen, die in der katalytischen Region von sekretorischen Phospholipasen (sPLA_2) gefunden werden (Zadori, Szelei et al. 2001). In vitro kann die parvovirale PLA_2 -Aktivität durch Hitze oder sauren pH ausgelöst werden (Suikkanen, Antila et al. 2003). Möglicherweise führt der niedrige pH in den Lysosomen zur Exposition des VP1 N-Terminus und damit zur Ausbildung der PLA_2 -Aktivität. Die PLA_2 -Aktivität trägt wahrscheinlich zur viralen Membranpenetration der Endosomen oder Lysosomen bei. Es kommt nicht zu einer vollständigen Lyse des endosomalen Vesikels, weil CPV keinen signifikanten Permeabilisierungsanstieg der Endosomen für α -Sarcin, ein Proteinsyntheseinhibitor, bewirkt (Parker and Parrish 2000; Suikkanen, Antila et al. 2003).

4.5 Darstellung von H-1 Capsiden während der Infektion durch Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzanalyse mit einem anti-Capsid AK ergab, dass volle H-1 Capside bis 4 h p.i. perinukleär lokalisiert sind. Im Kern konnten bis 4 h p.i. keine Capside gefunden werden. In Bezug auf die beobachtete Nukleaseresistenz genomhaltiger Viren im Cytoplasma und deren Dichte kann nun gesagt werden, dass Viruscapside mit ihrem Genom in den ersten Stunden der Infektion in perinukleären endosomalen Kompartimenten lokalisiert sind. Von diesem Kompartiment erreicht nur ein Teil der Virusgenome den Zellkern. Im Cytoplasma verbleibt der Großteil der Viren vermutlich in degenerativen Vesikeln und geht nicht in das Cytosol über. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Immunfluoreszenz colokalisieren CPV-Capside kurz nach Aufnahme für mehrere Stunden in perinukleären Kompartimenten (Parker and Parrish 2000; Suikkanen, Saajarvi et al. 2002). Nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass CPV-DNA für mindestens 8 h p. i. mit Capsiden colokalisiert (Suikkanen, Saajarvi et al. 2002).

Werden die Ergebnisse zusammengenommen ist die Clathrin vermittelte endozytische Zellaufnahme des Parvovirus H-1 in Analogie zu CPV, MVM und AAV am wahrscheinlichsten. Deren Aufnahme in die Zelle ist ein schneller Prozess. Sie erfolgt am wahrscheinlichsten über Clathrin vermittelte Endozytose, da beobachtet wurde, dass die Viruspartikel schnell von der Zelloberfläche verschwinden, sich in „coated pits“ und umhüllten Vesikeln konzentrieren und die endozytische Aufnahme von CPV und AAV2 durch Überexpression der Dynamin K44A Mutante inhibiert wird (Linser, Bruning et al. 1979; Duan, Li et al. 1999; Bartlett, Wilcher et al. 2000; Parker and Parrish 2000). Dynamin ist eine 100 kDa GTPase, die für die Spaltung Clathrin umhüllter Vesikel von der Plasmamembran und dem Golgi Apparat zuständig ist (Hinshaw 2000). Eine schnelle Aufnahme von Liganden ist typisch für Clathrin vermittelte Endozytose. Nach Abtrennung von der Plasmamembran werden die Clathrinhüllen innerhalb von 1 – 3 min von den Vesikeln entfernt (Mellman 1996). Deshalb wurden CPV Partikel bereits 15 min nach Zellaufnahme in nicht umhüllten Vesikeln im peripheren und perinukleären Cytoplasma beobachtet (Parker and Parrish 2000).

Da bis zu 4 h p. i. keine Capside im Kern beobachtet wurden und die Sucrosedichte karyoplasmatischer Genome für die Lokalisation an der Kernmembran spricht, sind vermutlich doch mehr Kernmembran-assoziierte Viren vorhanden als intranukleäre. Das Vorkommen weniger intranukleärer H-1 Capside ist durch die fehlende Immunfluoreszenz nicht auszuschließen. Denkbar ist auch, dass bis 4 h p. i. keine Capsidstrukturen im Kern vorkommen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob während des Infektionsvorganges strukturelle Veränderungen des Parvovirus H-1 auftreten, die mit dem nukleären Import des parvoviralen Genoms assoziiert sind. Es zeigte sich Folgendes:

1. Das H-1 Virus kommt in zwei infektiösen Formen zu unterschiedlichen Anteilen vor. Ca. 95% der H-1 Viren haben ein NS1-Protein-assoziiertes Virusgenom, welches an der Virusoberfläche exponiert wird. Bei dieser Viruspopulation liegt ein offensichtlich enger Abstand zwischen Capsid und NS1 Protein vor, der verhindert, dass das NS1 Protein nukleolytisch abgespalten werden kann. Übereinstimmend hat ein Nuklease-Verdau keinen Einfluss auf die Infektiosität.
2. Weniger als 1% der H-1 Viruspartikel sind infektiös kompetent. Sie haben damit ein relativ hohes p/i-Verhältnis, das eine intrinsische Eigenschaft der Viren darstellt und kein Zelltyp-abhängiges Phänomen ist.
3. Der Infektionsvorgang ist relativ langsam. Bis 5 - 6 Stunden nach viraler Zelladhäsion befinden sich nur infizierende Viren in der Zelle, ohne dass es zu einer signifikanten Virusmultiplikation kommt.
4. Parvovirus H-1 wird durch Rezeptor-limitierte, Clathrin vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Für eine erfolgreiche Infektion muss H-1 einem sauren pH exponiert werden. Durch Neutralisation des endosomalen Kompartiments wird zusätzlich die Virusaufnahme in die Zelle reduziert, was für inhibierten Rezeptorrücktransport zur Plasmamembran spricht.
5. H-1 verbleibt in den ersten 5 – 6 Stunden der Infektion in perinukleären endosomalen Kompartimenten, in denen die Capside unverändert in der Gradientenzentrifugation migrieren. Übereinstimmend liegt das Virusgenom vor Nukleasen geschützt vor.
6. Eine Freisetzung von allerdings nur 15% der H-1 Genome erfolgt am Zellkern, wahrscheinlich an der cytoplasmatischen Seite der Kernmembran.
7. Der Großteil der Viren verbleibt im endosomalen/lysosomalen Kompartiment und geht nicht in das Cytoplasma über.
9. HeLa-Zellen replizieren die Genome effizienter als NB-K-Zellen, jedoch findet in NB-K-Zellen eine bessere Verpackung der viralen DNA in neu gebildete Capside statt.

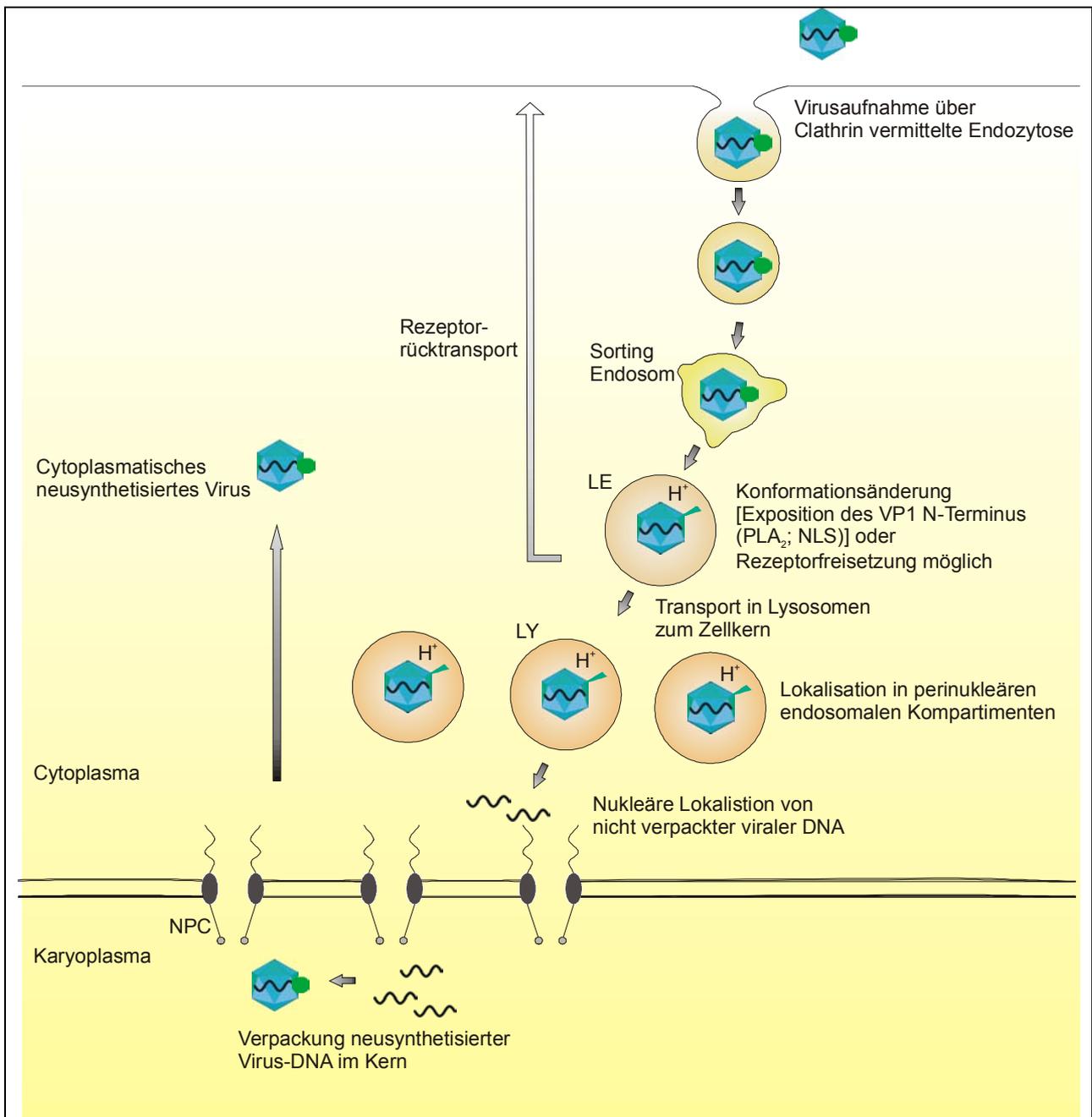


Abb. 52 Schematische Übersicht des parvoviralen Genom- und Capsidtransports

LE= spätes Endosom; LY= Lysosom; PLA_2 = Phospholipase A_2 ; NLS= Nukleäre Lokalisations Sequenz; NPC = Kernporenkomplex;

Conclusion:

In the present work I investigated structural changes of the parvoviral H-1 capsid that are associated with nuclear import of the genome. It could be shown that:

1. There are 2 different species of capsids. Ninety-five percent exhibited NS1 protein that is covalently bound to the viral genome. In this population capsid and NS1 are apparently in close proximity as nuclease digest could not remove the NS1. Accordingly, these treatments had no effect on infectivity of the virus.
2. Less than 1 % of viral particles are infectious. This ratio is intrinsic to the virus and does not depend upon the cell type that becomes infected.
3. The infection process is relatively slow. Up to 5 – 6 hours viral adhesion to the cell surface no progeny H-1 DNA could be detected.
4. H-1 enters the cell using clathrin-mediated endocytosis. For successful infection the capsids must become acidified. Neutralization of the endosomal compartment additionally results in a decreased viral uptake into the cell, implying an acid-dependent re-shuttling of the receptor.
5. For 5 – 6 hours H-1 remains unchanged in the perinuclear endosomal compartment as it is indicated by the unchanged migration in gradient centrifugation. Consistently the viral genomes remained protected against nuclease degradation during this period.
6. Genome release at the nuclear compartment most likely the cytosolic leaflet of the nuclear membrane. Genome liberation was restricted to 15 % of the cell-associated capsids.
7. The majority of viruses remained in the endosomal/lysosomal compartment without entering the cytoplasm.
8. HeLa cells replicate H-1 genomes more efficiently than NB-K cells. NB-K cells however are more efficient in genome packaging into the progeny viral capsids.

Literaturverzeichnis

- Agbandje, M., R. McKenna, et al. (1993). "Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles." *Proteins* **16**(2): 155-71.
- Agbandje-McKenna, M., A. L. Llamas-Saiz, et al. (1998). "Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice." *Structure* **6**(11): 1369-81.
- Al-Awqati, Q. (1986). "Proton-translocating ATPases." *Annu Rev Cell Biol* **2**: 179-99.
- Anderson, H. A., Y. Chen, et al. (1996). "Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae." *Mol Biol Cell* **7**(11): 1825-34.
- Anderson, R. G., B. A. Kamen, et al. (1992). "Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae." *Science* **255**(5043): 410-1.
- Aniento, F., F. Gu, et al. (1996). "An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes." *J Cell Biol* **133**(1): 29-41.
- Anouja, F., R. Wattiez, et al. (1997). "The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins." *J Virol* **71**(6): 4671-8.
- Araki, N., M. T. Johnson, et al. (1996). "A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages." *J Cell Biol* **135**(5): 1249-60.
- Astell, C. R., M. B. Chow, et al. (1985). "Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication." *J Virol* **54**(1): 171-7.
- Astell, C. R., Q. Liu, et al. (1996). "Minute virus of mice cis-acting sequences required for genome replication and the role of the trans-acting viral protein, NS-1." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **55**: 245-85.
- Astell, C. R., M. Smith, et al. (1979). "Structure of the 3' hairpin termini of four rodent parvovirus genomes: nucleotide sequence homology at origins of DNA replication." *Cell* **17**(3): 691-703.
- Astell, C. R., M. Thomson, et al. (1983). "Structure and replication of minute virus of mice DNA." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47 Pt 2**: 751-62.
- Authier, F., B. I. Posner, et al. (1996). "Endosomal proteolysis of internalized proteins." *FEBS Lett* **389**(1): 55-60.
- Ball-Goodrich, L. J., R. D. Moir, et al. (1991). "Parvoviral target cell specificity: acquisition of fibrotropism by a mutant of the lymphotropic strain of minute virus of mice involves multiple amino acid substitutions within the capsid." *Virology* **184**(1): 175-86.
- Ball-Goodrich, L. J. and P. Tattersall (1992). "Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice." *J Virol* **66**(6): 3415-23.
- Balsinde, J., M. A. Balboa, et al. (1999). "Regulation and inhibition of phospholipase A2." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 175-89.
- Bantel-Schaal, U., B. Hub, et al. (2002). "Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment." *J Virol* **76**(5): 2340-9.
- Barbis, D. P., S. F. Chang, et al. (1992). "Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding." *Virology* **191**(1): 301-8.
- Barbis, D. P. and C. R. Parrish (1994). "Characterization of canine parvovirus (CPV) interactions with 3201 T cells: involvement of GPI-anchored protein(s) in binding and infection." *Braz J Med Biol Res* **27**(2): 401-7.
- Bartlett, J. S., J. Kleinschmidt, et al. (1999). "Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody." *Nat Biotechnol* **17**(2): 181-6.
- Bartlett, J. S., R. Wilcher, et al. (2000). "Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors." *J Virol* **74**(6): 2777-85.
- Basak, S. and H. Turner (1992). "Infectious entry pathway for canine parvovirus." *Virology* **186**(2): 368-76.
- Bashir, T., R. Horlein, et al. (2000). "Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5522-7.

- Bates, R. C., C. E. Snyder, et al. (1984). "Autonomous parvovirus L1 encodes equal amounts of plus and minus DNA strands." *J Virol* **49**(2): 319-24.
- Bayer, N., D. Schober, et al. (1998). "Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection." *J Virol* **72**(12): 9645-55.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, et al. (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." *Science* **275**(5304): 1320-3.
- Berns, K. I. (1990). "Parvovirus replication." *Microbiol Rev* **54**(3): 316-29.
- Berns, K. I. and S. Adler (1972). "Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains." *J Virol* **9**(2): 394-6.
- Berns, K. I. and R. A. Bohenzky (1987). "Adeno-associated viruses: an update." *Adv Virus Res* **32**: 243-306.
- Berns, K. I. and C. Giraud (1996). "Biology of adeno-associated virus." *Curr Top Microbiol Immunol* **218**: 1-23.
- Berns, K. I., J. Kort, et al. (1975). "Study of the fine structure of adeno-associated virus DNA with bacterial restriction endonucleases." *J Virol* **16**(3): 712-9.
- Besselsen, D. G., C. L. Besch-Williford, et al. (1995). "Detection of H-1 parvovirus and Kilham rat virus by PCR." *J Clin Microbiol* **33**(7): 1699-703.
- Bischof, A. (1999). Untersuchung der Reife und Stabilität intrazellulärer Hepatitis B Virus Nukleocapside. *Biologie*. Giessen, Giessen.
- Brandenburger, A., D. Legendre, et al. (1990). "NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp." *Virology* **174**(2): 576-84.
- Brown, K. E., S. M. Anderson, et al. (1993). "Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus." *Science* **262**(5130): 114-7.
- Brown, K. E., N. S. Young, et al. (1994). "Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection." *Crit Rev Oncol Hematol* **16**(1): 1-31.
- Brownstein, D. G., A. L. Smith, et al. (1991). "Pathogenesis of infection with a virulent allotropic variant of minute virus of mice and regulation by host genotype." *Lab Invest* **65**(3): 357-64.
- Brownstein, D. G., A. L. Smith, et al. (1992). "The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2." *J Virol* **66**(5): 3118-24.
- Brunstein, J. and C. R. Astell (1997). "Analysis of the internal replication sequence indicates that there are three elements required for efficient replication of minute virus of mice minigenomes." *J Virol* **71**(12): 9087-95.
- Brunstein, J., M. Soderlund-Venermo, et al. (2000). "Identification of a novel RNA splicing pattern as a basis of restricted cell tropism of erythrovirus B19." *Virology* **274**(2): 284-91.
- Bui, M., G. Whittaker, et al. (1996). "Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins." *J Virol* **70**(12): 8391-401.
- Buller, R. M., J. E. Janik, et al. (1981). "Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication." *J Virol* **40**(1): 241-7.
- Bullough, P. A., F. M. Hughson, et al. (1994). "Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion." *Nature* **371**(6492): 37-43.
- Caillet-Fauquet, P., M. Perros, et al. (1990). "Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins." *Embo J* **9**(9): 2989-95.
- Cain, C. C., D. M. Sipe, et al. (1989). Regulation of endocytic pH by the Na⁺,K⁺-ATPase in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**: 544-8.
- Cater, J. E. and D. J. Pintel (1992). "The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells." *J Gen Virol* **73** (Pt 7): 1839-43.
- Chandra, S. and H. W. Toolan (1961). "Electron microscopy of the H-1 virus. I. Morphology of the virus and a possible virus-host relationship." *J Natl Cancer Inst* **27**: 1405-49.
- Chang, S. F., J. Y. Sgro, et al. (1992). "Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties." *J Virol* **66**(12): 6858-67.

- Chapman, M. S. and M. G. Rossmann (1993). "Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses." *Virology* **194**(2): 491-508.
- Chemello, M. E., O. C. Aristimuno, et al. (2002). "Requirement for vacuolar H⁺-ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells." *J Virol* **76**(24): 13083-7.
- Chen, Y. Q., M. C. Tuynder, et al. (1989). "Sensitization of human keratinocytes to killing by parvovirus H-1 takes place during their malignant transformation but does not require them to be tumorigenic." *Carcinogenesis* **10**(1): 163-7.
- Chipman, P. R., M. Agbandje-McKenna, et al. (1996). "Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7502-6.
- Christensen, J., S. F. Cotmore, et al. (1997). "A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication." *J Virol* **71**(2): 1405-16.
- Christensen, J., M. Pedersen, et al. (1995). "Purification and characterization of the major nonstructural protein (NS-1) of Aleutian mink disease parvovirus." *J Virol* **69**(3): 1802-9.
- Clague, M. J. (1999). "Membrane transport: Take your fusion partners." *Curr Biol* **9**(7): R258-60.
- Clague, M. J., S. Urbe, et al. (1994). "Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation." *J Biol Chem* **269**(1): 21-4.
- Clemens, K. E., D. R. Cerutis, et al. (1990). "Cloning of minute virus of mice cDNAs and preliminary analysis of individual viral proteins expressed in murine cells." *J Virol* **64**(8): 3967-73.
- Cornelis, J. J., P. Becquart, et al. (1988). "Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice." *J Virol* **62**(5): 1679-86.
- Cornelis, J. J., N. Spruyt, et al. (1988). "Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression." *J Virol* **62**(9): 3438-44.
- Cossons, N., E. A. Faust, et al. (1996). "DNA polymerase delta-dependent formation of a hairpin structure at the 5' terminal palindrome of the minute virus of mice genome." *Virology* **216**(1): 258-64.
- Cotmore, S. F., J. Christensen, et al. (1995). "The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]₂₋₃." *J Virol* **69**(3): 1652-60.
- Cotmore, S. F., M. D'Abramo A, Jr., et al. (1999). "Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly." *Virology* **254**(1): 169-81.
- Cotmore, S. F., A. M. D'Abramo, Jr., et al. (1997). "The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells." *Virology* **231**(2): 267-80.
- Cotmore, S. F., L. J. Sturzenbecker, et al. (1983). "The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural proteins in addition to its capsid polypeptides." *Virology* **129**(2): 333-43.
- Cotmore, S. F. and P. Tattersall (1986). "Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice." *J Virol* **58**(3): 724-32.
- Cotmore, S. F. and P. Tattersall (1987). "The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates." *Adv Virus Res* **33**: 91-174.
- Cotmore, S. F. and P. Tattersall (1988). "The NS-1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands." *J Virol* **62**(3): 851-60.
- Cotmore, S. F. and P. Tattersall (1989). "A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles." *J Virol* **63**(9): 3902-11.
- Cotmore, S. F. and P. Tattersall (1990). "Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics." *Virology* **177**(2): 477-87.
- Cotmore, S. F. and P. Tattersall (1992). "In vivo resolution of circular plasmids containing concatemer junction fragments from minute virus of mice DNA and their subsequent replication as linear molecules." *J Virol* **66**(1): 420-31.

- Cotmore, S. F. and P. Tattersall (1994). "An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication." *Embo J* **13**(17): 4145-52.
- Cotmore, S. F. and P. Tattersall (1998). "High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin." *J Virol* **72**(11): 8477-84.
- Cudmore, S., I. Reckmann, et al. (1997). "Viral manipulations of the actin cytoskeleton." *Trends Microbiol* **5**(4): 142-8.
- Cullen, B. R. (2001). "Journey to the center of the cell." *Cell* **105**(6): 697-700.
- Cziepluch, C., E. Kordes, et al. (1998). "Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1." *J Virol* **72**(5): 4149-56.
- D'Arrigo, A., C. Bucci, et al. (1997). "Microtubules are involved in bafilomycin A1-induced tubulation and Rab5-dependent vacuolation of early endosomes." *Eur J Cell Biol* **72**(2): 95-103.
- Deleu, L., F. Fuks, et al. (1998). "Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells." *Mol Cell Biol* **18**(1): 409-19.
- Deleu, L., A. Pujol, et al. (1999). "Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection." *J Virol* **73**(5): 3877-85.
- Dennis, E. A. (1997). "The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes." *Trends Biochem Sci* **22**(1): 1-2.
- Di Pasquale, G., B. L. Davidson, et al. (2003). "Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction." *Nat Med* **9**(10): 1306-12.
- Dohner, K., A. Wolfstein, et al. (2002). "Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport." *Mol Biol Cell* **13**(8): 2795-809.
- Dorsch, S., G. Liebisch, et al. (2002). "The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity." *J Virol* **76**(4): 2014-8.
- Douar, A. M., K. Poulard, et al. (2001). "Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation." *J Virol* **75**(4): 1824-33.
- Duan, D., Q. Li, et al. (1999). "Dynamain is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection." *J Virol* **73**(12): 10371-6.
- Dunn, K. W., T. E. McGraw, et al. (1989). "Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome." *J Cell Biol* **109**(6 Pt 2): 3303-14.
- Dupressoir, T., J. M. Vanacker, et al. (1989). "Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells." *Cancer Res* **49**(12): 3203-8.
- Eichwald, V., L. Daeffler, et al. (2002). "The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells." *J Virol* **76**(20): 10307-19.
- Empig, C. J. and M. A. Goldsmith (2002). "Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses." *J Virol* **76**(10): 5266-70.
- Enrich, C., A. Pol, et al. (1999). "Dissection of the multifunctional "Receptor-Recycling" endocytic compartment of hepatocytes." *Hepatology* **30**(5): 1115-20.
- Evans, W. H. and C. Enrich (1988). "Hepatic endosome subfractions: preparation, biochemical properties and functional roles." *Prog Clin Biol Res* **270**: 155-67.
- Faisst, S., S. Bartnitzke, et al. (1990). "Persistence of parvovirus H-1 DNA in human B- and T-lymphoma cells." *Virus Res* **16**(2): 211-23.
- Faisst, S., S. R. Faisst, et al. (1995). "Isolation of a fully infectious variant of parvovirus H-1 supplanting the standard strain in human cells." *J Virol* **69**(7): 4538-43.
- Faust, E. A. and C. D. Rankin (1982). "In vitro conversion of MVM parvovirus single-stranded DNA to the replicative form by DNA polymerase alpha from Ehrlich ascites tumour cells." *Nucleic Acids Res* **10**(14): 4181-201.

- Faust, E. A. and D. C. Ward (1979). "Incomplete genomes of the parvovirus minute virus of mice: selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication." *J Virol* **32**(1): 276-92.
- Feldherr, C. M. and D. Akin (1990). "The permeability of the nuclear envelope in dividing and nondividing cell cultures." *J Cell Biol* **111**(1): 1-8.
- Feldherr, C. M., D. Akin, et al. (2001). "Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts." *J Cell Sci* **114**(Pt 24): 4621-7.
- Fernandez-Puentes, C. and L. Carrasco (1980). "Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins." *Cell* **20**(3): 769-75.
- Fuchs, R., A. Ellinger, et al. (1994). "Rat liver endocytic coated vesicles do not exhibit ATP-dependent acidification in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 4811-5.
- Fuchs, R., S. Schmid, et al. (1989). "A possible role for Na⁺,K⁺-ATPase in regulating ATP-dependent endosome acidification." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(2): 539-43.
- Fuller, W., P. Eaton, et al. (2001). "Differential centrifugation separates cardiac sarcolemmal and endosomal membranes from Langendorff-perfused rat hearts." *Anal Biochem* **293**(2): 216-23.
- Gahl, W. A. and F. Tietze (1985). "pH effects on cystine transport in lysosome-rich leucocyte granular fractions." *Biochem J* **228**(1): 263-7.
- Gardiner, E. M. and P. Tattersall (1988). "Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice." *J Virol* **62**(8): 2605-13.
- Girod, A., M. Ried, et al. (1999). "Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2." *Nat Med* **5**(9): 1052-6.
- Girod, A., C. E. Wobus, et al. (2002). "The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity." *J Gen Virol* **83**(Pt 5): 973-8.
- Glomb-Reinmund, S. and M. Kielian (1998). "The role of low pH and disulfide shuffling in the entry and fusion of Semliki Forest virus and Sindbis virus." *Virology* **248**(2): 372-81.
- Gorlich, D. (1997). "Nuclear protein import." *Curr Opin Cell Biol* **9**(3): 412-9.
- Gorlich, D. and U. Kutay (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 607-60.
- Gorlich, D. and I. W. Mattaj (1996). "Nucleocytoplasmic transport." *Science* **271**(5255): 1513-8.
- Greber, U. F., M. Willetts, et al. (1993). "Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells." *Cell* **75**(3): 477-86.
- Grewe, C., A. Beck, et al. (1990). "HIV: early virus-cell interactions." *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**(10): 965-74.
- Gruenberg, J., G. Griffiths, et al. (1989). "Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro." *J Cell Biol* **108**(4): 1301-16.
- Guetta, E., Y. Graziani, et al. (1986). "Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice." *J Natl Cancer Inst* **76**(6): 1177-80.
- Hansen, J., K. Qing, et al. (2001). "Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts." *J Virol* **75**(9): 4080-90.
- Hansen, J., K. Qing, et al. (2001). "Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2." *Mol Ther* **4**(4): 289-96.
- Hao, M. and F. R. Maxfield (2000). "Characterization of rapid membrane internalization and recycling." *J Biol Chem* **275**(20): 15279-86.
- Harada, M., S. Shakado, et al. (1997). "Bafilomycin A1, a specific inhibitor of V-type H⁺-ATPases, inhibits the acidification of endocytic structures and inhibits horseradish peroxidase uptake in isolated rat sinusoidal endothelial cells." *Liver* **17**(5): 244-50.
- Harris, C. E., R. A. Boden, et al. (1999). "A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice." *J Virol* **73**(1): 72-80.
- Hasilik, A. (1992). "The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation." *Experientia* **48**(2): 130-51.
- Hinshaw, J. E. (2000). "Dynamin and its role in membrane fission." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 483-519.

- Hoque, M., K. Ishizu, et al. (1999). "Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation." *J Virol* **73**(9): 7912-5.
- Horiuchi, M., H. Goto, et al. (1994). "Mapping of determinants of the host range for canine cells in the genome of canine parvovirus using canine parvovirus/mink enteritis virus chimeric viruses." *J Gen Virol* **75** (Pt 6): 1319-28.
- Horiuchi, M., Y. Yamaguchi, et al. (1998). "Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus." *Virology* **249**(2): 440-52.
- Hueffer, K., L. Govindasamy, et al. (2003). "Combinations of two capsid regions controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses." *J Virol* **77**(18): 10099-105.
- Hueffer, K., J. S. Parker, et al. (2003). "The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor." *J Virol* **77**(3): 1718-26.
- Ireton, K. and P. Cossart (1997). "Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*." *Annu Rev Genet* **31**: 113-38.
- Jacoby, R. O., E. A. Johnson, et al. (1995). "Characterization of mouse parvovirus infection by in situ hybridization." *J Virol* **69**(6): 3915-9.
- Janik, J. E., M. M. Huston, et al. (1981). "Locations of adenovirus genes required for the replication of adenovirus-associated virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(3): 1925-9.
- Johnson, L. S., K. W. Dunn, et al. (1993). "Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif." *Mol Biol Cell* **4**(12): 1251-66.
- Jongeneel, C. V., R. Sahli, et al. (1986). "A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus." *J Virol* **59**(3): 564-73.
- Kaludov, N., K. E. Brown, et al. (2001). "Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity." *J Virol* **75**(15): 6884-93.
- Kielian, M. (1995). "Membrane fusion and the alphavirus life cycle." *Adv Virus Res* **45**: 113-51.
- Kielian, M. and A. Helenius (1985). "pH-induced alterations in the fusogenic spike protein of Semliki Forest virus." *J Cell Biol* **101**(6): 2284-91.
- Kilham, L. and G. Margolis (1965). "Cerebellar Disease in Cats Induced by Inoculation of Rat Virus." *Science* **148**: 244-6.
- Kilham, L., G. Margolis, et al. (1970). "Enhanced proliferation of H-1 virus in livers of rats infected with *Cysticercus fasciolaris*." *J Infect Dis* **121**(6): 648-52.
- King, J. A., R. Dubielzig, et al. (2001). "DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids." *Embo J* **20**(12): 3282-91.
- Kirn, D. H. and F. McCormick (1996). "Replicating viruses as selective cancer therapeutics." *Mol Med Today* **2**(12): 519-27.
- Knipe, D. M. (1996). *Virus-host cell interactions*.
- Kollek, R., B. Y. Tseng, et al. (1982). "DNA polymerase requirements for parvovirus H-1 DNA replication in vitro." *J Virol* **41**(3): 982-9.
- Kordes, E., L. Savelyeva, et al. (1998). "Isolation and characterization of human SGT and identification of homologues in *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*." *Genomics* **52**(1): 90-4.
- Kotin, R. M., M. Siniscalco, et al. (1990). "Site-specific integration by adeno-associated virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2211-5.
- Krady, J. K. and D. C. Ward (1995). "Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1." *Mol Cell Biol* **15**(1): 524-33.
- Kramer, R. M. and J. D. Sharp (1997). "Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)." *FEBS Lett* **410**(1): 49-53.
- Labieniec-Pintel, L. and D. Pintel (1986). "The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins." *J Virol* **57**(3): 1163-7.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Legendre, D. and J. Rommelaere (1992). "Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition." *J Virol* **66**(10): 5705-13.

- Legendre, D. and J. Rommelaere (1994). "Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice." *J Virol* **68**(12): 7974-85.
- Legrand, C., J. Rommelaere, et al. (1993). "MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells." *Virology* **195**(1): 149-55.
- Lemmon, S. K. (2001). "Clathrin uncoating: Auxilin comes to life." *Curr Biol* **11**(2): R49-52.
- Leopold, P. L., G. Kreitzer, et al. (2000). "Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis." *Hum Gene Ther* **11**(1): 151-65.
- Li, X. and S. L. Rhode, 3rd (1990). "Mutation of lysine 405 to serine in the parvovirus H-1 NS1 abolishes its functions for viral DNA replication, late promoter trans activation, and cytotoxicity." *J Virol* **64**(10): 4654-60.
- Li, X. and S. L. Rhode, 3rd (1991). "Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro." *Virology* **184**(1): 117-30.
- Li, Y., Z. Zadori, et al. (2001). "Genome organization of the densovirus from *Bombyx mori* (BmDNV-1) and enzyme activity of its capsid." *J Gen Virol* **82**(Pt 11): 2821-5.
- Lin, S. X., G. G. Gundersen, et al. (2002). "Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin." *Mol Biol Cell* **13**(1): 96-109.
- Linser, P., H. Bruning, et al. (1979). "Uptake of minute virus of mice into cultured rodent cells." *J Virol* **31**(2): 537-45.
- Liu, J. M., S. W. Green, et al. (1992). "A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus." *J Virol* **66**(8): 4686-92.
- Lombardo, E., J. C. Ramirez, et al. (2000). "A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly." *J Virol* **74**(8): 3804-14.
- Lombardo, E., J. C. Ramirez, et al. (2002). "Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection." *J Virol* **76**(14): 7049-59.
- Luby-Phelps, K. (1994). "Physical properties of cytoplasm." *Curr Opin Cell Biol* **6**(1): 3-9.
- Luby-Phelps, K. (2000). "Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area." *Int Rev Cytol* **192**: 189-221.
- Lukashov, V. V. and J. Goudsmit (2001). "Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses." *J Virol* **75**(6): 2729-40.
- Ma, Y., T. Greener, et al. (2002). "Identification of domain required for catalytic activity of auxilin in supporting clathrin uncoating by Hsc70." *J Biol Chem* **277**(51): 49267-74.
- Mandelkow, E. and E. M. Mandelkow (1995). "Microtubules and microtubule-associated proteins." *Curr Opin Cell Biol* **7**(1): 72-81.
- Marjomaki, V., V. Pietiainen, et al. (2002). "Internalization of echovirus 1 in caveolae." *J Virol* **76**(4): 1856-65.
- Marsh, M. (1984). "The entry of enveloped viruses into cells by endocytosis." *Biochem J* **218**(1): 1-10.
- Marsh, M. (2001). Endocytosis. *Frontiers in Molecular Biology*. M. Marsh. Oxford, Oxford University Press.
- Marsh, M. and A. Helenius (1989). "Virus entry into animal cells." *Adv Virus Res* **36**: 107-51.
- Marsh, M. and A. Pelchen-Matthews (2000). "Endocytosis in viral replication." *Traffic* **1**(7): 525-32.
- Martinez, C. G., R. Guinea, et al. (1996). "The entry of reovirus into L cells is dependent on vacuolar proton-ATPase activity." *J Virol* **70**(1): 576-9.
- Matlin, K. S., H. Reggio, et al. (1981). "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line." *J Cell Biol* **91**(3 Pt 1): 601-13.
- Maxwell, I. H., K. L. Terrell, et al. (2002). "Autonomous parvovirus vectors." *Methods* **28**(2): 168-81.
- Mayor, S., J. F. Presley, et al. (1993). "Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process." *J Cell Biol* **121**(6): 1257-69.

- McClure, M. O., M. Marsh, et al. (1988). "Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism." *Embo J* **7**(2): 513-8.
- Meier, O., K. Boucke, et al. (2002). "Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake." *J Cell Biol* **158**(6): 1119-31.
- Mellman, I. (1996). "Endocytosis and molecular sorting." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 575-625.
- Mills, I. G., A. T. Jones, et al. (1999). "Regulation of endosome fusion." *Mol Membr Biol* **16**(1): 73-9.
- Moore, A. E. and A. D. Nicastrì (1965). "Lethal infection and pathological findings in A x C rats inoculated with H virus and RV." *J Natl Cancer Inst* **35**(6): 937-47.
- Morgan, W. R. and D. C. Ward (1986). "Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all minute virus of mice RNAs." *J Virol* **60**(3): 1170-4.
- Morita, E., A. Nakashima, et al. (2003). "Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase." *J Virol* **77**(5): 2915-21.
- Morrisette, N., E. Gold, et al. (1999). "The macrophage--a cell for all seasons." *Trends Cell Biol* **9**(5): 199-201.
- Mousset, S., Y. Ouadrhiri, et al. (1994). "The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression." *J Virol* **68**(10): 6446-53.
- Mukherjee, S., R. N. Ghosh, et al. (1997). "Endocytosis." *Physiol Rev* **77**(3): 759-803.
- Naeger, L. K., J. Cater, et al. (1990). "The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner." *J Virol* **64**(12): 6166-75.
- Naeger, L. K., N. Salome, et al. (1993). "NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells." *J Virol* **67**(2): 1034-43.
- Naides, S. J., L. L. Scharosch, et al. (1990). "Rheumatologic manifestations of human parvovirus B19 infection in adults. Initial two-year clinical experience." *Arthritis Rheum* **33**(9): 1297-309.
- Nakabayashi, H., K. Taketa, et al. (1982). "Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium." *Cancer Res* **42**(9): 3858-63.
- Nigg, E. A. (1997). "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation." *Nature* **386**(6627): 779-87.
- Nuesch, J. P., S. F. Cotmore, et al. (1992). "Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: effects of mutations in the nucleotide-binding motif." *Virology* **191**(1): 406-16.
- Nuesch, J. P., S. F. Cotmore, et al. (1995). "Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine." *Virology* **209**(1): 122-35.
- Nuesch, J. P. and P. Tattersall (1993). "Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport." *Virology* **196**(2): 637-51.
- Nussbaum, O., A. Roop, et al. (1993). "Sequences determining the pH dependence of viral entry are distinct from the host range-determining region of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins." *J Virol* **67**(12): 7402-5.
- Ojala, P. M., B. Sodeik, et al. (2000). "Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro." *Mol Cell Biol* **20**(13): 4922-31.
- Op De Beeck, A., F. Anouja, et al. (1995). "The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2." *Cell Growth Differ* **6**(7): 781-7.
- Op De Beeck, A. and P. Caillet-Fauquet (1997). "The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin?" *J Virol* **71**(7): 5323-9.
- Op De Beeck, A. and P. Caillet-Fauquet (1997). "Viruses and the cell cycle." *Prog Cell Cycle Res* **3**: 1-19.
- Op De Beeck, A., J. Sobczak-Thepot, et al. (2001). "NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1)." *J Virol* **75**(22): 11071-8.

- Opie, S. R., K. H. Warrington, Jr., et al. (2003). "Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding." *J Virol* **77**(12): 6995-7006.
- Ozawa, K., J. Ayub, et al. (1988). "The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells." *J Virol* **62**(8): 2884-9.
- Pante, N. and U. Aebi (1996). "Molecular dissection of the nuclear pore complex." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **31**(2): 153-99.
- Pante, N. and M. Kann (2002). "Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm." *Mol Biol Cell* **13**(2): 425-34.
- Paradiso, P. R. (1981). "Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity." *J Virol* **39**(3): 800-7.
- Parker, J. S., W. J. Murphy, et al. (2001). "Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells." *J Virol* **75**(8): 3896-902.
- Parker, J. S. and C. R. Parrish (2000). "Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking." *J Virol* **74**(4): 1919-30.
- Parrish, C. R. (1990). "Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses." *Adv Virus Res* **38**: 403-50.
- Parrish, C. R. (1991). "Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones." *Virology* **183**(1): 195-205.
- Parton, R. G. (2003). "Caveolae--from ultrastructure to molecular mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(2): 162-7.
- Pastan, I., P. Seth, et al. (1996). Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem. *Concepts in Viral Pathogenesis II*. AL. Notkins and M. Oldstone. New York, Springer Verlag: 141-46.
- Perez, L. and L. Carrasco (1994). "Involvement of the vacuolar H(+)-ATPase in animal virus entry." *J Gen Virol* **75 (Pt 10)**: 2595-606.
- Pillay, C. S., E. Elliott, et al. (2002). "Endolysosomal proteolysis and its regulation." *Biochem J* **363**(Pt 3): 417-29.
- Pisoni, R. L. and J. G. Thoene (1991). "The transport systems of mammalian lysosomes." *Biochim Biophys Acta* **1071**(4): 351-73.
- Pless, D. D. and R. B. Wellner (1996). "In vitro fusion of endocytic vesicles: effects of reagents that alter endosomal pH." *J Cell Biochem* **62**(1): 27-39.
- Prasad, K. M. and J. P. Trempe (1995). "The adeno-associated virus Rep78 protein is covalently linked to viral DNA in a preformed virion." *Virology* **214**(2): 360-70.
- Prchla, E., E. Kuechler, et al. (1994). "Uncoating of human rhinovirus serotype 2 from late endosomes." *J Virol* **68**(6): 3713-23.
- Presley, J. F., S. Mayor, et al. (1997). "Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling." *J Biol Chem* **272**(21): 13929-36.
- Pressman, B. C. (1976). "Biological applications of ionophores." *Annu Rev Biochem* **45**: 501-30.
- Pritchard, C., E. R. Stout, et al. (1981). "Replication of parvoviral DNA. I. Characterization of a nuclear lysate system." *J Virol* **37**(1): 352-62.
- Pujol, A., L. Deleu, et al. (1997). "Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1." *J Virol* **71**(10): 7393-403.
- Qing, K., C. Mah, et al. (1999). "Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2." *Nat Med* **5**(1): 71-7.
- Qiu, J., A. Handa, et al. (2000). "The interaction of heparin sulfate and adeno-associated virus 2." *Virology* **269**(1): 137-47.
- Rabinowitz, J. E. and R. J. Samulski (2000). "Building a better vector: the manipulation of AAV virions." *Virology* **278**(2): 301-8.
- Reed, A. P., E. V. Jones, et al. (1988). "Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus." *J Virol* **62**(1): 266-76.
- Reguera, J., A. Carreira, et al. (2004). "Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 2724-9.

- Ren, M., G. Xu, et al. (1998). "Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6187-92.
- Rhode, S. L., 3rd and P. R. Paradiso (1983). "Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation." *J Virol* **45**(1): 173-84.
- Richterova, Z., D. Liebl, et al. (2001). "Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei." *J Virol* **75**(22): 10880-91.
- Ried, M. U., A. Girod, et al. (2002). "Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors." *J Virol* **76**(9): 4559-66.
- Ros, C., C. J. Burckhardt, et al. (2002). "Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction." *J Virol* **76**(24): 12634-45.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." *Cell* **68**(4): 673-82.
- Salome, N., B. van Hille, et al. (1990). "Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMP is restricted to specific oncogenes." *Oncogene* **5**(1): 123-30.
- Samulski, R. J., X. Zhu, et al. (1991). "Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19." *Embo J* **10**(12): 3941-50.
- Sandvig, K. and B. van Deurs (2002). "Membrane traffic exploited by protein toxins." *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 1-24.
- Santaren, J. F., J. C. Ramirez, et al. (1993). "Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMP: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis." *J Virol* **67**(9): 5126-38.
- Schoborg, R. V. and D. J. Pintel (1991). "Accumulation of MVM gene products is differentially regulated by transcription initiation, RNA processing and protein stability." *Virology* **181**(1): 22-34.
- Seisenberger, G., M. U. Ried, et al. (2001). "Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus." *Science* **294**(5548): 1929-32.
- Seksek, O., J. Biwersi, et al. (1997). "Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus." *J Cell Biol* **138**(1): 131-42.
- Shein, H. M. and J. F. Enders (1962). "Multiplication and cytopathogenicity of Simian vacuolating virus 40 in cultures of human tissues." *Proc Soc Exp Biol Med* **109**: 495-500.
- Shi, W., G. S. Arnold, et al. (2001). "Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors." *Hum Gene Ther* **12**(14): 1697-711.
- Shi, W. and J. S. Bartlett (2003). "RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism." *Mol Ther* **7**(4): 515-25.
- Siegl, G. (1984). *The parvoviruses*. K. I. Berns. New York, Plenum New York.
- Siegl, G., R. C. Bates, et al. (1985). "Characteristics and taxonomy of Parvoviridae." *Intervirology* **23**(2): 61-73.
- Simonsen, A., A. E. Wurmser, et al. (2001). "The role of phosphoinositides in membrane transport." *Curr Opin Cell Biol* **13**(4): 485-92.
- Sodeik, B. (2000). "Mechanisms of viral transport in the cytoplasm." *Trends Microbiol* **8**(10): 465-72.
- Sodeik, B., M. W. Ebersold, et al. (1997). "Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus." *J Cell Biol* **136**(5): 1007-21.
- Sol, N., J. Le Junter, et al. (1999). "Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19." *J Virol* **73**(10): 8762-70.
- Somsel Rodman, J. and A. Wandinger-Ness (2000). "Rab GTPases coordinate endocytosis." *J Cell Sci* **113 Pt 2**: 183-92.
- Srivastava, A. (1994). "Parvovirus-based vectors for human gene therapy." *Blood Cells* **20**(2-3): 531-6; discussion 536-8.

- Sturzenbecker, L. J., M. Nibert, et al. (1987). "Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the viral infectious cycle." *J Virol* **61**(8): 2351-61.
- Suikkanen, S., T. Aaltonen, et al. (2003). "Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus." *J Virol* **77**(19): 10270-9.
- Suikkanen, S., M. Antila, et al. (2003). "Release of canine parvovirus from endocytic vesicles." *Virology* **316**(2): 267-80.
- Suikkanen, S., K. Saajarvi, et al. (2002). "Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus." *J Virol* **76**(9): 4401-11.
- Summerford, C., J. S. Bartlett, et al. (1999). "AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection." *Nat Med* **5**(1): 78-82.
- Summerford, C. and R. J. Samulski (1998). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions." *J Virol* **72**(2): 1438-45.
- Suomalainen, M., M. Y. Nakano, et al. (2001). "Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus." *Embo J* **20**(6): 1310-9.
- Suomalainen, M., M. Y. Nakano, et al. (1999). "Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus." *J Cell Biol* **144**(4): 657-72.
- Tattersall, P., P. J. Cawte, et al. (1976). "Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus." *J Virol* **20**(1): 273-89.
- Tattersall, P. and S. F. Cotmore (1988). The nature of parvoviruses. *Parvovirus and human disease*. J. R. Pattison, CRC Press, Boca Raton: 5-41.
- Tattersall, P. and D. C. Ward (1976). "Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA." *Nature* **263**(5573): 106-9.
- Tawfeek, H. A. and A. B. Abou-Samra (2004). "Important role for the V-type H(+)-ATPase and the Golgi apparatus in the recycling of PTH/PTHrP receptor." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**(5): E704-10.
- Thacker, T. C. and F. B. Johnson (1998). "Binding of bovine parvovirus to erythrocyte membrane sialoglycoproteins." *J Gen Virol* **79** (Pt 9): 2163-9.
- Tomko, R. P., R. Xu, et al. (1997). "HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3352-6.
- Toolan, H. W. (1960). "Experimental production of mongoloid hamsters." *Science* **131**: 1446-8.
- Toolan, H. W. and N. Ledinko (1968). "Inhibition by H-1 virus of the incidence of tumors produced by adenovirus 12 in hamsters." *Virology* **35**(3): 475-8.
- Toolan, H. W., S. L. Rhode, 3rd, et al. (1982). "Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors in Syrian hamsters by prior infection with H-1 parvovirus." *Cancer Res* **42**(7): 2552-5.
- Toolan, H. W., E. L. Saunders, et al. (1965). "H-1 Virus Viremia in the Human." *Proc Soc Exp Biol Med* **119**: 711-5.
- Truyen, U., J. F. Evermann, et al. (1996). "Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range." *Virology* **215**(2): 186-9.
- Tsao, J., M. S. Chapman, et al. (1991). "The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications." *Science* **251**(5000): 1456-64.
- Tsao, J., M. S. Chapman, et al. (1992). "Structure determination of monoclinic canine parvovirus." *Acta Crystallogr B* **48** (Pt 1): 75-88.
- Tullis, G. E., L. R. Burger, et al. (1992). "The trypsin-sensitive RVER domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but not for proteolytic processing in vivo." *Virology* **191**(2): 846-57.
- Tullis, G. E., L. R. Burger, et al. (1993). "The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity." *J Virol* **67**(1): 131-41.
- Tullis, G. E., L. Labieniec-Pintel, et al. (1988). "Generation and characterization of a temperature-sensitive mutation in the NS-1 gene of the autonomous parvovirus minute virus of mice." *J Virol* **62**(8): 2736-44.

- Umata, T., Y. Moriyama, et al. (1990). "The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase." *J Biol Chem* **265**(35): 21940-5.
- van Weert, A. W., K. W. Dunn, et al. (1995). "Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump." *J Cell Biol* **130**(4): 821-34.
- Vanacker, J. M., R. Corbau, et al. (1996). "Transactivation of a cellular promoter by the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice through a putative hormone-responsive element." *J Virol* **70**(4): 2369-77.
- Varga, M. J., C. Weibull, et al. (1991). "Infectious entry pathway of adenovirus type 2." *J Virol* **65**(11): 6061-70.
- Vihinen-Ranta, M., L. Kakkola, et al. (1997). "Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins." *Eur J Biochem* **250**(2): 389-94.
- Vihinen-Ranta, M., A. Kalela, et al. (1998). "Intracellular route of canine parvovirus entry." *J Virol* **72**(1): 802-6.
- Vihinen-Ranta, M., D. Wang, et al. (2002). "The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection." *J Virol* **76**(4): 1884-91.
- Vihinen-Ranta, M., W. Yuan, et al. (2000). "Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport." *J Virol* **74**(10): 4853-9.
- Walters, R. W., S. M. Yi, et al. (2001). "Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer." *J Biol Chem* **276**(23): 20610-6.
- Wang, D. and C. R. Parrish (1999). "A heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-related protein binds to single-stranded DNA near the 5' end or within the genome of feline parvovirus and can modify virus replication." *J Virol* **73**(9): 7761-8.
- Wang, D., W. Yuan, et al. (1998). "Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus." *Virology* **240**(2): 273-81.
- Wang, L. H., K. G. Rothberg, et al. (1993). "Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation." *J Cell Biol* **123**(5): 1107-17.
- Weichert, W. S., J. S. Parker, et al. (1998). "Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection." *Virology* **250**(1): 106-17.
- Welch, M. D., A. Iwamatsu, et al. (1997). "Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*." *Nature* **385**(6613): 265-9.
- Werling, D., J. C. Hope, et al. (1999). "Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cells." *J Leukoc Biol* **66**(1): 50-8.
- White, J., M. Kielian, et al. (1983). "Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses." *Q Rev Biophys* **16**(2): 151-95.
- Whittaker, G. R. and A. Helenius (1998). "Nuclear import and export of viruses and virus genomes." *Virology* **246**(1): 1-23.
- Whittaker, G. R., M. Kann, et al. (2000). "Viral entry into the nucleus." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 627-51.
- Wickham, T. J., P. Mathias, et al. (1993). "Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment." *Cell* **73**(2): 309-19.
- Wilson, G. M., H. K. Jindal, et al. (1991). "Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities." *Virology* **185**(1): 90-8.
- Wistuba, A., S. Weger, et al. (1995). "Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins." *J Virol* **69**(9): 5311-9.
- Woodman, P. G. (2000). "Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5." *Traffic* **1**(9): 695-701.
- Woolf, A. D., G. V. Campion, et al. (1989). "Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults." *Arch Intern Med* **149**(5): 1153-6.
- Wu, H. and M. G. Rossmann (1993). "The canine parvovirus empty capsid structure." *J Mol Biol* **233**(2): 231-44.
- Wu, P., W. Xiao, et al. (2000). "Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism." *J Virol* **74**(18): 8635-47.

-
- Xie, Q., W. Bu, et al. (2002). "The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10405-10.
- Xie, Q. and M. S. Chapman (1996). "Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution." J Mol Biol **264**(3): 497-520.
- Yan, Z., R. Zak, et al. (2002). "Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors." J Virol **76**(5): 2043-53.
- Yang, Q., M. Mamounas, et al. (1998). "Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adenoassociated virus vectors for gene therapy." Hum Gene Ther **9**(13): 1929-37.
- Yuan, W. and C. R. Parrish (2000). "Comparison of two single-chain antibodies that neutralize canine parvovirus: analysis of an antibody-combining site and mechanisms of neutralization." Virology **269**(2): 471-80.
- Zadori, Z., J. Szelei, et al. (2001). "A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity." Dev Cell **1**(2): 291-302.

Verpflichtungserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Lebenslauf

Name	Holger Ahrens	
geboren	am 17.07.1977 in Gelnhausen	
Familienstand	ledig	
Schulbildung	8/1983 – 6/1987	Diesterweg Grundschule Herborn
	8/1987 – 6/1996	Johanneum Gymnasium Herborn Abschluss Abitur
Dienst	7/1996 – 4/1997	Grundwehrdienst im Bundeswehrkrankenhaus Hamm
Studium	4/1997 – 9/2003	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
	11/2003	Abschluss des Studiums mit der Ärztlichen Prüfung
	seit 01/2005	Assistenzarzt der Medizinischen Klinik, St. Vincenz-Krankenhaus in Limburg
Dissertation	Experimentelle Dissertation am Institut für Medizinische Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bei Herrn Prof. Dr. M. Kann Promotionsförderung im DFG-Graduiertenkolleg „Biochemie von Nukleoproteinkomplexen“	

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Kann für die Überlassung der interessanten Fragestellung, sowie für seine engagierte Betreuung während des experimentellen Teiles der Arbeit, ständige Diskussionsbereitschaft jeglicher Art und anregenden Ideen. Ich möchte mich bei Ihm für die Durchsicht und hilfreichen Anmerkungen zu der vorliegenden Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich danke ich für die Bereitstellung der wissenschaftlichen Rahmenbedingungen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die stete Bereitschaft zu anregen Diskussionen und Schaffung einer angenehmen, immer hilfsbereiten Atmosphäre bedanken, die ich während der vielen langen Labortage genossen habe.

Im besonderen danke ich meinen Brüdern, Ingo und Nils, für das stete Interesse während aller Phasen dieser Arbeit und anregenden Ideen und Motivation in verzweifelten Lagen während des Zusammenschreibens.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich die gesamte Zeit über mit Geduld unterstützt haben und voll Interesse meinen beruflichen und privaten Weg begleitet haben. Vielen, vielen Dank!