

**Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Aufnahmemechanismus  
von Parvovirus B19 bei der endothelialen Parvovirus B19-  
Infektion  
und  
Adenovirus-induzierte Reaktivierung von Parvovirus B19 in  
Endothelzellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom Biologin Tanja Donatina Pozzuto

aus Berlin

eingereicht im Juli 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2006 bis Juli 2012 (inklusive Mutterschutz und Elternzeit von März 2011 bis Mai 2012) unter der Leitung von PD Dr. Stefan Weger in Kooperation mit Dr. Henry Fechner in der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie, Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin, angefertigt.

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Stefan Weger  
Zentrum 5, Institut für Virologie  
Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin  
Hindenburgdamm 27  
D-12203 Berlin
  
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel  
Institut für Biologie-Pflanzenphysiologie, Biochemie der  
Pflanzen und Mikrobiologie  
Königin-Luise-Strasse 12-14  
D-14195 Berlin

Disputation am 15.10.2012

1	Einleitung .....	6
1.1	Parvovirus B19 (B19V).....	6
1.1.1	Taxonomische Einordnung von B19V .....	6
1.1.2	Morphologie .....	7
1.1.3	Genomstruktur und -organisation.....	8
1.1.4	Virusproteine .....	10
1.1.4.1	Nichtstrukturproteine .....	10
1.1.4.2	Strukturproteine.....	11
1.1.5	B19V-Rezeptor-Wechselwirkungen und -Aufnahmemechanismen .....	11
1.1.5.1	Blutgruppen P-Antigen .....	11
1.1.5.2	$\alpha_5\beta_1$ -Integrin .....	12
1.1.5.3	Ku80-Autoantigen.....	13
1.1.5.4	B19V-Aufnahmemechanismen .....	14
1.1.6	Replikation .....	15
1.1.7	Epidemiologie und Übertragung .....	17
1.1.8	Pathogenese und Tropismus .....	17
1.1.9	Krankheitsbilder .....	19
1.1.9.1	B19V-assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie .....	19
1.2	Adenovirale Helferfunktionen bei der Parvovirusinfektion.....	22
1.3	Zielsetzungen .....	23
2	Material .....	24
2.1	Bakterienstämme .....	24
2.2	Bakterien-Medien.....	24
2.3	Plasmide .....	24
2.4	eukaryotische Zellen .....	27
2.5	Antikörper .....	27
2.5.1	primäre Antikörper .....	27
2.5.2	sekundäre Antikörper .....	28
2.6	Enzyme.....	28
2.7	Nukleinsäure.....	29
2.7.1	Oligonukleotide .....	29
2.7.2	Taq-Man Sonden .....	29
2.7.3	DNA-Größenstandards.....	29
2.8	Reagenzsysteme .....	30
2.9	Lösungen und Puffer .....	30
2.10	Geräte .....	31
2.11	Chemikalien .....	32
2.12	Antibiotika.....	35
2.13	Viren und virale Vektoren.....	35
2.13.1	Viren.....	35
2.13.2	virale Vektoren.....	36
2.14	sonstige Materialien .....	36
2.15	Software .....	36
3	Methoden.....	38
3.1	Arbeiten mit Bakterien .....	38
3.1.1	Herstellung chemokompetenter Bakterien .....	38
3.1.2	Transformation chemokompetenter Bakterien.....	38
3.1.3	Konservierung von Bakterienzellen .....	39
3.2	DNA- und RNA-Techniken .....	39
3.2.1	DNA-Isolierung aus Bakterien.....	39
3.2.1.1	Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (Minipräparation) .....	39

3.2.1.2	Plasmidpräparation in großem Maßstab (Maxipräparation) .....	39
3.2.2	Isolierung eukaryotischer DNA aus Zellen .....	40
3.2.3	Isolierung viraler DNA.....	40
3.2.4	Isolierung niedermolekularer DNA aus eukaryotischen Zellen.....	40
3.2.5	DNA-Extraktion durch Phenol-Chloroform.....	41
3.2.6	DNA-Extraktion aus einem Agarosegel.....	41
3.2.7	DNA-Fällung.....	41
3.2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....	42
3.2.9	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen.....	42
3.2.10	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	43
3.3	DNA-Rekombinationstechniken .....	43
3.3.1	Restriktionsanalyse.....	43
3.3.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	43
3.3.3	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	44
3.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten .....	44
3.4	Polymerasekettenreaktion .....	45
3.4.1	Prinzip der DNA-Amplifikation mittels PCR .....	45
3.4.2	DNA-Amplifizierung mittels PCR.....	45
3.4.3	Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR .....	46
3.4.4	quantitative Real-Time-PCR.....	47
3.4.5	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion .....	50
3.4.6	Sequenzierung von DNA .....	50
3.5	Plasmid-Konstruktion.....	51
3.6	Zellbiologische Methoden.....	51
3.6.1	Kultivierung von Zellen .....	51
3.6.2	Zellzahlbestimmung .....	52
3.6.3	Konservierung und Reaktivierung von Zellen .....	52
3.6.4	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	53
3.7	Virologische Methoden .....	54
3.7.1	B19V-Extraktion aus Serum .....	54
3.7.2	Bestimmung der biologisch aktiven adenoviralen Partikelkonzentration.....	54
3.7.3	Infektion von Zellkulturen .....	55
3.7.3.1	Ko-Infektion von B19V und Ad2 bzw. Ad5 .....	55
3.7.3.2	Infektion mit Ad2 bzw. Ad5 mit anschließender Transfektion.....	55
3.8	Nachweismethoden der Proteinexpression.....	56
3.8.1	Durchflusszytometrie .....	56
3.8.2	Indirekte Immunfluoreszenz .....	57
3.8.3	Luciferase-Assay.....	58
3.9	Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen .....	58
3.9.1	DNA-Transfer mittels Southern-Blot.....	58
3.9.2	Kapillar-Blot.....	59
3.9.3	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	60
3.9.4	Reinigung radioaktiv markierter Sonden .....	60
3.9.5	Hybridisierung von Nukleinsäuren mit markierten DNA-Fragmenten.....	61
3.9.6	Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte.....	61
3.9.7	Waschen radioaktiv markierter DNA-Fragmente .....	61
3.10	Statistische Evaluierung .....	62
4	Ergebnisse .....	63
4.1	Rezeptor-vermittelte Bindung und Internalisierung von B19V .....	63
4.1.1	Analyse der B19V Rezeptorexpression in Endothelzellen .....	63
4.1.2	B19V-Bindung und -Internalisierung in Endothelzellen .....	69

4.1.3	Einfluss der Polarität von Endothelzellen auf die B19V-Infektion.....	71
4.1.4	Einfluss der $\beta_1$ -Integrin-Aktivierung auf die B19V-Internalisierung .....	73
4.2	Adenovirus-induzierte B19V-Transaktivierung.....	74
4.2.1	B19V Protein-Expression nach Ko-Infektion mit Adenovirus .....	75
4.2.2	Einfluss der Adenovirus Ko-Infektion auf die B19V-Aufnahme und Freisetzung der B19V-DNA.....	78
4.2.3	Einfluss der adenoviralen E1A-Proteine auf die B19V-Proteinexpression.....	81
4.2.4	Adenovirus-vermittelte Tansaktivierung des isolierten B19V p6-Promotors im Kontext eines einzelsträngigen Genoms .....	83
4.2.5	Transaktivierende Wirkung von Adenovirus auf den isolierten p6-Promotor .	86
4.2.5.1	Transaktivierende Wirkung adenoviraler Funktionen und B19V-NS1 auf den isolierten p6-Promotor.....	88
4.2.5.2	Analyse zur transaktivierenden Wirkung der adenoviralen Funktionen des pHelper-Plasmids .....	92
4.2.6	Transaktivierende Funktion der E1A-Proteine .....	94
4.2.7	Synthese von B19V DNA-Replikationsintermediaten nach Ko-Infektion mit Adenovirus in Endothelzellen .....	97
5	Diskussion .....	100
5.1	Rezeptor-vermittelte B19V-Bindung und -Internalisierung in Endothelzellen .....	101
5.1.1	Analyse der B19V-Bindung und -Internalisierung in Endothelzellen .....	102
5.1.2	Einfluss der Polarität von Endothelzellen auf die B19V-Internalisierung .....	104
5.1.3	Einfluss der $\beta_1$ -Integrin-Aktivierung auf die B19V-Internalisierung .....	105
5.1.4	Alternative B19V-Aufnahmemechanismen in Endothelzellen .....	105
5.2	Reaktivierung von B19V durch Adenovirus .....	106
5.2.1	Einfluss der Adenovirus Ko-Infektion auf die B19V-Proteinexpression in Endothelzellen .....	107
5.2.2	Einfluss der adenoviralen E1A-Proteine auf die B19V-Proteinexpression....	110
5.2.3	Analyse zur Rolle der pHelper-Funktionen in der Transaktivierung des p6- Promotors .....	111
5.2.4	Analyse cis-regulatorischer Domänen des p6-Promotors .....	113
5.2.5	Einfluss von NS1 auf die B19V-Promotoraktivität.....	115
5.2.6	Synthese von B19V DNA-Replikationsintermediaten nach Ko-Infektion mit Adenovirus in Endothelzellen .....	115
5.2.7	Physiologische Relevanz der adenoviralen Transaktivierung von B19V .....	117
6	Zusammenfassung .....	118
7	Summary .....	121
8	Literatur .....	123
9	Abkürzungsverzeichnis .....	140
10	Anhang .....	142
11	Danksagung .....	146
12	Publikationsliste .....	147
	Lebenslauf .....	148
	Erklärung .....	149

# 1 Einleitung

## 1.1 Parvovirus B19 (B19V)

Parvovirus B19 (B19V) wurde 1975 zufällig bei der Untersuchung von Patientenseren auf Hepatitis B entdeckt. Die Bezeichnung B19 ist auf die Kodierung der entsprechend kontaminierten Probe zurückzuführen (Nummer 19 der Reihe B) (1). 1980 wurden erste Indizien für die Pathogenität von B19V erhalten, als es in den Blutproben zweier Patienten mit einer fiebrigen Erkrankung detektiert wurde (2). Später wurde B19V als ätiologisches Agens für die transiente aplastische Krise (3) und das Erythema infectiosum identifiziert (4). Aufgrund seiner Erscheinungsform im Elektronenmikroskop wurde das Virus der Familie der *Parvoviridae* zugeordnet (lat. *parvus* = klein). Dies ließ sich durch die Analyse extrahierter DNA aus Virionen bestätigen (5).

### 1.1.1 Taxonomische Einordnung von B19V

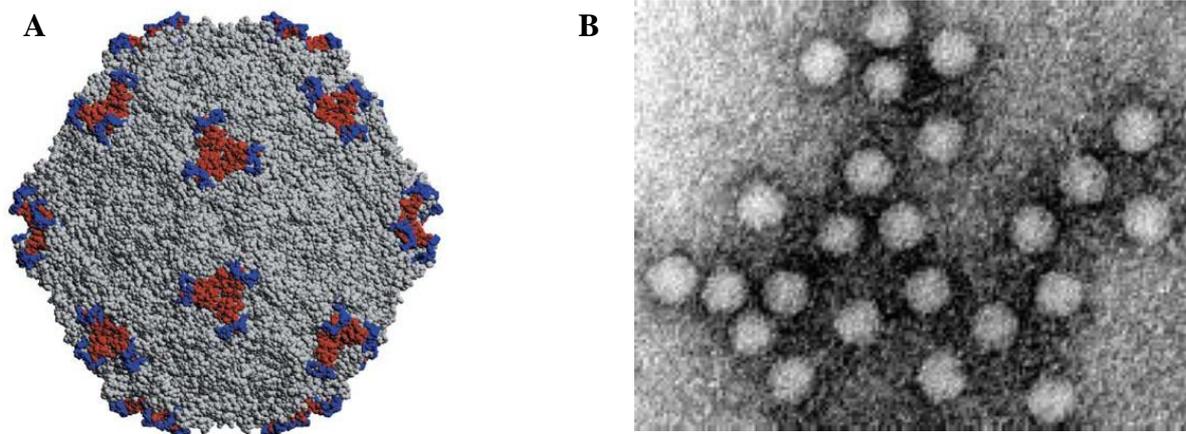
B19V gehört in die Unterfamilie *Parvovirinae* der Familie der *Parvoviridae*. *Parvovirinae* setzt sich aus den Gattungen Parvovirus, Erythrovirus, Bocavirus, Amdovirus und Dependovirus zusammen. Zu den Dependoviren werden alle humanen und tierischen Adeno-assoziierten Viren (AAV) gezählt, welche als apathogen gelten und für die Genomreplikation auf eine Ko-Infektion mit Adenoviren oder Herpesviren als Helfervirus angewiesen sind (6). Bei den Viren der restlichen Gattungen handelt es sich um autonom replizierende Viren. Aufgrund seines Zelltropismus für erythroide Vorläuferzellen wurde B19V innerhalb der *Parvoviridae* der Gattung Erythrovirus zugeordnet und in drei Genotypen unterteilt (7). Die Genotypen 2 (LaLi und A6) und 3 (V9 und D91.1) weichen in ihrer Nukleotidsequenz um 11 % bzw. 12 % vom ursprünglichen Genotyp 1 (Aua) ab (8).

Tabelle 1-1: Taxonomische Unterteilung der Familie der Parvoviridae (aus Modrow, Falke, Truyen und Schätzl, 2010)

<b>Unterfamilie</b>	<b>Genus</b>	<b>Mensch</b>	<b>Tier</b>	
Parvovirinae	Parvovirus		Minute Virus der Maus	
			felines Panleukopenievirus	
			porcines Parvovirus	
			canines Parvovirus	
			Nerzenteritisvirus	
		Erythrovirus	Parvovirus B19	Parvovirus der Rhesusaffen
		?	Parv4	?
				Parvovirus der Schweinsaffen
				Parvovirus des Streifenhörnchens
				Parvovirus der Javaneraffen
	Bocavirus	Humanes Bocavirus	bovines Parvovirus	
			canines Minute Virus	
	Amdovirus		Virus der Aleutenkrankheit der Nerze (ADV)	
	Dependovirus	Adeno-assoziierte Viren (AAV-2, -3, -5, -6, -9)	AAV der Affen (AAV-1, -4)	
			bovines AAV	
			Gänseparvovirus	
Densovirinae	Densovirus		Culex-pipiens-Densovirus	
	Iteravirus		Bombyx-mori-Densovirus	
	Brevidensovirus		Aedes-aegypti-Densovirus	

### 1.1.2 Morphologie

Bei B19V handelt es sich um ein nicht-umhülltes Virus mit einer Größe von etwa 25 nm. Die Viruskapside haben eine ikosaedrische Struktur und setzen sich aus 60 Kapsomeren zusammen, welche aus den beiden Strukturproteinen VP1 und VP2 bestehen (1; 9). VP2 macht mit 95 % den Hauptteil des Kapsids aus, während VP1 nur mit 4 % vertreten ist (10). Im Kapsidinneren liegt das mit dem VP2 komplexierte virale Genom. Durch das Fehlen einer Lipidhülle sind die Viruspartikel gegenüber Umwelteinflüssen extrem resistent. Das Virus ist bei 56°C über eine Stunde stabil und lipophile Lösungsmittel haben keinen Effekt (11). Zur Inaktivierung eignen sich  $\gamma$ - und UV-C Strahlen (12; 13).



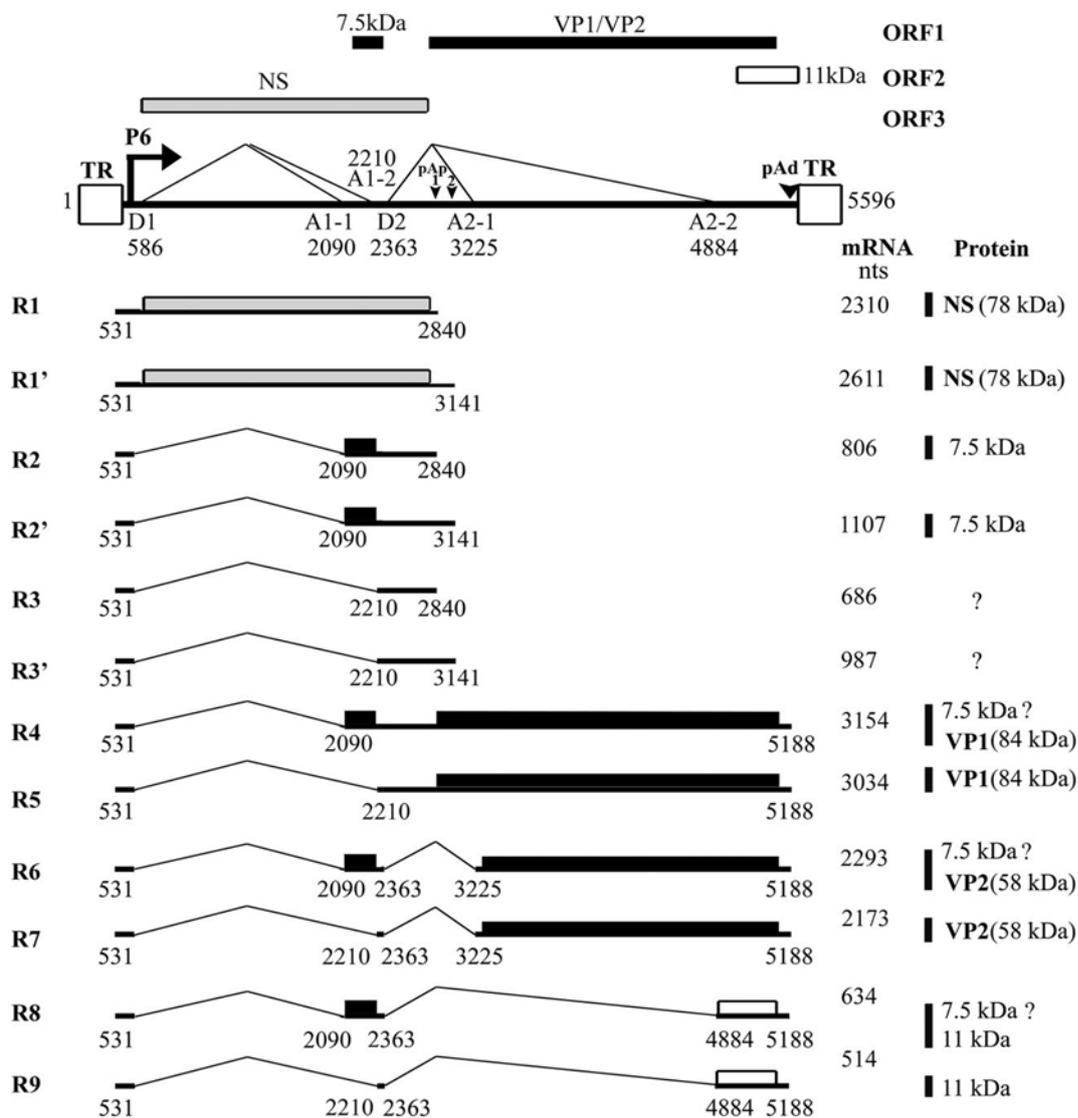
**Abbildung 1- 1 : Morphologie von B19V.** (A) röntgenkristallographische Aufnahme eines B19V-Kapsids (14); (B) elektronenmikroskopische Aufnahme von B19V-Virionen (<http://www.stanford.edu/group/virus/parvo/2005>)

### 1.1.3 Genomstruktur und -organisation

B19V besitzt ein einzelsträngiges, lineares DNA-Genom mit einer Größe von ungefähr 5600 Basen. Das Genom kann sowohl in (+)-Strang- als auch in (-)-Strang-Orientierung vorliegen, wobei die DNA-Stränge beider Orientierungen im gleichen Verhältnis in den Kapsiden vorzufinden sind. An den Genomenden befinden sich palindromische Sequenzabschnitte, die als ITRs (inverted terminal repeats) bezeichnet werden. Die 383 bp langen ITRs können über ihre Palindromsequenzen partiell einen doppelsträngigen Bereich ausbilden, welcher sowohl als T-förmige Haarnadelschleife zur Stabilisierung des DNA-Stranges als auch am 3'-OH-Ende als Primer für die Replikation dient (15; 16).

Das B19V-Genom besitzt vier offene Leserahmen (ORF). Die linken am 3'-Ende des Negativstranges gelegenen Leserahmen kodieren für das Nichtstrukturprotein NS1 und für das 7,5 kD-Protein, während von den rechten am 5'-Ende gelegenen ORFs die Strukturproteine VP1 und VP2 und das als NS2-bezeichnete 11 kD-Protein abgelesen werden. Wie in Abbildung 1-2 dargestellt werden ausgehend von dem einzigen aktiven Promotor des B19V-Genoms, dem p6-Promotor, durch alternatives Spleißen und alternative Polyadenylierung einer gemeinsamen prä-mRNA mindestens 12 Transkripte gebildet (17; 18). Es wurden zwei interne Polyadenylierungsstellen identifiziert, pAp1 und pAp2. pAp1 befindet sich an Position 2819 nt. Hier finden 90 % der internen Polyadenylierungen statt. Die restlichen 10 % erfolgen an dem an Position 3115 nt liegenden pAp2 (18). Die an den proximalen Polyadenylierungsstellen mit einem poly(A)-Ende versehenen Transkripte können

sowohl gespleißt als auch ungespleißt in der Zelle akkumulieren. Die ungespleißten mRNAs kodieren für das NS1, die gespleißten für das 7,5 kD-Protein. Bei allen B19V-Transkripten, welche an der distalen Polyadenylierungsstelle (pAd) mit einem poly(A)-Ende versehen werden, wird das erste Intron (am 3'-Ende des Negativstranges) herausgespleißt (D1 zu A1-1 oder D1 zu A1-2). Die für das Kapsidprotein VP1 kodierenden Transkripte werden keinem weiteren Spleißvorgang unterzogen. Hingegen werden die für das Kapsidprotein VP2 kodierenden mRNAs ein weiteres Mal zwischen D2 und A2-1, und die für das 11 kD-Protein kodierenden Transkripte zwischen D2 und A2-2, gespleißt.



**Abbildung 1-2: Transkriptionskarte von B19V, Genotyp 1 (19).** Dargestellt ist das B19V-Genom des J35-Isolats mit dem p6-Promotor, den Intron Donor- (D1 und D2) und Akzeptorstellen (A1-1, A1-2, A2-1, und A2-2), den internen Polyadenylierungsstellen pAp1 und pAp2, den distalen Polyadenylierungsstellen pAd und den ITRs. Die vier offenen Leserahmen sind oben dargestellt.

### 1.1.4 Virusproteine

Das B19V-Genom kodiert für mindestens fünf Proteine, die Nichtstrukturproteine NS1, 11 kD- und 7,5 kD-Protein und die Strukturproteine VP1 und VP2. Zusätzlich wurde ein kleiner offener Leserahmen in der Region des VP1 Proteins identifiziert, welcher für das Protein X (9,5 kD) kodiert, dessen Funktion noch unbekannt ist (20).

#### 1.1.4.1 Nichtstrukturproteine

Bei NS1 (77 kD) handelt es sich um ein Multifunktionsprotein mit regulatorischen und transaktivierenden Eigenschaften, welches in der frühen Phase des Infektionszyklus gebildet wird. Das NS1-Protein ist phosphoryliert und ist im Zellkern der Wirtszelle lokalisiert (21; 22). Es kann durch die Wechselwirkung mit den zellulären Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 den p6-Promotor transaktivieren (23) sowie zelluläre Promotoren, welche die Expression der immunologisch wichtigen Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  kontrollieren, steuern (24; 25). Zusätzlich konnten für das NS1 eine ATPase-, Helikase- und Endonukleaseaktivität nachgewiesen werden (26; 27). Außerdem wirkt das NS1 zytotoxisch auf die Zelle, was wahrscheinlich auf die Induktion einiger Kaspasen zurückzuführen ist, welche den TNF- $\alpha$ -Fas-abhängigen Apoptoseweg induzieren (28, 226). Des Weiteren zeigten funktionelle Analysen in Retinoblastomzellen einen pro-apoptotischen Effekt von NS1 durch die Aktivierung von Kaspase 3 mit anschließender Spaltung des Natrium-Protonen-Austauscher (NHE1), was zur Ansäuerung des Zytoplasmas und zur DNA-Fragmentierung führt (227). Über die Aktivierung von STAT3/PIAS3 ist das NS1 in der Lage die inflammatorische Signaltransduktion zu beeinflussen, und so vermutlich zur Persistenz der B19V-Infektion beitragen (29).

Die Funktion des 11 kD Proteins konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Es nimmt eine wichtige Rolle in der Virusproduktion und dem Virustransport aus dem Zellkern infizierter Zellen ein und wirkt zudem Apoptose-induzierend (20; 30).

Dem 7,5kD-Protein konnte bisher keine Funktion im Infektionszyklus von B19V zugeordnet werden.

### 1.1.4.2 Strukturproteine

Die Kapsidproteine VP1 (84 kD) und VP2 (58 kD) werden von einem sich überlappenden Leserahmen kodiert und sind am carboxyterminalen Ende sequenzgleich (27; 21). Durch 227 zusätzliche Aminosäuren am aminoterminalen Ende des VP1, der „unique region“, unterscheiden sich die beiden Proteine voneinander. Für die Synthese von VP2 wird die VP1-spezifische mRNA gespleißt, indem ein Teil des Introns und das Startcodon des VP1 entfernt werden. Die Synthese von VP2 beginnt demnach an einem anderen AUG-Triplett, jedoch im gleichen Leseraster (31). Über VP2 bindet B19V direkt an den zellulären Rezeptor P-Antigen (32). Durch VP1 scheint die Antigenität von VP2 beeinflusst zu werden, da gezeigt werden konnte, dass in Gegenwart von VP1 die Epitope auf dem VP2-Protein für Antikörper zugänglicher sind. (19) Die Immunreaktion ist jedoch hauptsächlich gegen die „unique region“ von VP1 gerichtet, die sich durch gehäufte Aminosäuresequenzvariationen auszeichnet (33-35). Zudem weist diese Region eine Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität (PLA<sub>2</sub>) auf, welche für die B19V-Infektion notwendig ist (36; 37).

### 1.1.5 B19V-Rezeptor-Wechselwirkungen und -Aufnahmemechanismen

Im Zuge einer Infektion muss das Virus zunächst an die Oberfläche der Zielzelle binden. In Abhängigkeit der funktionellen Folgen dieser Interaktion unterscheidet man zwischen zwei Typen von Oberflächenstrukturen, an die Viren binden: die Attachmentfaktoren (primäre Rezeptoren) und die Ko-Rezeptoren. Attachmentfaktoren dienen der Virusbindung und der Anreicherung der Viren an der Zelloberfläche, während die Ko-Rezeptoren aktiv an der Virusaufnahme beteiligt sind.

#### 1.1.5.1 Blutgruppen P-Antigen

Im Falle von B19V ist das Blutgruppen P-Antigen für die Bindung des Virus an die Zelloberfläche notwendig. Beim P-Antigen handelt es sich um ein Glykolipid, welches das Hauptglycosphingolipid an der Oberfläche von Erythrocyten ist. Es setzt sich aus einem Zuckeranteil und einem Lipidanteil, welcher kovalent mit einem Sphingosinrest verknüpft ist, zusammen. Menschen mit einem Gendefekt in der P-Antigen-Expression sind gegen eine B19V-Infektion resistent und entwickeln keine Antikörper gegen B19V. In Knochenmarksspendern, welche das P-Antigen nicht exprimieren, konnte keine Virusreplikation nachgewiesen werden, so dass das P-Antigen als Attachmentfaktor für B19V

gilt (38; 32; 39). Die Interaktion mit dem P-Antigen erklärt allerdings nicht vollständig den engen Zelltropismus von B19V. Das P-Antigen wird nicht nur auf Erythrozyten und deren Vorläufern exprimiert, sondern es ist auch auf einer Vielzahl weiterer Zelltypen wie Megakaryozyten, Thrombozyten, Fibroblasten und Endothelzellen vorzufinden, in denen B19V nicht repliziert (40; 41).

### **1.1.5.2 $\alpha_5\beta_1$ -Integrin**

Untersuchungen zur B19V-Aufnahme haben gezeigt, dass das Blutgruppen P-Antigen zwar die Virusbindung an die Wirtszelle vermittelt, für eine Virusaufnahme allerdings nicht ausreichend ist. Das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin wurde als potentieller Ko-Rezeptor für die Internalisierung von B19V identifiziert. An ausgereiften Erythrozyten, welche ein hohes Expressionslevel an P-Antigen aufwiesen, aber kein  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin exprimierten, konnte gezeigt werden, dass zwar eine Bindung von B19V an die Zelloberfläche erfolgte, aber die Virusaufnahme unterbunden war. In primären humanen erythroiden Vorläuferzellen, welche sowohl das P-Antigen als auch das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin an ihrer Oberfläche exprimierten, war jedoch die Virusaufnahme möglich (42).

Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle und spielen eine zentrale Rolle in der Zelladhäsion, Zellmigration, Kontrolle der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose. Sie vermitteln eine bidirektionale Signaltransduktion durch die Zellmembran. Durch die Bindung eines Liganden an die zytoplasmatische Domäne eines Integrins kann ein Signal in die Zelle vermittelt werden, welches eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, eine spezifische Genexpression oder eine zelluläre Differenzierung auslösen kann. Andererseits können intrazelluläre Signale die extrazelluläre Bindungsaffinität eines Integrins zu seinem Liganden oder die Zelladhäsion regulieren (43; 44). Integrine sind Heterodimere, die sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen. In Vertebraten sind 18 verschiedene  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, welche sich insgesamt zu 24 unterschiedlichen Heterodimeren zusammensetzen können. Beide Untereinheiten bestehen aus einer 20 bis 50 Aminosäurelangen zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembranhelix und einer langen extrazellulären Domäne, welche sich aus 700 bis 1000 Aminosäuren zusammensetzt (43; 45).

Für die Funktion als Ko-Rezeptor bei der B19V-Internalisierung konnte gezeigt werden, dass das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin in einem aktivierten Zustand vorliegen muss (42).

Abhängig von der Konformation des Integrins sind drei funktionelle Aktivierungszustände möglich: der inaktive, der geringfügig aktive und der aktive Zustand. Konformationsänderungen können u. a. durch Bindung divalenter Ionen oder Antikörper, die

eine der Zustandsformen induzieren und stabilisieren, begünstigt werden (46; 47). Zusätzlich ist die Aktivierung des Integrins von dessen Ladungszustand abhängig. Nach der Bindung multivalenter Liganden wurden laterale Bewegungen der Integrine innerhalb der Zellmembran beobachtet, mit denen der Ligandenkontakt oder die Aggregation von Integrinen ermöglicht wird, so dass es zur Bildung von Signalkomplexen bestehend aus verschiedenen Komponenten kommt. Integrine agieren somit nicht isoliert, sondern interagieren in einem Netzwerk von Integrinen, bei dem ein Integrinkomplex einen anderen Komplex aus Integrinen auf der gleichen Zellmembran negativ oder positiv beeinflussen kann. So gibt es Hinweise, dass die Ko-Rezeptorfunktion des  $\beta_1$ -Integrins bei der B19V-Aufnahme in erythroiden Vorläuferzellen innerhalb eines Integrinnetzwerkes aus  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Integrin reguliert wird (48). Zudem wurde Rap1, eine GTPase der Ras Superfamilie, als Aktivator für die Integrine  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  identifiziert (49-51). Diese wird wiederum durch Phorbolster aktiviert (52-57; 51). Über die Aktivierung von Rap1 durch ein cAMP-Analogon wurde Rap1 als zentraler Regulator der  $\beta_1$ -Integrin Ko-Rezeptorfunktion identifiziert (58).

$\alpha_5\beta_1$ -Integrin wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter auch endothelialen Zellen, wo es als Rezeptor für Fibrinogen fungiert (59). Die Bindung von Fibrinogen kann die Zelladhäsion und Migration von Endothelzellen induzieren und eine angiogenetische Reaktion auslösen (60-62).

### **1.1.5.3 Ku80-Autoantigen**

Neben  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin wurde das Ku80-Autoantigen als weiterer Ko-Rezeptor für B19V identifiziert (63). B19V-resistente HeLa-Zellen, die zwar P-Antigen und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, aber kein Ku80 auf der Zelloberfläche exprimierten, wurden durch die Expression von rekombinantem Ku80 für eine B19V-Infektion empfänglich. Zusätzlich zeigte eine Herunterregulation von Ku80 in B19V-permissiven Ku812Epo6-Zellen eine Inhibierung der B19V-Aufnahme.

Ku80 ist neben Ku70 Bestandteil eines als Ku bezeichneten heterodimerischen Proteins, welches eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt (64; 65). Zudem spielt Ku in weiteren Prozessen wie z.B. der DNA-Replikation und -Transkription (64), der Regulation der RNA Polymerase II-Aktivität (66) und der Chromatinkondensation während der G2/M Phase (67) eine wichtige Rolle. Es besitzt zudem eine ATP-abhängige Helikase- (68) und eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität (69). Neben der Lokalisation von Ku im Zellkern, konnte es in den vergangenen Jahren auch im Zytoplasma (70), in der Zellmembran (71-74) oder im Zytoplasma und der Zellmembran (75) von diversen

Tumorzellen (76) nachgewiesen werden. Außerdem konnte Ku auch in der Zellmembran von erythroiden Vorläuferzellen des Knochenmarks detektiert werden (63). Inzwischen ist bekannt, dass Ku70 und Ku80 auch an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind (77; 73; 78) und Ku80 ein Adhäsionsrezeptor für Fibronectin und Typ IV-Kollagen darstellt (77; 74).

#### **1.1.5.4 B19V-Aufnahmemechanismen**

Über die Aufnahmemechanismen von B19V ist bisher nur wenig bekannt und die Untersuchungen sind aufgrund des engen Zelltropismus für primäre erythroide Vorläuferzellen erschwert. Allerdings sind die Internalisierungsprozesse für diverse tierpathogene Parvoviren wie dem caninen Parvovirus, dem Minute Virus der Maus und dem porcinen Parvovirus gut beschrieben (79-81) und liefern ein mögliches Model für die B19V-Internalisierung. So konnte gezeigt werden, dass die tierpathogenen Parvoviren über eine Klathrin- und Dynamin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden (82-84). Der niedrige pH-Wert der Endosomen führt zu einer Konformationsänderung der Kapsidproteine und so zur Freilegung der VP1 „unique region“, speziell der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)-ähnlichen Domäne und der Kerntransportsignal (NLS)-Sequenzen der Kapsidproteine (85). Die PLA<sub>2</sub>-Domäne katalysiert die Hydrolyse von Phospholipiden, so dass die Membran der Endosomen aufgespalten wird und die Viruspartikel freigesetzt werden können (37; 85; 86). Nach dem Freisetzen der Viruspartikel aus den Endosomen ins Zytoplasma werden die Partikel über die NLS-Sequenzen an das zelluläre Protein Importin gebunden und in den Nukleus transportiert (79).

Wie bereits für die tierpathogenen Parvoviren gezeigt, wird die B19V-Internalisierung vermutlich ebenfalls über Endozytose vermittelt. So konnten mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen in erythroiden Zellen in Endosomen eingeschlossene B19V-Partikel nachgewiesen werden (87). Die PLA<sub>2</sub>-Domäne liegt bei B19V in der „unique region“ des VP1 und ist bei den verschiedenen Genotypen konserviert (88). Diese Domäne ist essentiell für die B19V-Internalisierung. Es konnte gezeigt werden, dass Viruspartikel mit Mutationen in dieser Region nicht in der Lage waren in den Zellkern der infizierten Zellen zu gelangen (89). Es ist bekannt, dass die zelluläre GTPase Ras1 durch die Regulierung des  $\beta$ <sub>1</sub>-Integrins und/oder der Modelierung des Mikrotubulinetzwerkes während des zytoplasmatischen Transportes der B19V-Partikel eine Rolle spielt (58). Eine NLS-Sequenz wurde an dem C-Terminus des VP2 lokalisiert, jedoch liegen keine weiteren Untersuchungen zu dessen Rolle in der B19V-Aufnahme vor (90).

### 1.1.6 Replikation

Der Replikationsmechanismus für B19V konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Da innerhalb der Familie der Parvoviridae die Vertreter der Gattungen Erythrovirus und Dependovirus die einzigen Viren mit identischen ITRs an beiden Genomenden sind, wird davon ausgegangen, dass der Replikationsmechanismus von B19V ähnlich dem des AAVs ist (siehe Tab. 1-1).

Die Replikation des AAV-Genoms erfolgt über einen Einzelstrang-Verdrängungsmechanismus (91; 92). Sie beginnt mit der DNA-Polymerisation am 3'-OH-Ende der zur Haarnadelschleife gefalteten 3'-ITR, welche als Primer dient (93). Durch die fortschreitende Elongation entstehen lineare Doppelstrangmoleküle mit einem kovalent geschlossenen Ende. Gegenüber vom ursprünglichem 3'-Ende befindet sich die terminal resolution site (trs), an der der Einzelstrang durch die Endonukleasefunktion des NS1-Proteins geschnitten wird. An dem so neu entstandenen 3'-Ende mit einer freien Hydroxylgruppe (OH) wird erneut die DNA-Synthese aufgenommen, die ITR aufgefaltet und kopiert. Das DNA-Genom liegt nun über alle Bereiche doppelsträngig vor und die neu synthetisierten palindromischen Enden bilden wieder Haarnadelstrukturen aus, welche neue Initiationsstellen für die DNA-Synthese darstellen. Das doppelsträngige DNA-Molekül wird in zwei einzelsträngige Virusgenome aufgetrennt, welche in Kapside verpackt werden können. Kommt es zu einem Fehler beim Spalten des Elternstranges an der trs, entstehen doppelsträngige Dimere, welche später wieder zu Monomeren prozessiert werden (94).

Die Kapsidproteine werden im Zytoplasma translatiert und anschließend in den Nukleus transportiert, in welchem der Zusammenbau der Viruspartikel erfolgt (Assembly) (95). Nach dem Assembly werden die Kapside ins Zytoplasma transloziert, wo dann die Freisetzung möglicherweise durch den Phosphorylierungszustand der Kapsidproteine reguliert wird (96). Das Prinzip der AAV-DNA-Replikation ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

Die Replikation der Parvoviren erfolgt ausschließlich in proliferierenden, sich in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen. Es wird angenommen, dass für die Replikation der Parvoviren die zellulären Faktoren Replikationsfaktor C (RCF), Prozessivitätsfaktor PCNA (Proliferating cell nuclear-antigen), Polymerase  $\delta$  und der MCM-Komplex (minichromosome maintenance complex) benötigt werden, welche in allen Säugetier- und Insektenzellen vorzufinden sind (97-99). Diese Faktoren werden wahrscheinlich auch für die B19V-Replikation benötigt. Der identifizierte Replikationsursprung (ori) von B19V ist 67 nt lang und beinhaltet ähnlich wie der des AAV2 die NS1-Bindungsstelle und die trs (100-102). Der während der Replikation entstandene Doppelstrang wird durch das B19V-NS1 innerhalb des Ori an der trs-Sequenz (5'-GACA/CCA-3') geschnitten. Für die Bindung von NS1 an der trs

wurden vier GC-reiche Sequenzen identifiziert, die wie im Fall der Rep-Bindungsstelle von AAV2 geclustert an der NS1-Bindungsstelle vorliegen (101; 103).

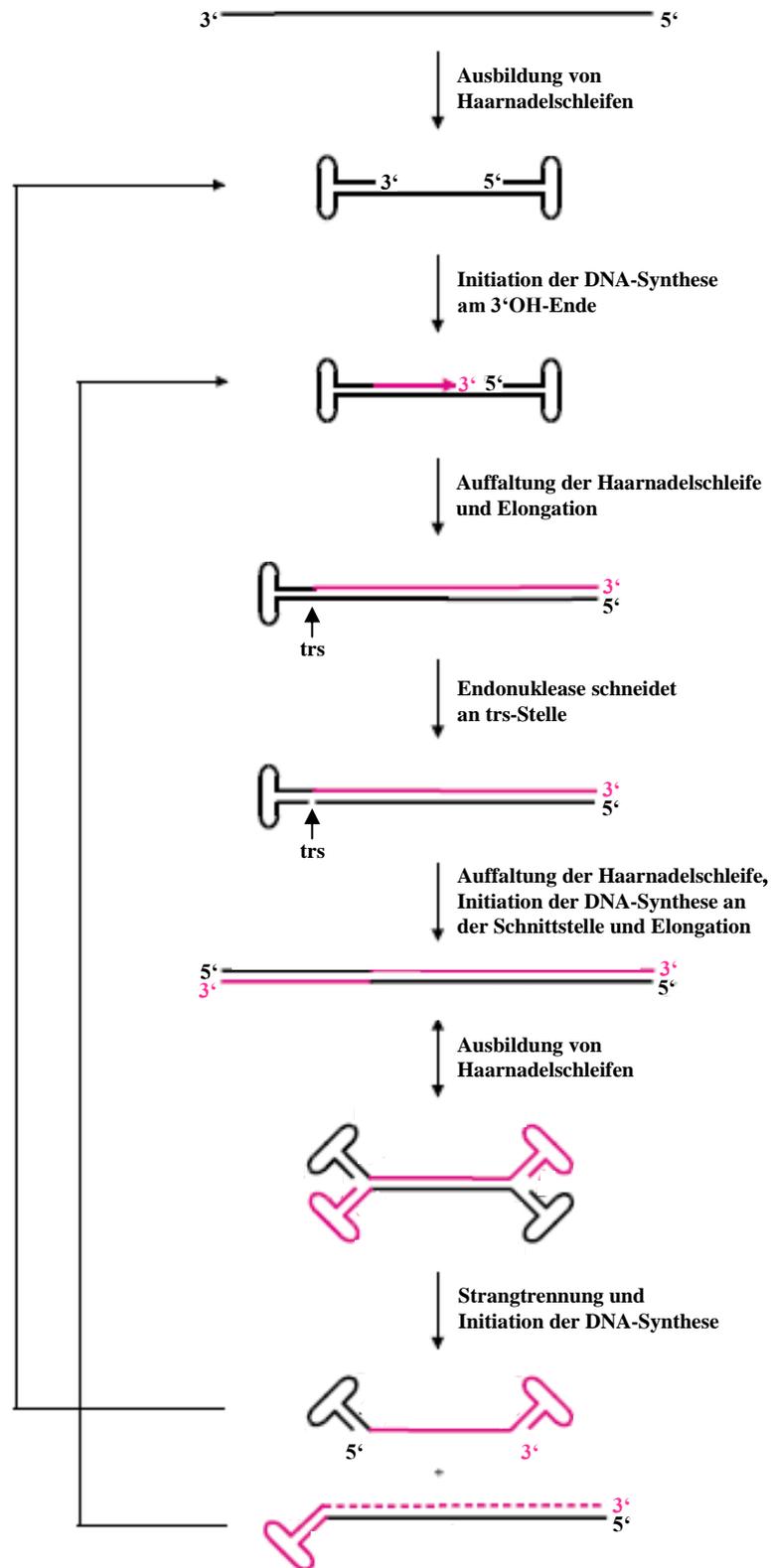


Abbildung 1-3: schematische Darstellung der Genomreplikation von Parvoviren (modifiziert nach Modrow, Susanne / Falke, Dietrich / Truyen, Uwe / Schätzl, Hermann (2010): Molekulare Virologie, 3.

Auflage. Heidelberg, S. 646.). Die neusynthetisierten Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Erläuterungen zur Abbildung befinden sich oben im Text.

### **1.1.7 Epidemiologie und Übertragung**

Bislang sind drei Genotypen von B19V bekannt, welche regional unterschiedlich verbreitet sind. Der Genotyp 1 ist für den Hauptteil der Infektionen weltweit verantwortlich und im Vergleich zu den anderen Genotypen in Mittel- und Südeuropa, Asien und Amerika am stärksten vertreten (104). Genotyp 2 wurde nur selten in Europa, Brasilien und Vietnam in der virämischen Phase von Patienten gefunden. In Nordeuropa ist das Vorkommen des Genotyp 2 auf Gewebeproben insbesondere älterer Patienten beschränkt, so dass davon ausgegangen wird, dass es die ursprünglichste Form ist, welche bis etwa 1970 am häufigsten in dieser Region kursierte, bis es von Genotyp 1 überholt wurde (105; 106). Genotyp 3 wurde bisher gelegentlich in Patienten aus Frankreich und Brasilien und in Blutspenden aus Ghana detektiert, wo davon ausgegangen wird, dass es endemisch ist (104; 107; 108). Die Seroprävalenz in der Population steigt mit zunehmendem Alter auf bis zu 78 bis 92 % (109; 110).

Während der akuten Phase vor dem Auftreten klinischer Symptome sind bei einer B19V-Infektion im Blut infizierter Personen große Mengen an Viruspartikeln mit  $10^{11}$  bis  $10^{13}$  Genomäquivalente/ml nachweisbar. In dieser frühen Phase der Infektion sind noch keine spezifischen Antikörper detektierbar. B19V wird in dieser Phase über den Speichel ausgeschieden und kann in anderen Körperflüssigkeiten wie z.B. Urin nachgewiesen werden (111; 112). Die Übertragung erfolgt über Tröpfcheninfektion oder durch kontaminiertes Blut und Blutprodukte. Die Virusmengen im Speichel und im peripheren Blut sinken zeitgleich mit der Ausbildung einer spezifischen Immunantwort. In etwa 20 % der Fälle entsteht eine chronisch-persistierende Infektion, bei der über längere Zeiträume kontinuierlich Virusmengen von  $10^3$  bis  $10^7$  Genomäquivalente/ml nachgewiesen werden können. Zudem kann das Virus diaplacentar von der Mutter auf den Fetus übertragen werden.

### **1.1.8 Pathogenese und Tropismus**

Es ist bisher noch unklar, welche Zellen bei einer B19V-Infektion bei der Übertragung auf die Schleimhäute des Mund- und Rachenbereichs primär infiziert werden. Bisher konnte auch nicht geklärt werden, auf welchem Weg das Virus im Organismus zu seinen Zielzellen gelangt, den erythroiden Vorläuferzellen der Differenzierungsstadien BFU-E (erythrocyte burst forming unit), CFU-E (erythrocyte colony forming unit) und den Erythroblasten im

Knochenmark oder fetalen Leberzellen (113; 114). In der Frühphase der Infektion können die Viruspartikel im peripheren Blut nachgewiesen werden. Durch die Produktion neutralisierender Antikörper und durch die Eliminierung der für B19V-permissiven erythroiden Vorläuferzellen wird die virämische Phase eingedämmt. Die Ausbildung des klinisch auffälligen Exanthems geht zeitgleich mit der Produktion spezifischer Antikörper einher. Es ist bisher noch unklar, wodurch der Hautausschlag bedingt wird.

Ein chronisch-persistierender Infektionsverlauf im Knochenmark mit und ohne Symptome konnte bei immunkompetenten Patienten beobachtet werden (115-117). Des Weiteren wurden persistierende Virusinfektionen mit geringen Virustitern im Blut immunkompetenter Patienten über mehrere Jahre nach der Primärinfektion nachgewiesen (118; 119). Die Mechanismen eines solchen chronischen Infektionsverlaufs sind bisher nicht geklärt.

Der stark ausgeprägte Zell- und Gewebetropismus von B19V für erythroide Vorläuferzellen des Knochenmarks oder fetalen Leberzellen ist vermutlich durch verschiedene Faktoren gegeben. Zunächst ist das Vorkommen der B19V-Rezeptoren P-Antigen (32),  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin (42) und Ku80 (63) notwendig. Zusätzlich ist eine produktive B19V-Infektion abhängig von der Synthese der Kapsidproteine VP1 und VP2. Es konnte gezeigt werden, dass in nicht-permissiven Zellen die Produktion der Kapsidproteine aufgrund eines Abbruchs in der Synthese der prä-mRNA beeinträchtigt ist. So werden alle mRNAs an der proximalen Polyadenylierungsstelle (pA)<sub>p</sub> mit einem Poly(A)-Ende versehen, was eine gesteigerte NS1- und fehlende VP1- und VP2-Synthese zur Folge hat (120). NS1 führt schließlich aufgrund seiner zytotoxischen oder apoptotischen Eigenschaften zum Zelltod (21; 121). Im Gegensatz hierzu werden in permissiven Zellen durch das Überlesen der proximalen Polyadenylierungsstelle zusätzlich zu den NS1-kodierenden mRNAs ausreichende Mengen an Kapsidprotein-kodierenden mRNAs synthetisiert (120). Zudem scheint die Replikation der B19V-DNA für eine ausreichende Synthese der Kapsid-mRNAs notwendig zu sein, um intakte Nachkommenviren generieren zu können (100). In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass der B19V-Tropismus zusätzlich von intrazellulären Faktoren abhängig zu sein scheint. Allerdings konnten die Ursachen hierfür nicht geklärt werden. In manchen Fällen war die Replikation der einzelsträngigen in doppelsträngige DNA unterbunden, was zu einem Infektionssabbruch führte. In anderen Fällen war zwar die doppelsträngige replikative Form des Genoms nachweisbar, allerdings nur in einer kleinen Subpopulation der Zellen (122-124).

### 1.1.9 Krankheitsbilder

Parvovirus B19 zeichnet sich durch einen engen Zell- und Gewebetropismus aus. Die Replikation findet ausschließlich/überwiegend in erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark oder in fetalen Leberzellen statt. Zu etwa 30 % verläuft die Infektion asymptomatisch (125). Das häufigste Erkrankungsbild ist das Erythema infectiosum, auch als Ringelröteln oder fifth disease bekannt, welches meist im Kindesalter auftritt (126). Hierbei bildet sich ein Exanthem, das im Gesicht beginnend sich im Verlauf auf dem Körper und den Extremitäten ausbreitet. Außerdem werden Arthropathien mit B19V-Infektionen in Verbindung gebracht (127; 128). In Erwachsenen stellen Arthritiden und Arthralgien die Hauptmanifestationen (Frauen: 60 %, Männer: 30 %) einer B19V-Infektion dar (129; 125). Des Weiteren verursacht eine B19V-Infektion aufgrund der B19V-Spezifität für Erythroblasten eine vorübergehende Anämie, die bei Patienten mit gestörter Bildung und Reifung der Erythrozyten zu schweren aplastischen Krisen führen kann. Zudem wurden B19V-assoziierte akute und chronische Formen der Myokarditis beschrieben (130; 131).

#### 1.1.9.1 B19V-assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie

Nach Definition der *European Society of Cardiology* ist die „dilatative Kardiomyopathie“ (DCM) eine Herzmuskelerkrankung, die durch eine Erweiterung (Dilatation) und systolische Dysfunktion des linken Ventrikels oder beider Ventrikel ohne Auftreten von Bluthochdruck, Herzklappenfehler oder Erkrankung der Koronararterien definiert ist (132). Die DCM stellt neben der koronaren Herzerkrankung die häufigste Ursache der Herzinsuffizienz dar (133). Derzeit liegt die Prävalenz der Herzinsuffizienz in der BRD bei ca. 1,5 Millionen Patienten, welche letztlich trotz der symptomatischen medikamentösen Behandlung nur durch eine Herztransplantation therapiert werden können. Laut Definition der *WHO/ISFC Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies* stellt eine myokardiale Entzündung und/oder Virusinfektion (= inflammatorische Kardiomyopathie, DCMi) die häufigste Ursache einer DCM dar (134).

Durch den Einsatz hochsensitiver molekularbiologischer Nachweisverfahren konnte in den letzten Jahren das Spektrum viraler Infektionen im kardialen Gewebe ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass in Europa und den USA die Virusprävalenz bei DCM-Patienten bis zu etwa 70 % beträgt (135-137). Die am häufigsten nachgewiesenen Viren sind Coxsackievirus Typ B, B19V, Humanes Herpesvirus 6 (HHV6) und Adenovirus (138-140) (siehe Tab. 1-2). Virale Ko-Infektionen konnten in mehr als 12 % der Patienten nachgewiesen werden, wobei das

HHV6 mit B19V mit bis zu 60 % am häufigsten vorgefunden wurde (138). Des Weiteren können das humane Immundefizienzvirus (HIV), Hepatitis C Virus (HCV), Herpes Simplex Virus (HSV) und Influenzaviren mit einer DCMi assoziiert sein (141; 142).

**Tabelle 1-2:** Molekularbiologisch ermittelte Prävalenz viraler Infektionen im kardialen Gewebe von Patienten mit akuter Myokarditis oder dilatativer Kardiomyopathie (143)

<b>humane kardiotope Viren</b>	<b>akute Myokarditis (%)</b>	<b>Dilatative Kardiomyopathie (%)</b>	<b>Literatur</b>
Coxsackievirus Typ B	14 – 32,6	8 – 35	(144; 145; 139; 146)
Parvovirus B19 (B19V)	<1 – 36,6	51,4	(145; 139)
Humanes Herpesvirus 6 (HHV6)	10,5	21,6	
Adenovirus	8,1 – 23	1,6 – 12	(140; 145; 139)
multiple Infektionen (60% der Fälle = B19V + HHV6)	12,2	27	(145; 139)
Cytomegalovirus	3	0,8	
Epstein-Barr Virus	< 1	2	
Herpes simplex Virus	< 1	nicht verfügbar	
Influenza Virus	< 1-2	nicht verfügbar	

Durch *in situ*-Hybridisierungen ergaben sich erste konkrete Hinweise auf eine ätiopathogenetische Bedeutung von B19V bei einer fulminant verlaufenden Myokarditis (147). Ausschließlich Endothelzellen der kleinen intramyokardialen Arteriolen und postkapillären Venolen wiesen eine hohe Anzahl nachweisbarer B19V-Genome auf. Als Folge dieser Infektion wurde eine ausgeprägte Entzündungsreaktion im kardialen Gewebe nachgewiesen, die mit einer massiven Infiltration des Herzmuskels mit T-Lymphozyten und Makrophagen einherging. Da Myozyten sich für B19V als durchweg negativ erwiesen, wurden deren beobachteten nekrotischen Veränderungen als eine Folge der Endothelzellschädigung und der damit einhergehenden Mikrozirkulationsstörung vermutet. Mit Hilfe quantitativer PCR-Analysen konnten bei akuter B19V-Infektion des Herzens meist hohe Virustiter von  $10^4$  bis  $10^7$  Genomäquivalenten pro Mikrogramm isolierter Gesamt-DNA detektiert werden. Im Gegensatz dazu ergaben Untersuchungen, dass bei der B19V-assoziierten DCMi das Virus in den Endothelien der myokardialen Kapillaren mit relativ geringer Viruslast von unter  $10^3$  Genomäquivalenten pro Mikrogramm kardialer Gesamt-RNA persistiert und die Inflammation des Myokards sich primär als makrophagenreiche Entzündung darstellt (130; 131).

Endothelzellen kleiden als einschichtiges Plattenepithel die Innenseite von Blut- und Lymphgefäßen aus und haben eine wichtige physiologische Funktion in der Bildung einer regulierbaren Barriere zwischen dem Gefäß und dem Extravasalraum. Sie regulieren somit wesentlich den transvasalen Flüssigkeitstransport und Stoffaustausch. Eine Virusinfektion des Endothels kann über eine endotheliale Dysfunktion mit Aktivierung von Interferon-abhängigen Signalkaskaden (JAK/STAT- und Map-Kinase Signalweg) und reaktiver Infiltration des Gewebes mit Leukozyten unter Beteiligung von Selektinen, Integrinen und Adhäsionsmolekülen letztendlich zu einem Zusammenbruch der Endothelbarriere führen (148; 149). Ein solcher Zusammenhang wird für die B19V-Infektion des Herzens vermutet. So konnte die Assoziation von B19V mit einer endothelialen Dysfunktion des Herzens durch Untersuchungen von Endomyokardbiopsien bereits bestätigt werden (150). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der B19V-induzierten kardialen endothelialen Dysfunktion und einer isolierten diastolischen Dysfunktion. So konnte durch Endomyokardbiopsien bei 84 % der Patienten ohne DCMi mit ätiologisch unklarer diastolischer Dysfunktion das B19V-Genom nachgewiesen werden (151). Diese Untersuchungen belegen, dass B19V einen ausgeprägten Tropismus für Endothelzellen hat. Außerdem legen sie einen möglichen Zusammenhang zwischen einer kardialen B19V-Infektion und einer endothelialen Dysfunktion des Herzens nahe.

Im Gegensatz dazu unterstützen kürzlich erhobene Studien die Theorie einer nach erfolgter B19V-Primärinfektion asymptomatischen und lebenslangen Latenz der B19V-DNA im Herzen. So konnte in 96 % bzw. 85 % kardialer Autopsyproben unterschiedlichster Todesursachen B19V-DNA nachgewiesen werden (152; 153). Diese Theorie wird durch den heutigen Nachweis der B19V-DNA des Genotyps 2, welcher vorwiegend bis 1970 im Umlauf war, unterstützt (105; 154; 106). Zudem belegen Studien der letzten Jahre die asymptomatische Latenz der Virus-DNA in verschiedenen anderen Geweben wie Leber, Knochenmark, Haut und Tonsillen (115; 105; 155; 156).

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass unter gewissen Umständen das im Herzen latent vorliegende B19V durch gewisse Faktoren reaktiviert werden kann, bzw. dass eine kontinuierliche Synthese des zytotoxischen NS1 eine permanente Endothelzellschädigung zur Folge hat.

## 1.2 Adenovirale Helferfunktionen bei der Parvovirusinfektion

Trotz des ausgeprägten Zell- und Gewebetropismus von B19V wurde kürzlich gezeigt, dass die Inhibierung der B19V-Replikation in nicht-permissiven embryonalen Nierenzellen durch eine adenovirale Ko-Infektion überwunden werden kann (103). Zusätzlich konnte die Synthese neuer B19V-Viruspartikel im gleichen Maße wie in der semi-permissiven Zelllinie UT7/Epo-S1 beobachtet werden. Die Proteine E1A, E1B-55kD, E2A und E4orf6 und die VA RNA von Adenovirus wurden dabei als essentielle Helferfunktionen identifiziert. Bei diesen adenoviralen Funktionen handelt es sich um die gleichen Faktoren, welche für den produktiven Infektionszyklus des Helfervirus-abhängigen AAVs benötigt werden. AAV gehört in die Familie der Parvoviren (Tab. 1-2). Beim adenoviralen E1A handelt es sich um ein Transaktivatorprotein, welches für die Transkription der anderen frühen Proteine des Adenovirus sowie der des AAVs benötigt wird (157; 158). Zusätzlich leitet es die Zelle in die S-Phase des Zellzyklus und regt die Synthese zellulärer Replikationsproteine an, welche ebenfalls für eine erfolgreiche AAV-Replikation notwendig sind (159). Das Protein des E4orf6 bildet einen Komplex mit dem E1B-55kD-Protein und stimuliert zum einen den Transport der mRNA von Adenovirus bzw. AAV aus dem Nukleus ins Zytoplasma (160; 161). Zum Anderen kann E4orf6 die Zweitstrangsynthese des einzelsträngigen AAV-Genoms induzieren. E1B ist neben der Komplexbildung mit E4orf6 für die Replikation der AAV-DNA erforderlich. Das Einzelstrang-DNA-bindende E2A spielt im Infektionszyklus eine Rolle bei der DNA-Replikation und stimuliert die Transkription der AAV-Promotoren (164). Bei einer AAV-Infektion stimuliert es die Transkription der AAV-mRNAs (165; 164), und ist an deren Transport und Stabilisierung beteiligt. Die adenovirale VA RNA ist an der Regulation der Translation der AAV-Kapsidproteine beteiligt (224).

### 1.3 Zielsetzungen

Der produktive Infektionszyklus von Parvovirus B19 beschränkt sich aufgrund seines engen Gewebe- und Zelltropismus ausschließlich auf erythroide Vorläuferzellen und fetale Leberzellen. Durch Untersuchungen der letzten Jahre ließ sich jedoch die B19V-DNA auch in anderen Zelltypen wie den Endothelzellen der intramyokardialen Arteriolen und postkapillären Venolen im Herzen nachweisen. Da allerdings der Nachweis der Replikation des B19V-Genoms in diesen Zellen ausblieb, besteht die Hypothese einer langjährigen asymptomatischen B19V-Latenz in nicht-permissiven Zellen. Bisher sind die endothelialen B19V-Aufnahmemechanismen unbekannt. Zudem ist bisher nicht geklärt, ob mögliche Reaktivierungsmechanismen des in Endothelzellen latent vorliegenden B19V existieren.

Ausgehend von diesem Hintergrund wurden folgende Ziele in dieser Arbeit verfolgt: es sollten (I) die Rolle der Rezeptor-vermittelten Aufnahmemechanismen von B19V in der kardio-endothelialen B19V-Infektion und (II) mögliche Reaktivierungsmechanismen von B19V durch Adenovirus geklärt werden.

Beginnend mit der Analyse der Rezeptor-abhängigen Aufnahme von B19V in Endothelzellen sollte zunächst die endotheliale B19V-Rezeptorexpression verschiedener Gewebe charakterisiert, und anschließend deren Bedeutung für die Absorption und Internalisierung von B19V untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluss der Polarität von Endothelzellen auf die B19V-Internalisierung analysiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit zur möglichen Reaktivierung des in Endothelzellen latent vorliegenden B19V-Genoms durch Adenovirus sollten nach initialen Untersuchungen zur Aktivität des isolierten p6-Promotors in Endothelzellen Analysen hinsichtlich der p6-Promotoraktivität im Kontext eines Parvovirusgenoms durchgeführt werden. Zusätzlich sollten regulatorische B19V-Promotorelemente identifiziert und die transaktivierenden adenoviralen Genprodukte bestimmt werden.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme

**E.coli XL-10 Gold (Stratagene, USA):** TetR  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$  Hte [F' *proABlacIqZ* $\Delta$ M15 Tn10 (TetR) Amy CamR]

**E.coli Top 10 (Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D):** F {*lacIq* Tn10 (TetR)} *mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)*

F80*lacZ*M15 *lacX74 recA1 deoR araD139 (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*

### 2.2 Bakterien-Medien

Medium	Hersteller
LB-Medium	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
LB-Agar	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Terrific Broth-Medium:	
Bacto tryptone	Becton, Dickinson and Company, F
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, F
Glycerol	Fluka, Buchs, CH
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka, Buchs, CH
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka, Buchs, CH

### 2.3 Plasmide

Bezeichnung	Selektions- marker	Beschreibung	Hersteller
pcDNA3.1-E1A-13s	Amp <sup>r</sup>	HCMV-Promotor, enthält E1A-13s	Dr. H. Fechner, CUB, Berlin, D
pcDNA3.1-E1A-12s	Amp <sup>r</sup>	HCMV-Promotor, enthält E1A-12s	Dr. H. Fechner, CUB, Berlin, D
pcDNA3.1-E1A-11s	Amp <sup>r</sup>	HCMV-Promotor,	

pHelper	Amp <sup>r</sup>	enthält E1A-11s enthält die adenoviralen Funktionen E2A, E4 und VA RNA	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pGFP	Amp <sup>r</sup>	HCMV-Promotor, green-fluorescent protein	Dr. H. Fechner, CUB, Berlin, D
pB19-M20	Amp <sup>r</sup>	infektiöser B19V-Klon, enthält das gesamte B19V-Genom unter dem p6-Promotor	Dr. K. Brown, Virus Reference Department, Centre for Infections (CFI), London, UK
pB19-M20dNS1	Amp <sup>r</sup>	Leserasterverschiebung im NS1-Gen, daher Synthese eines funktionell inaktiven 231 Aminosäuren- langen NS1	PD Dr. S. Weger, Institut für Virologie, Campus Benjamin Franklin, Charité Berlin, D
p6-Luc	Amp <sup>r</sup>	p6-Promotor, Reportergen: Luciferase	Dr. H. Fechner, CUB, Berlin, D
p6-1-Luc	Amp <sup>r</sup>	enthält 150 nt der 5'- ITR mit nachgeschaltetem p6- Promotor; Reportergen: Luciferase	Dr. T. Bock, Robert- Koch-Institut, Berlin, D
p6-2-Luc	Amp <sup>r</sup>	enthält 196 nt der 5'- ITR mit nachgeschaltetem p6- Promotor und 59 nt des orf vom NS1; Reportergen: Luciferase	Dr. T. Bock, Robert- Koch-Institut, Berlin, D
p6-3-Luc	Amp <sup>r</sup>	enthält 196 nt der 5'- ITR mit nachgeschaltetem p6- Promotor;	Dr. T. Bock, Robert- Koch-Institut, Berlin, D

p6-4-Luc	Amp <sup>r</sup>	Reportergen: Luciferase enthält 150 nt der 5'- ITR mit nachgeschaltetem p6- Promotor und 59 nt des orf vom NS1;	Dr. T. Bock, Robert- Koch-Institut, Berlin, D
pKex	Amp <sup>r</sup>	Reportergen: Luciferase CMV-Promotor ohne Transgen; als Ausgleichspalsmid verwendet	PD Dr. S. Weger, Institut für Virologie, Campus Benjamin Franklin, Charité Berlin, D
pKex-NS1	Amp <sup>r</sup>	HCMV-Promotor, NS1 aus pB19-M20	PD Dr. S. Weger, Institut für Virologie, Campus Benjamin Franklin, Charité Berlin, D
pCMV-Flag-E1B55K	Amp <sup>r</sup>	HCMV-Promotor, Flag-getaggtes E1B- 55K	Ph.D D. Pintel, University of Missouri, USA
pCMV-Flag-E2A	Amp <sup>r</sup>	HCMV-Promotor, Flag-getaggtes E2A	Ph.D D. Pintel, University of Missouri, USA
pCMV-myc-E4orf6	Amp <sup>r</sup>	HCMV-Promotor, myc-getaggtes E4orf6	Ph.D T. Shenk, University of Princeton, USA
pVA RNA	Amp <sup>r</sup>	enthält VA RNAI und VA RNAII	Ph.D T. Shenk, University of Princeton, USA
pB19V-STD		enthält VP1/2, dekadische Verdünnung diente als Standardreihe für die qRT-PCR	

## 2.4 eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Kultivierungsmedium
EA.hy926	Hybrid-Zelllinie aus HUVEC und A549	DMEM* (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D), 1xHAT (Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D)
HAoEC	humane Endothelzellen aus der Aorta	MV2-Medium (Promocell, D)
HCAEC	humane koronare Endothelzellen	MV2-Medium (Promocell, D)
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	MV2-Medium (Promocell, D)
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen	DMEM* (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D)
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen	DMEM* (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D)
HPAEC	humane Endothelzellen aus der Pulmonararterie	MV2-Medium (Promocell, D)
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen	MV2-Medium (Promocell, D)
UT7/Epo-S1	humane megakaryoblastoide Zellen	IMDM* (Mediatech, VA), 2 mM L-Glutamine (Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D), 2 Units/ml humanes Erythropoetin (PBL Biomedical Laboratories, USA)

\* Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Zellkulturmedien mit 10% FKS (CCPro, Neustadt, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, D) versetzt.

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 primäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
mouse anti-Parvovirus B19, monoklonaler Antikörper	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts, D
rabbit Ad2/5 E1A (13s-5), polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D

mouse Ku Ab-7 (S10B1) N-Terminus, Ku80, monoklonaler Antikörper	Neomarkers
mouse Ku Ab-2 (111) C-Terminus, Ku80, monoklonaler Antikörper	Neomarkers
mouse Ku Ab-4 (N3H10), Ku70, monoklonaler Antikörper	Neomarkers
mouse anti-Human Integrin $\beta_1$ (P4C10), monoklonaler Antikörper	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts, D
rabbit anti-globoside GL-4, P-Antigen, polyklonaler Antikörper	Matreya
anti-B19-NS1 (MAB1424), monoklonaler Antikörper	Prof. Dr. Susanne Modrow, Universität Regensburg, D

## 2.5.2 sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Invitrogen <sup>TM</sup> , Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 594	Invitrogen <sup>TM</sup> , Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 594	Invitrogen <sup>TM</sup> , Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
goat anti-human IgG (H+L), Alexa Fluor 594	Invitrogen <sup>TM</sup> , Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

## 2.6 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Alkaline phosphatase, calf intestinal (CIP)	Roche, Mannheim, D
DNA-Ligasen	New England Biolab/ Frankfurt a. M., D
DNase I peq GOLD	Peqlab, Erlangen, D
Pfu Ultra High Fidelity	Roche, Mannheim, D
Proteinase K	Boehringer Mannheim, D
Taq-Polymerase	Applied Biosystem®, Life Technologies

Trypsin	GmbH, Darmstadt, D
T4- DNA-Polymerasen	Biochrom AG, Berlin, D
Restriktionsenzyme	New England Biolab, Frankfurt a. M. D
	New England Biolab, Frankfurt a. M. D

Alle Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

## 2.7 Nukleinsäure

### 2.7.1 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Bemerkung
B19V_384s_XhoI	act ctc gag agc ggg ctt ttt tcc cgc ctt a	Klonierung von p6-Luc
B19V_595as_BamHI	agt gga tcc gtt agt ata tta aca cgt agt a	Klonierung von p6-Luc
qPCR-B19V-s	cat ttt cya gac agt ttt taa tyc ca	Primer für TaqMan
qPCR-B19V-as	cty gct gcg gga gaa aac ac	Primer für TaqMan
β-Aktin-s	aag gat tcc tat gtg gtc g	Sonde für Northern-Blot
β-Aktin-as	ctc ctt aat gtc acg cag ga	Sonde für Northern-Blot

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Berlin, D) synthetisiert und in A. dest gelöst (Konzentration: 100 µM).

### 2.7.2 Taq-Man Sonden

Bezeichnung	Sequenz	Bemerkung
qPCR-B19V-MGB	atg acc cag agc acc	Sonde für qRT-PCR zum Nachweis von B19V

Die Sonde wurde von der Firma Applied Biosystems® (Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) synthetisiert und bereits gelöst in einer Konzentration von 100 µM geliefert. Sie wies am 3'-Ende eine FAM-Markierung und am 5'-Ende einen MGB-Quencher auf.

### 2.7.3 DNA-Größenstandards

1 kb-DNA-Leiter, peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin, D  
 DNA-Leiter Mix, peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin, D

peq Gold o'range, peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin, D

dNTPs Rapidozym, Berlin, D  
 [<sup>32</sup>P]dCTP Amersham, München, D

## 2.8 Reagenzsysteme

Bezeichnung	Hersteller
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim, D
EndoFree® Plasmid Kit	Qiagen, Hilden, D
E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II	Peqlab, Erlangen, D
High Capacity® cDNA Archive Kit	Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Kalzium-Phosphat Transfektion-Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Lipofectamine™ LTX	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Plasmid Minipräparation Kit	Peqlab, Erlangen, D
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
TaqMan Universal Master Mix UNG	Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
TaqMan DNA Template Reagents	Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

## 2.9 Lösungen und Puffer

**20 x SSC-Puffer:** 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH-Wert 7,0

**50 x TAE-Puffer:** 2 M Tris-HCl, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8,0

**10 x TE-Puffer:** 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, autoklaviert

**10 x MOPS-Puffer:** 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, 200 mM MOPS, pH 7,0

**1 x TBS-Puffer:** 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pH 8,0

**2 x HBS-Puffer:** 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 150 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,05

### Lysepuffer für DNA-Isolierung nach Hirt

10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, 1 % SDS, Proteinase K (50 µg/ml)

### Lösungen für Immunfluoreszenz

Fixierlösung: PBS mit 4 % Formaldehyd, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Triton X 100

Blockierungslösung: TBS mit 5 % Serum, 0,1% Triton X 100

### Lösungen für Southern-Blot

Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer: 0,5 M Tris-HCL (pH 7,0), 1,5 M NaCl

### Waschlösung für Hybridisierung von Nukleinsäuren

Waschlösung I: 2 x SSC, 0,05 % SDS

Waschlösung II: 0,1 x SSC, 0,1 % SDS

Stripping-Puffer: 0,5 % SDS

## 2.10 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI 7900 HT Fast real-time PCR System	Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Agarosegel-Kammer Hoefer® HE 33	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Jena, D
Brutschrank Modell 5420	Labotect Labortechnik, Göttingen, D
Centrifuge 5415D und Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus, Wellesley, USA
Elektrophoreseeinheit PP3000	Biometra GmbH, Göttingen, D
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Feinwaage BL 310	Sartorius, Göttingen, D
Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystem®, Life Technologies

Heizplatte IKAMAG® RH	GmbH, Darmstadt, D
Hybridisierungssofen Compact Line OV 4	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, D
Immunfluoreszenzmikroskop Leica DMI 4000 B	Biometra GmbH, Göttingen, D
Kamera Leica DFC 340 FX	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Lumat LB 9501	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, D
pH-Meter HI 8314 membrane pHmeter	Peqlab, Erlangen, D
Pipetten	HANNA instruments, Woonsocket, USA
QC 2000	Eppendorf, Hamburg, D,
Thermomixer 5436	Gilson, Middleton, USA
Transilluminator BioDoc Analyze	Bioscan, Washington, USA
TRIO-Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, D
UV Stratalinker®1800	Biometra GmbH, Göttingen, D
Vortex-Genie 2	Biometra GmbH, Göttingen, D
Wasserbad	Stratagene, LaJolla, USA
Zentrifuge Avanti™J-25	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Zentrifuge Varifuge RF	Memmert GmbH, Schwabach, D
	Beckman Coulter, Fullerton, USA
	Heraeus Sepatech, Osterode, D

## 2.11 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agar NOBIE	DIFCO Laboratories, Lawrence, USA
Agarose	Biozym, Oldendorf, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, D
Aqua dest.	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts, D
4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, München, D
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, D
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, München, D
Chloroform	Sigma-Aldrich, München, D

Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)	Fluka, Buchs, CH
Cy3-conjugated Streptavidin	Dianova, Hamburg, D
Kristallviolett	Dianova, Hamburg, D
Dapi-Fluoromount-G™	Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, D
DNA-Loading Buffer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
EDTA (Ethyldiamontetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe, D
Erythropoetin	Biomedical Laboratories, USA
Ethanol absolut	J.T. Baker, Philipsburg, USA
Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiumbromide), 10 mg/ml	Roth, Karlsruhe, D
Express Hyb – Hybridisierungslösung	Clontech, Mountain View, USA
FACS Clean	BD Bioscience, San Jose, USA
FACS Flow	BD Bioscience, San Jose, USA
FACS Rinse	BD Bioscience, San Jose, USA
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, D
Formaldehyd [37% ( w/v)]	Sigma-Aldrich, München, D
Formamid	Fluka, Buchs, CH
Glucose	Fluka, Buchs, CH
Glycerol [60% (v/v)]	Fluka, Buchs, CH
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Fluka, Buchs, CH
HAT	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)	Sigma-Aldrich, München, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, München, D
LB-top agar	Sigma-Aldrich, München, D

L-Glutamin	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, München, D
Methanol	J.T. Baker, Philipsburg, USA
Mineralöl	Sigma-Aldrich, München, D
MOPS (6-Morpholinpropansulfonsäure)	Fluka, Buchs, CH
Natriumhydroxide	Merck, Darmstadt, D
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumchloride (NaCl)	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumhydrogencarbonate	Merck, Darmstadt, D
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka, Buchs, CH
Neutralrot	Merck, Darmstadt, D
Nonidet-P40	Fluka, Buchs, CH
Norepinephrine	Sigma-Aldrich, München, D
Nystatin	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Paraformaldehyde	Riedel de Haen, Seelze, D
PBS Dulbecco's (1x) w/o Ca & Mg	PAA, Pasching, A
Poly-ethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich, München, D
Penicillin	Biochrom AG, Berlin, D
Phenol	Sigma-Aldrich, München, D
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1)	Fluka, Buchs, CH
Polyethyleneglycol	Sigma-Aldrich, München, D
RNase inhibitor	Peqlab, Erlangen, D
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, München, D
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich, München, D
Streptomycin sulfat	Biochrom AG, Berlin, D
Sucrose	Fluka, Buchs, CH

Trizma®-HCl	Sigma-Aldrich, München, D
Trypanblau	Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, D
Trypsin/EDTA	Life Technologie, Grand Island, USA
Trypsininhibitor	Life Technologie, Grand Island, USA
Triton X 100	Sigma-Aldrich, München, D
TRIZol Reagent	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Wasser RNase frei (DEPC behandelt)	USB Coporation, Cleveland, USA

**2.12 Antibiotika**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, D.....
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München, D.....

**2.13 Viren und virale Vektoren**

**2.13.1 Viren**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Ad2	Wildtyp Adenovirus Typ 2	PD Dr. S. Weger, Institut für Virologie, Campus Benjamin Franklin, Charité Berlin, D
B19V	Wildtyp Parvovirus B19, Genogruppe 1	Prof. Dr. A.-M. Eis-Hübinger, Institut für Virologie, Bonn, D

### 2.13.2 virale Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
dimer-rAAV	rekombinanter, dimerischer AAV-Vektor	PD Dr. S. Weger, Institut für Virologie, Campus Benjamin Franklin, Charité Berlin, D
monomer-rAAV	rekombinanter, monomerischer AAV-Vektor	PD Dr. S. Weger, Institut für Virologie, Campus Benjamin Franklin, Charité Berlin, D
Ad5	$\Delta E3$ , replikationskompetent	Dr. H. Fechner, CUB, Berlin, D
Ad5-CMVgfp	$\Delta E1A$ , $\Delta E1B$ , $\Delta E13$ , replikationsdefizient, gfp-Transgen unter Kontrolle eines humanen CMV-Promotor	Dr. H. Fechner, CUB, Berlin, D

### 2.14 sonstige Materialien

Cell Culture Insert	BD Falcon, Pasadena, USA
DNA-Loading Buffer	peqlab Biotechnologie GmbH, Berlin, D
Hybond <sup>TM</sup> N Nylon-Membran	Amersham, Buckinghamshire, GB
Kodak Biomax MS Film	Integra Biosciences, Fernwald, D
Whatman-Papier	Whatman International Ltd, GB

### 2.15 Software

- ABI DNA Sequencing Analysis Software (Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D)
- BAS Reader 2.21 (raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt, D)
- BD CellQuest Pro<sup>TM</sup> Software (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D)
- BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Designer (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>)
- GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- GeneConstructionKit Software (Textco BioSoftware, Inc., New Hampshire, USA)
- GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, USA)
- Leica Application Suite Version 3.4.0 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)

Microsoft Office 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

SDS 2.2.2 (Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D)

TINA Version 2.09 (raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt, D)

Zotero 2.1 (Roy Rosenzweig Center for History and New Media, Virginia, USA)

(<http://www.zotero.org/>)

## 3 Methoden

### 3.1 Arbeiten mit Bakterien

#### 3.1.1 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden chemokompetente Zellen verwendet, welche bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert waren. Mit Hilfe einer Impföse wurden die *E.coli*-Bakterien auf eine Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie der Agarplatte beimpft und schüttelnd bei  $37^{\circ}\text{C}$  eine weitere Nacht inkubiert. Mit 500  $\mu\text{l}$  dieser Kultur wurden 50 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben beimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  schüttelnd bis zum Beginn der logarithmischen Wachstumsphase ( $\text{OD}_{600}$  von 0,5) kultiviert. Die Bakterienkultur wurde anschließend in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen für 10 min auf Eis inkubiert, bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (4.000 rpm, 5 min) und das Zellpellet in 50 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation für 15 min auf Eis wurden die Zellen bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (5.000 rpm, 5 min) und das Pellet in 2 ml kalter 50 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 Stunden auf Eis gestellt, mit 20% Glycerin versetzt, in vorgekühlten 1,5 ml-Röhrchen aliquotiert (50 - 100  $\mu\text{l}$  Volumen) und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Zentrifuge Avanti™J-25 (Beckman).

#### 3.1.2 Transformation chemokompetenter Bakterien

Als Transformation wird die Übertragung „nackter“ DNA in ein Empfängerbakterium bezeichnet. Voraussetzung für die DNA-Aufnahme ist, dass die Zellen sich im Zustand der Kompetenz befinden, wobei die Transformationseffizienz entscheidend vom Kompetenzgrad der Bakterien abhängig ist. Für Klonierungen wurden die *E.coli*-Stämme Top 10 und XL-10 Gold verwendet. Beide Stämme wiesen einen Defekt in ihren Rekombinationseigenschaften (*recA*) auf, wodurch die Stabilität eingebrachter Plasmid-DNA erheblich gesteigert wird. Zusätzlich sind beide Stämme in ihren Restriktionssystemen defizient (*mcrA*, *mcrCB*, *mmr*), was zu einer deutlich erhöhten Transformationseffizienz führt.

Für die Transformation chemokompetenter Bakterien wurden 50 bis 100  $\mu\text{l}$  der aliquotierten Zellen auf Eis stehend aufgetaut, mit 10 bis 25  $\mu\text{l}$  eines DNA-Ligationsansatzes vorsichtig

gemischt und für 10 bis 30 min (*E. coli* TOP 10 bzw. *E. coli* XL-10 Gold) auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 bis 60 s (*E. coli* TOP 10 bzw. *E. coli* XL-10 Gold) bei 42°C im Wasserbad wurde der Ansatz für eine weitere Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in 250 µl (*E. coli* Top 10) bzw. 900 µl (*E. coli* XL-10 Gold) LB-Medium aufgenommen und für 30 bis 60 min bei 37°C schüttelnd vorinkubiert. Die Zellsuspension wurde entweder unverdünnt oder in geeigneter Verdünnung auf Agar-Platten mit Selektionsmedium (Ampicillin, 100 µg/ml) ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.1.3 Konservierung von Bakterienzellen**

Die Konservierung von Bakterienzellen erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Hierzu wurde von einer Einzelkolonie eine Übernachtskultur angelegt, von der 1 ml in ein steriles mit Glycerin versetztes (Endkonzentration 20 %) Cryo-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren wurde.

## **3.2 DNA- und RNA-Techniken**

### **3.2.1 DNA-Isolierung aus Bakterien**

#### **3.2.1.1 Plasmidpräparation in kleinem Maßstab (Minipräparation)**

Diese Methode diente der schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien in kleineren Mengen (bis zu 25 µg). Hierzu wurde von einer Einzelkolonie eine 5 ml Übernachtskultur angesetzt (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin). Aus 1,5 ml der Bakterienkultur wurde mit Hilfe des Plasmid Minipräparation Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert.

#### **3.2.1.2 Plasmidpräparation in großem Maßstab (Maxipräparation)**

Mit der Maxipräparation konnten größere Mengen von Plasmid-DNA isoliert werden (bis zu 500 µg), welche durch ihren hohen Reinheitsgrad neben Klonierungen ebenfalls für die Transfektion von Säugetierzellen geeignet war. Hierzu wurden 250 ml LB-Medium im Erlenmeyerkolben (mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin versetzt) mit

1 ml einer Übernachtskultur oder 100 µl Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Kit (Qiagen, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

### **3.2.2 Isolierung eukaryotischer DNA aus Zellen**

Die Isolierung genomischer DNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des *E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II* (peQLab Biotechnologie GmbH, Deutschland). Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen auf Zellkulturplatten mit dem vom Hersteller mitgelieferten Lyse-Puffer lysiert. Anschließend wurde die DNA nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### **3.2.3 Isolierung viraler DNA**

Die Quantifizierung der aus Plasma aufgereinigten B19V-Partikel erfolgte mit Hilfe der qPCR (siehe Kap. 3.4.4). Für die Lyse der B19V-Partikel wurden 10 µl des Virusstocks mit 10 µl EDTA (0,5M), 5 µl Proteinase K (5mg/ml) und 50 µl einer 10%igen DNase-freien SDS-Lösung versetzt und mit TBS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C in einem Schüttler (700 rpm) inkubiert, die virale DNA im Anschluss durch Phenol-Chloroform extrahiert und in 20 µl TE-Puffer gelöst (siehe Kap. 3.2.5).

### **3.2.4 Isolierung niedermolekularer DNA aus eukaryotischen Zellen**

Für den Nachweis neusynthetisierter B19V-DNA in Endothelzellen erfolgte die Trennung der niedermolekularen, viralen DNA von der genomischen nach der Methode von Hirt (166). Hierzu wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und in einem Volumen von 3 ml von der Oberfläche einer 6-Loch-Zellkulturplatte abgekratzt und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation der Zellen für 5 min (900 g bei RT) wurde das Zellpellet in 2 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Zellyse erfolgte bei einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C. Das Zelllysate wurde anschließend auf Eis gestellt, unter vortexen mit 500 µl einer 5 M NaCl-Lösung tropfenweise versehen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach einer folgenden

Zentrifugation für 15 min (12.000 rpm, 4°C) wurde der Überstand mit 2 ml Chloroform extrahiert. Die Probe wurde anschließend für 5 min zentrifugiert (3.000 rpm, RT) und die DNA mit einer 3 M Natriumacetat-Lösung gefällt (siehe Kap. 3.2.7).

### **3.2.5 DNA-Extraktion durch Phenol-Chloroform**

Die Extraktion der DNA aus Zell- und Viruslysaten erfolgte durch Zugabe eines Volumenteils einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:25:1). Das Gemisch wurde durch Schütteln zu einer Emulsion vermischt, kurz stehengelassen und zur Phasentrennung für 15 min zentrifugiert (12.000 rpm, 4°C). Die oberere, wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit einem Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, geschüttelt und erneut zentrifugiert. Zuletzt wurde die DNA der oberen, wässrigen Phase mit Ethanol gefällt (siehe Kap. 3.2.7).

### **3.2.6 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel**

Die Elution von DNA-Fragmenten (z.B. PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente) aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Deutschland). Hierzu wurde die DNA-Probe elektrophoretisch über ein Agarosegel aufgetrennt (siehe Kap. 3.2.8), die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und entsprechend den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

### **3.2.7 DNA-Fällung**

Die Fällung diente der Aufkonzentrierung von DNA. Hierzu wurde die DNA-Probe mit 0,1 Volumenteilen einer 1 M NaCl- oder 3 M Natriumacetat-Lösung und mit 2 Volumenteilen absolutem Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde durchgemischt und für mindestens 15 min bei -20°C gelagert. Nach Zentrifugation der Probe für 15 min (12.000 rpm, RT) wurde das DNA-Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert (12.000 rpm, RT). Nach Lufttrocknen des DNA-Pellets wurde die DNA in sterilem A. dest oder TE-Puffer gelöst und die Konzentration photometrisch mit dem NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer gemessen.

### 3.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Restriktionsfragmente und PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. In Abhängigkeit der Größe der aufzutrennenden DNA wurde Agarose in einer Konzentration von 0,7 bis 2 % (w/v) mit Elektrophoresepuffer (1 x TAE-Puffer) versetzt und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,005 % versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach vollständiger Verfestigung wurden die Kämme entfernt und das Gel in der Elektrophorese-Apparatur vollständig mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. Nach dem Versetzen der DNA-Proben mit 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer wurden die Proben aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 140V/200mA aufgetrennt. Als Längenmarker wurden je nach Größe der zu trennenden DNA verschiedene DNA-Leiter verwendet (*1 kb-DNA-Leiter* für Fragmente größer als 1 kb, *DNA-Leiter Mix* für Fragmente kleiner als 500 bp und *peq Gold o'range* für Fragmente kleiner als 100 bp). Das Bandenmuster der aufgetrennten DNA konnte mit Hilfe eines UV-Transilluminators dokumentiert werden.

### 3.2.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde die monophasische Lösung TRIzol® (Invitrogen™, Life Technologies GmbH, D) verwendet, welche Phenol und Guanidinisothiocyanat (GTC) enthält. Das chaotrope GTC führt zur Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen. Dadurch werden hydrophobe Effekte bei Aminosäuren verstärkt, Proteine denaturiert und somit RNasen inaktiviert. Durch das enthaltene Phenol werden im sauren Milieu denaturierte Proteine und kleinere DNA-Fragmente aus dem Lysat entfernt. Für die Isolierung der RNA wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden 1 ml bzw. 200 µl der TRIzol-Lösung pro Well (bei 6-Well Platten bzw. 48-Well-Platten) auf die Zellen gegeben, durch Auf- und Abpipettieren durchmischt und das Zelllysate in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Die RNA wurde weiterführend nach den Angaben des Herstellers isoliert, in 30 bis 10 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser, USB Corporation Cleveland, USA) gelöst, 10 min bei 60 °C inkubiert und bei – 80 °C gelagert.

### 3.2.10 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Messung gegen Wasser als Referenz lässt näherungsweise folgende Beziehung zur Nukleinsäurekonzentration zu: Nukleinsäurekonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) = Faktor  $\times$   $A_{260}$ , wobei der Faktor bei Doppelstrang-DNA 50, bei Einzelstrang-RNA oder -DNA 40 und bei Oligonukleotiden 33 ist. Diese Angaben beziehen sich auf RNA-freie DNA bzw. auf DNA-freie RNA. Als Verunreinigungen treten häufig auch Phenolreste oder Proteine auf, die stark bei 280 nm absorbieren. Über den Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  lässt sich eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäurepräparation machen. Er sollte einen Wert zwischen 1,8 und 2 ergeben. Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometers.

## 3.3 DNA-Rekombinationstechniken

### 3.3.1 Restriktionsanalyse

Die enzymatische Hydrolyse von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II, die spezifisch palindromische Sequenzen erkennen und die doppelsträngige DNA innerhalb dieser Erkennungssequenz spalten. Dabei entstehen enzymabhängig entweder glatte („*blunt-ends*“) oder einzelsträngige 3'- bzw. 5'-überstehende („*sticky-ends*“) Enden. Die Verdauansätze wurden mit den vom Hersteller (New England Biolabs, Deutschland) für die entsprechenden Enzyme empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen angesetzt. Die verwendete Enzymmenge betrug 1 Unit/ $\mu\text{g}$  DNA, wobei 1 Unit als diejenige Aktivität definiert ist, die bei 37°C 1  $\mu\text{g}$  DNA des Bakteriophagen  $\lambda$  in 1 h vollständig verdaut. Die Restriktionsansätze wurden zwischen 1 bis 16 h je nach Temperaturoptimum des Restriktionsenzym bei entsprechender Temperatur inkubiert.

### 3.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung einer Religation eines DNA-Restriktionsproduktes während einer Ligationsreaktion, wurden die linearisierten DNA-Moleküle dephosphoryliert und somit die Effizienz der Klonierung erhöht. Die Abspaltung der unerwünschten freien 5'-Phosphatgruppe vom DNA-Molekül erfolgte durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm. Hierzu wurde zunächst zur Inaktivierung des

Restriktionsenzym der Restriktionsansatz 20 min bei der für die jeweiligen Restriktionsenzyme angegebenen Denaturierungstemperatur inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 0,1 U Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA zugegeben und die Probe für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von EDTA-Lösung (Endkonzentration: 5 mM) und 20-minütigem Erhitzen bei 75°C wurde die Reaktion abgestoppt. Zur Entfernung der alkalischen Phosphatase wurden die Dephosphorylierungsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt und das entsprechende Fragment aus dem Gel extrahiert (siehe Kap. 3.2.6).

### **3.3.3 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide trugen keine Phosphatgruppe am 5'-Ende. Sollte ein PCR-Amplifikat ohne Restriktionsverdau in ein linearisiertes Plasmid kloniert werden, so wurde nachträglich zur Erhöhung der Klonierungseffizienz eine 5'-Phosphatgruppe eingeführt. Die T4-Polynukleotid-Kinase katalysiert die Übertragung und den Austausch der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP auf das 5'-Hydroxylende von Nucleinsäuren. Die DNA-Probe wurde mit 1/10 Volumen 10 x T4-DNA-Ligasepuffer und 10 Units T4-Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs) in einem Volumen von bis zu 50  $\mu\text{l}$  für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung der T4-Polynukleotid-Kinase (68°C, 10 min) gestoppt und die DNA direkt in die Ligationsreaktion (siehe Kap. 3.3.4) eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

### **3.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter Verbrauch von ATP die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle. Es können so DNA-Fragmente mit glatten oder überstehenden kompatiblen Enden kovalent verknüpft werden. Die Ligationsreaktionen wurden mit dem zur DNA-Ligase mitgelieferten Puffersystem nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für Klonierungszwecke wurden hierzu 50 bis 100 ng des linearisierten Plasmids mit 50 ng des DNA-Fragments (Verhältnis: 1:1 bzw. 2:1) und in einem Gesamtansatz von 20  $\mu\text{l}$  mit 0,5 bis 1 Unit T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt, Deutschland) und mit 2  $\mu\text{l}$  des entsprechenden 10 x Puffers pipettiert. Der Ansatz wurde für 4 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Für die *in vitro* Ligation der Adenovirus-DNA wurden in

einem 40 µl Reaktionsansatz 1 µg des adenoviralen *XbaI*-long arm, 500 ng des linearisierten Shuttle-Plasmids, 1 Unit DNA-Ligase (Stratagene, Kanada) und 4 µl des mitgelieferten Puffersystems zusammen pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Ligationsansätze zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt (siehe Kap. 3.1.2).

### **3.4 Polymerasekettenreaktion**

#### **3.4.1 Prinzip der DNA-Amplifikation mittels PCR**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lässt sich ein spezifischer Nukleinsäurebereich exponentiell amplifizieren (167; 168). Die PCR durchläuft drei sich zyklisch wiederholende Temperaturstufen. Im ersten Schritt (Denaturierungsschritt) werden die doppelsträngigen DNA-Moleküle mit einer Temperaturerhöhung auf 92°C bis 98°C in die Einzelstränge aufgeschmolzen. Im zweiten Schritt (Primerhybridisierung oder Annealing) erfolgt die Anlagerung zweier sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) an die komplementären, einzelsträngigen DNA-Stränge (Matritze), wobei die Annealingtemperatur abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer ist. Die Elongation erfolgt entsprechend dem Aktivitätsoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase bei 68°C bis 72°C. Hierbei findet ausgehend vom 3'-Ende des hybridisierten Primers die Synthese eines Doppelstranges statt. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Auf die Elongation folgt wieder die Denaturierung der DNA. Die neu synthetisierten DNA-Moleküle dienen in den nachfolgenden Zyklen als Matrize, was zu einer exponentiellen Amplifikation der Nukleinsäure führt.

#### **3.4.2 DNA-Amplifizierung mittels PCR**

Die PCR wurde zur Amplifizierung und zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen eingesetzt. In Abhängigkeit der Primer-Länge, Basenzusammensetzung und der Länge und Struktur der zu amplifizierenden DNA wurde die PCR-Reaktion mit unterschiedlichen DNA-Polymerasen und unter verschiedenen PCR-Bedingungen durchgeführt. Die Amplifizierung von DNA für Klonierungszwecke erfolgte mit der Pfu-Polymerase, welche durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Fehlerrate für den Einbau falscher Nukleotide stark verringert. PCR-Reaktionen zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente wurden mit der Taq-Polymerase durchgeführt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und die

Reaktionsbedingungen sind in den Tabellen 3-1 und 3-2 aufgeführt. Die Reaktionszeit lag je nach Amplifikatlänge zwischen 30 s und 2 min.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes

Reagenzien	25 µl Ansatz
10 x Polymerasepuffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Forward-Primer (100 µM)	0,25 µl
Reverse-Primer (100 µM)	0,25 µl
DNA-Template (0,2 - 0,5 µg)	x µl
DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
A. dest.	ad. 25 µl

Tabelle 3-2: Reaktionsbedingungen der PCR

Reaktionsschritt für 18 bis 40 Zyklen	Temperatu r	Zeit
initialer Denaturierungsschritt	94°C	4 min
Denaturierung	94°C	45 s
Annealing	55°C - 60°C	30 s
Elongation	72°C	30 s – 2 min
finale Elongation	72°C	2 min
Kühlung	4°C	5 min
		∞

### 3.4.3 Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR, qPCR) basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, wobei zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen nach jedem durchlaufenen PCR-Zyklus möglich ist. Die Fluoreszenz nimmt hierbei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die qPCR wurde mit Hilfe von TaqMan-Sonden durchgeführt. Hierbei handelt es sich um kurze DNA-Fragmente,

welche mit zwei farbempfindlichen Molekülen markiert sind, dem fluoreszenten Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und dem Quencher-Farbstoff am 3'-Ende. Diese sequenzspezifischen Sonden werden so gewählt, dass sie sich während der Hybridisierungsphase zwischen den beiden Primerpaaren anlagern. Wird die intakte Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. In der Elongationsphase der PCR wird die hybridisierte Sonde jedoch durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase abgebaut und so die Energieübertragung zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Der Farbstoffreporter beginnt nun grünes Licht auszusenden. Die Stärke dieses Lichtsignals wird photometrisch erfasst und verhält sich proportional zur Menge hydrolysierter Sonden und damit zur Zahl neu synthetisierter DNA-Kopien.

In dieser Arbeit wurde eine Minor-Groove-Binder- (MGB-) Sonde verwendet. Sie wies am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher mit einem minor groove binder auf, durch welchen die Schmelztemperatur der Sonde erhöht und somit eine Steigerung der Spezifität erreicht wird. Am 5'-Ende war die FAM-markiert.

### **3.4.4 quantitative Real-Time-PCR**

Die Quantifizierung des B19V-Titers, der relativen VP1/2-mRNA-Expression und der B19V-DNA nach Infektion erfolgte mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR. Das verwendete PCR-System wurde freundlicherweise vom IKDT zur Verfügung gestellt (siehe Kap. 3.4.4). Um mögliche DNA-Verunreinigungen in der präparierten RNA vollständig zu beseitigen, wurden 500 ng der Gesamt-RNA (siehe Kap. 3.2.9) vor der cDNA-Synthese mit DNase I (PeqLab, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl nach den Angaben des Herstellers. Zusätzlich zu der Probe mit der DNase I wurde jeweils als Kontrolle für den DNase-Verdau eine Probe mitgeführt, bei der an Stelle der DNase I nur H<sub>2</sub>O in den Ansatz pipettiert wurde. Nach der Reversen Transkription (Kap.3.4.5) wurde die Real-Time-PCR mit Hilfe des (ABI 7900 HAT Fastreal-time PCR System) und dem TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die Reaktionsbedingungen für die quantitative PCR sind in Tabelle 3-3 und 3-4 aufgeführt.

Tabelle 3-3: Zusammensetzung eines qPCR-Reaktionsansatzes

Reagenzien	25 µl Ansatz
TaqMan® Universal PCR Master Mix	12,5 µl
Primer forward (60 ng/µl) (qPCR-B19V-s)	3 µl
Primer reverse (60 ng/µl) (qPCR-B19V-as)	3 µl
MGB-Sonde (5,0 µM) (qPCR-B19V-MGB)	1 µl
cDNA (25 ng)	4 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	1,5 µl

Tabelle 3-4: Reaktionsbedingungen der qPCR

Reaktionsschritt für 38 Zyklen	Temperatur	Zeit
initialer Denaturierungsschritt	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	15 s
Annealing/Elongation	57°C	1 min
Kühlung	4°C	∞

Für die Quantifizierung der relativen B19V-mRNA-Expression wurde zusätzlich für jede Probe  $\beta$ -Aktin als Referenzgen und interne Kontrolle gemessen, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Hierzu wurde das TaqMan DNA Template Reagents (Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### Auswertung der TaqMan-PCR und Quantifizierung der Nukleinsäure:

#### relative Quantifizierung:

Um die relative Expression der VP1/2-mRNA zu ermitteln, wurde der nach der PCR vom Gerät ermittelte Ct-Wert (Zyklus, an dem die Fluoreszenz der Sonde erstmals über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt) mit dem Ct-Wert des Referenzgens ( $\beta$ -Aktin) derselben

Probe ins Verhältnis gesetzt. Der sich ergebene  $\Delta Ct_1$ -Wert konnte nun mit den  $\Delta Ct_2$ -Werten einer anderen Probe verglichen werden, so dass man den sogenannten  $\Delta\Delta C_t$ -Wert ( $=\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$ ) erhielt. Der relative Expressionsunterschied zwischen Probe 1 und Probe 2 nach folgender Formel berechnet: RQ (relative quantity) =  $2^{-\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2}$

Von jeder Probe wurde in der TaqMan-PCR eine Dreifach-Bestimmung angesetzt und aus den Ct-Werten der Mittelwert errechnet, welcher für die relative Quantifizierung verwendet wurde.

### **absolute Quantifizierung:**

Für die absolute Quantifizierung der TaqMan-Proben wurde eine B19V-Standardreihe mitgeführt, welche aus der dekadischen Verdünnungsreihe und einer definierten Kopienzahl des Plasmids pB19V-STD bestand. pB19V-STD enthält einen Teilbereich des für VP1/2-kodierenden Sequenzabschnitts

### **Berechnung der B19V-Kopienzahl pro Zelle:**

Die Berechnung der B19V-Kopienzahl pro Zelle setzte sich wie folgt zusammen:

$$1. \text{ Zellzahl/TaqMan-Ansatz} = \frac{\text{eingesetzte DNA-Menge (ng) pro TaqMan-Ansatz}}{\text{DNA-Gewicht (ng) pro Zelle}}$$

$$2. \text{ Faktor (x)} = \frac{\text{Zellzahl pro TaqMan-Ansatz}}{\text{Mittelwert (Kopienzahl}_{\beta\text{-Aktin}} \text{ aller Proben)}}$$

$$3. \text{ Zellzahl/TaqMan-Ansatz} = \text{Faktor (x)} \times \text{Kopienzahl}_{\beta\text{-Aktin}} \text{ jeder Probe}$$

$$4. \text{ B19V-Kopien/Zelle} = \text{B19V-Kopienzahl jeder Probe} \times \text{Zellzahl pro TaqMan-Ansatz}$$

Von jeder Probe wurde in der TaqMan-PCR eine dreifach-Bestimmung angesetzt und daraus der Mittelwert bestimmt.

### **Bestimmung des Virustiters:**

Für die Bestimmung des Virustiters der aus Plasma extrahierten B19V-Stocks wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der isolierten B19V-DNA bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-8}$  hergestellt. Für die qPCR wurden die Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  bis  $10^{-8}$  verwendet und vierfach gemessen. Der Virustiter ließ sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Virustiter (Genomäquivalente}/\mu\text{l}) = \frac{\text{Mittelwert (für die qPCR eingesetzte Verdünnungsstufen)} \times \text{Elutionsvolumen (20}\mu\text{l)}}{\text{eingesetzte Virusmenge (10}\mu\text{l)}}$$

### 3.4.5 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Zum Transkriptionsnachweis der Kapsidproteine VP1/2 wurde das Verfahren der Reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) angewendet. Bei der RT-PCR wird ausgehend von RNA ein komplementärer DNA-Strang (cDNA, copyDNA) mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, und eines sequenzspezifischen Primers oder einem Gemisch von Random-Primern synthetisiert. Dabei entsteht ein RNA/DNA-Hybrid, welches nachfolgend für eine PCR eingesetzt werden kann. Die Umschreibung in cDNA mit Hilfe des High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 3.4.6 Sequenzierung von DNA

Alle im Rahmen dieser Arbeit klonierten und untersuchten Plasmid-Konstrukte wurden durch Sequenzierung der jeweiligen Expressionskassetten auf Mutationen überprüft. Für die Sequenzierung der Plasmide und Vektor-DNA wurden 0,4 µg bis 1 µg DNA eingesetzt, mit 1 µl Verdünnungspuffer (Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) und 1 µl Sequenzierungsprimer (10 µM) versetzt und mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 8 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 4 min bei 98°C im Gene-Amp-Thermocycler 9700 erhitzt, 2 µl *Big Dye Prämix* (Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) zugegeben und die PCR-Reaktion über 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 3-5: Reaktionsbedingungen für die Sequenzierungs-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96°C	10 s
Annealing	50°C	5 s
Elongation	60°C	4 min
Kühlung	4°C	∞

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde die DNA für die Sequenzierung aufgearbeitet. Hierzu wurden 90 µl A. bidest, 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 250 µl absoluter Ethanol zum PCR-Ansatz gegeben und für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgenommen und das DNA-Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das DNA-Pellet 5 min bei 56°C getrocknet und in 30 µl A. bidest. gelöst. Die Sequenzierung erfolgte im *Gene Analyzer ABI 310* Kapillar-Sequenzierautomaten (Applied Biosystem®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) und die Auswertung unter Verwendung der *ABI DNA Sequencing Analysis Software*.

### **3.5 Plasmid-Konstruktion**

Für die Konstruktion des Plasmids p6-Luc wurde der p6-Promotor anhand des B19V-Isolats B19V-J35 (GenBank: Accession-Nr. AY386330) mit den Primern PVB19\_384s\_XhoI und PVB19\_595as\_BamHI mittels PCR aus dem infektiösen Klon pB19-M20 amplifiziert. Über die Primer wurden die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *BamHI* an den Promotor generiert und dieser so gegen den TRE-Promotor im pAdTRE-luc (225) ausgetauscht.

Für die Generierung der Konstrukte pcDNA3.1-E1A-13s und pcDNA3.1-E1A-12s wurden die E1A-13s und -12s kodierenden Fragmente über *BamHI/NheI* aus den Plasmiden pTRE-E1A-13s bzw. pTRE-E1A-12s (225) herausgeschnitten und in das *BamHI/XbaI* linearisierte pcDNA3.1 (+)-Plasmid kloniert. Der kodierende Bereich des E1A-11s wurde in Anlehnung an das Adenovirus 5-Isolat aus der Datenbank GenBank mit der Accession-Nr. AC\_000008 von ATG:biosynthetics GmbH (Merzhausen, D) synthetisiert. Das Fragment wurde über *BamHI/XbaI* in das entsprechend geschnittene Plasmid pcDNA3.1-E1A-13s kloniert. Die Plasmidkarten sind im Anhang zu finden.

### **3.6 Zellbiologische Methoden**

#### **3.6.1 Kultivierung von Zellen**

Für die Viruskultivierung, Infektionsstudien und die Expressionsversuche wurden die adhärennten Zelllinien HEK 293 und EA.hy926 verwendet, welche der Zellkultursammlung der Arbeitsgruppe entnommen wurden. Die adhärennt-wachsenden, primären Zellen HCAEC,

HPAEC, HDMEC und HAoEC wurden von Promocell bezogen und die Suspensionszellen UT7/Epo-S1 wurden freundlicherweise von S.Wong zur Verfügung gestellt.

Die Haltung aller Zellkulturen erfolgte in Kunststoffschalen verschiedener Größen bei 37°C in einem mit 5 % CO<sub>2</sub> begasten Feuchtbrutschrank. Als Kulturmedium wurde für die HEK 293-, EA.hy- und UT7/Epo-S1-Zellen DMEM unter Zusatz von 10 % FKS eingesetzt. Dem Medium der EA.hy926-Zellen wurde zusätzlich 1 x HAT, dem der UT7/Epo-S1-Zellen 2 Units/ml humanes, rekombinantes Erythropoetin zugesetzt.

Die adhärent wachsenden Zellen HEK 293 und EA.hy926 wurden durch Trypsinierung vom Kulturboden abgelöst. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen (5 ml pro 25 cm<sup>2</sup> - bzw. 10 ml pro 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche), 2 ml 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung in die Zellkulturflasche gegeben und 2 bis 3 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinierung wurde dann mit Medium inkl. 10 % FKS gestoppt, die abgelösten Zellen resuspendiert und in eine neue Kulturflasche entsprechend der gewünschten Konfluenz ausgesät. Die Suspensionszellen UT7/Epo-S1 wurden zur Subkultivierung für 10 min zentrifugiert (2.000 rpm, 5 min), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 2 ml Medium aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in der gewünschten Zelldichte erneut ausgesät. Die endothelialen Primärzellen wurden nach den Angaben des Herstellers kultiviert. In der Regel wurden alle Zellen zwei Mal pro Woche passagiert.

### **3.6.2 Zellzahlbestimmung**

Für die Bestimmung der Zellzahl und den Anteil der lebenden Zellen wurden die Zellen mit einer Trypanblau-Lösung angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Durch das Trypanblau werden aufgrund ihrer defekten Zellmembran ausschließlich tote Zellen gefärbt. Es wurden jeweils 4 Großquadrate (Q) ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = [(Q1+Q2+Q3+Q4)/4] \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### **3.6.3 Konservierung und Reaktivierung von Zellen**

Zur Konservierung in der Zellkultursammlung wurden die Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % kultiviert, trypsinisiert (siehe Kap. 3.6.1) und in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein

Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min (1.000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurde das Zellpellet in Einfriermedium (95 % FKS, 5 % DMSO) resuspendiert ( $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen/ml). Anschließend wurden 1 ml Aliquots in Cryo-Röhrchen gefüllt und sofort in einer Einfrierbox bei kontrollierter Temperaturabnahme (1°C/min) für mindestens 16 h bei -80°C gelagert. Für die langfristige Konservierung wurden die Zellen in -196°C kalten, flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Reaktivierung wurden die zügig aufgetauten Zellen mit 10 ml kaltem Medium vorsichtig gemischt und für 5 min zentrifugiert (1.200 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet anschließend vorsichtig in 5 ml auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium gelöst, in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz weiter inkubiert.

### **3.6.4 Transfektion eukaryontischer Zellen**

Das Einschleusen nackter DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Die Transfektion der HEK 293-Zellen erfolgte mit Hilfe von Kalziumphosphat. Hierbei entstehen durch Mischen der DNA mit einer Kalziumchlorid-Lösung und Phosphatpuffer (HBS) DNA-Kalziumphosphat-Kopräzipitate, die mit der Zelloberfläche in Kontakt treten und durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen werden. Die auf eine Zellkulturschale kultivierten Zellen wiesen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50-80 % auf. Der pH-Wert des HBS-Puffers wurde vor der Transfektion überprüft, gegebenenfalls auf einen Wert von 7,1 eingestellt und der Puffer anschließend steril filtriert. Für die Vertiefung einer 24-Well-Platte enthielt der Transfektionsansatz 1 µg DNA, 100 µl 250 mM CaCl<sub>2</sub> und 100 µl 2 x HBS-Puffer. Die DNA wurde in der CaCl<sub>2</sub>-Lösung verdünnt, tropfenweise der 2 x HBS-Puffer hinzugegeben, und nach einer Inkubation von 1 min bei RT wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in das Zellkulturmedium pipettiert. 24 h nach Transfektion folgte ein Mediumwechsel.

Die Transfektion der primären Endothelzellen und der Zelllinie EA.hy926 erfolgte über das Liposomen ausbildende Transfektionsreagenz Lipofectamine<sup>TM</sup> LTX (Invitrogen, Mannheim, D) unter Zugabe des PLUS Reagenz nach den Angaben des Herstellers. 3 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel.

Bei den Ko-Transfektionsexperimenten zur Analyse der einzelnen adenoviralen Funktionen wurde von den entsprechenden Expressionsplasmiden je die gleiche DNA-Menge pro

Transfektionsansatz eingesetzt. Zum Ausgleich der DNA-Mengen in den Transfektionsansätzen wurde das pKex verwendet, welches einen CMV-Promotor ohne Transgen enthielt.

### **3.7 Virologische Methoden**

#### **3.7.1 B19V-Extraktion aus Serum**

Das in dieser Arbeit verwendete B19V wurde aus Patientenplasma isoliert. Das Plasma für die Untersuchungen zur Rezeptor-vermittelten B19V-Aufnahme wurde freundlicherweise von Prof. Eis-Hübinger (Universitätsklinikum Bonn, Institut für Virologie, Bonn) zur Verfügung gestellt. Das Plasma zur Untersuchung der Transaktivierung des p6-Promotors durch adenovirale Helferfunktionen wurde von Dr. Gubbe (Institut für Transfusions- und Immunhämatologie, DRK, Dresden) zur Verfügung gestellt. Die isolierten B19V-Stämme beider Plasmen gehörten der Genogruppe 1 an.

Für die Aufreinigung wurden 10 ml des virushaltigen Plasmas auf 2 ml einer tiefgefrorenen, 20%igen Sucrose/1x PBS-Lösung in Ultrazentrifügeröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden bis ca. 0,5 cm unter den oberen Rand mit 1x PBS aufgefüllt und bei 100.000 g (2 h, 4°C) in einem Beckmann SW-40 Ti-Rotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und in 10 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte nach Isolierung der viralen DNA (Kap. 3.2.3) und wurde mittels qPCR (siehe Kap. 3.4.4) bestimmt.

#### **3.7.2 Bestimmung der biologisch aktiven adenoviralen Partikelkonzentration**

Die Bestimmung der biologisch aktiven (infektiösen) adenoviralen Viruspartikel erfolgte mit Hilfe eines Plaque-Assays. Hierzu wurden 10 µl der Virusprobe mit 990 µl DMEM-Medium (2 % FKS) verdünnt. Ausgehend von dieser  $10^{-2}$ -Verdünnung wurde eine Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-9}$  angesetzt. 900 µl der Verdünnungsstufen  $10^{-4}$  bis  $10^{-9}$  wurden auf eine mit HEK 293-Zellen konfluent-gewachsene 6-Well-Platte gegeben und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde eine autoklavierte, 5 %ige Low-Melting-Agarose-Lösung langsam in der Mikrowelle zum Schmelzen gebracht und in einem Wasserbad auf 42°C temperiert. Anschließend wurde die flüssige Agarose mit 37°C warmen

Medium in einem Verhältnis von 1:4 (1,25 %iges Agarose-Medium) vermischt und nach Absaugen der Virusverdünnung zum Überschichten der HEK 293-Zellen verwendet (3 ml pro 6-Well). Nach Verfestigung der Agarose bei Raumtemperatur wurden die Platten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter inkubiert. Innerhalb von 14 Tagen bildeten sich virale Plaques, die ausgezählt und zur Berechnung des Virustiters benötigt wurden. Der Virustiter berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Virustiter (pfu/ml)} = \frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsstufe}}{\text{Volumen der Virusverdünnung}}$$

### **3.7.3 Infektion von Zellkulturen**

#### **3.7.3.1 Ko-Infektion von B19V und Ad2 bzw. Ad5**

Für die Ko-Infektionsexperimente wurden die Zellen zunächst mit  $1 \times 10^4$  Genomäquivalenten B19V pro Zelle für 24 h bei 37°C infiziert inkubiert. Die Infektion erfolgte in einer 24-well- bzw. 48-well-Platte mit einem Infektionsvolumen von 500 µl bzw. 300 µl. Anschließend folgte die Infektion mit Adenovirus Typ 2 oder 5 mit einer MOI von 10 bei 37°C. Nach einer Infektionsdauer von 3 h folgte ein Mediumwechsel und eine Inkubation der Zellen für weitere 48 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen geerntet und abhängig von der weiterführenden Detektionsmethode aufbereitet.

Die MOI (multiplicity of infection) berechnet sich aus der Zellzahl und dem Virustiter. Eine MOI von 1 bedeutet, dass pro Zelle ein Viruspartikel für die Infektion eingesetzt wird.

#### **3.7.3.2 Infektion mit Ad2 bzw. Ad5 mit anschließender Transfektion**

Die Zellen wurden mit Ad2 bzw. Ad5 mit einer MOI von 10 und einem Infektionsvolumen von 500 µl in einer 24-well-Platte für 1 h infiziert. Anschließend folgte die Transfektion der Zellen mit pB19V-M20 bzw. den p6-Promotor-Luziferasekonstrukten mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ LTX (Invitrogen, Mannheim, D) nach den Angaben des Herstellers. Nach einer 3-stündigen Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsmix folgte ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation für 48 h bei 37°C. Die Zellen wurden je nach Detektionsmethode entsprechend geerntet und aufgearbeitet.

## 3.8 Nachweismethoden der Proteinexpression

### 3.8.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen auf Einzelzellebene. Grundlage dieser Technik ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die in Suspension befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und vereinzelt an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeführt. Hierbei wird der Fluoreszenzfarbstoff des Antikörpers angeregt und die angeregten Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen wieder auf ihr Ausgangsenergieniveau zurück. Die emittierte Photonenenergie wird von einem Photodetektor gemessen. Sie verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Durch das Erfassen der Lichtbeugung und -streuung lassen sich zusätzlich Informationen über die Größe und Granularität der Zellen gewinnen. Die Lichtsignale, die den physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen entsprechen, werden quantifiziert und für jede Zelle einzeln in einen Datenspeicher geschrieben. Die Auswertung der erfassten Rohdaten erfolgt per Computer und ermöglicht eine korrelierte Untersuchung der Messparameter für verschiedene Populationen von Zellen. Für die Bestimmung des Expressionsprofils der B19V-spezifischen Rezeptoren auf Endothelzellen, der Infektionsrate der EA.hy926-Zellen mit Adenovirus und der Stimulierung der B19V VP1/2-Expression durch Adenovirus wurden FACS-Messungen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen entsprechend dem Versuchsaufbau in der gewünschten Zelldichte in 6-Well Platten ausgesät und für die folgenden FACS-Messungen unbehandelt aufbereitet bzw. im Vorfeld mit dem Adenovektor Ad5-CMVgfp transduziert und dem infektiösen pB19-M20-Plasmid transfiziert. Für die Bestimmung der zellulären Oberflächenexpression der B19V-Rezeptoren wurden die Zellen durch Abkratzen von der Oberfläche der Kulturschale geerntet, einmal mit 1 x PBS gewaschen und für 5 min zentrifugiert (2.000 rpm, 4°C). Die Zellen wurden anschließend in 1 ml einer 2 %igen Formaldehyd-Lösung resuspendiert und 20 min bei RT fixiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und dem erneuten Waschen der Zellen mit 1 x PBS, folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch eine Inkubation der Zellen mit 1 ml einer 2 %igen Endobolinlösung für 10 min bei 4°C. Anschließend wurde die Markierung mit den Antikörpern vorgenommen. Hierzu wurden der primäre Antikörper in einem Verhältnis von 1:400 in 1x PBS verdünnt und die Zellen für 1 h bei 4°C mit 50 µl der Antikörperlösung inkubiert. Nach der Zentrifugation der Zellen für 5

min (2000 rpm, 4°C) folgte ein Waschschrift mit 1x PBS und die Inkubation der Zellen für 1 h bei 4°C in 50 µl des 1:400 in 1x PBS-verdünnten sekundären mit AF488 bzw. AF594-gekoppelten anti-IgG-Antikörpers. Die Zellen wurden einem letzten Waschschrift unterzogen, in 100 µl FACS-Puffer (0,5 % BSA in 1x PBS) gelöst und gemessen. Für die Messung der intrazellulären Expression der B19V-Rezeptoren wurden die Zellen nach der Fixierung mit Formaldehyd permeabilisiert. Hierzu wurden sie für 30 min mit 1 ml einer 90 %tigen auf -20°C gekühlte Methanol-Lösung auf Eis inkubiert und anschließend wie oben beschrieben blockiert und mit den Antikörpern markiert. Die Messungen wurden am FACS Calibur vorgenommen und die Ergebnisse mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

### **3.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz**

Die Indirekte Immunfluoreszenz basiert auf eine Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der der Antigen-spezifische Antikörper unmarkiert ist und durch die Bindung eines sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörpers nachgewiesen wird. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde zum Nachweis der B19V-Rezeptoren und virusspezifischer Antigene in infizierten Zellen eingesetzt. Die Detektion von Antigen-Antikörper-Komplexen erfolgte durch Einsatz eines mit AF488 bzw. AF594 gekoppelten sekundären anti-IgG-Antikörpers. Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Well-Platte ausgesät (HEK 293:  $2 \times 10^5$  Zellen/Well, EA.hy926:  $1 \times 10^5$  Zellen/Well) und 24 h bei 37°C inkubiert. Für den Nachweis der B19V-Rezeptoren wurden die Zellen am nächsten Tag direkt für die Immunfluoreszenz-Markierung verwendet. Für den Nachweis virusspezifischer Antigene wurden die Zellen entsprechend dem Versuchsaufbau transfiziert und transduziert bzw. infiziert und für 48 h im Brutschrank weiter inkubiert. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen zunächst zweimal mit 1 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Fixierlösung (siehe Kap. 2.9) für 10 min bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschriften mit jeweils 1 ml TBS folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch eine Inkubation für 20 min bei RT mit 200 µl Blockierungslösung (siehe Kap. 2.9). Anschließend wurde die Antikörpermarkierung durchgeführt, bei der die Zellen für 1 h bei RT mit dem in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper (1:400) inkubiert wurden. Die Zellen wurden erneut dreimal mit TBS gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde bei RT mit dem in Blockierungslösung verdünnten sekundären Antikörper (1:400) in einer abgedunkelten Kammer inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschriften mit TBS, wobei nach dem letzten Waschschrift das TBS

vollständig entfernt wurde. Abschließend wurde auf die Zellen ein Tropfen DAPI-Fluoromount-G<sup>TM</sup> gegeben, das Deckgläschen mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig aus der 24-well-Platte gehoben, mit der Oberseite nach unten gerichtet auf einen Objektträger gelegt und leicht angedrückt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Leica DMI 4000 B Immunofluorescence Mikroskop unter Verwendung der Kamera Leica DFC 340 FX und der Software Leica Application Suite Version 3.4.0.

### **3.8.3 Luciferase-Assay**

Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin mit Hilfe des Coenzym ATP und molekularem Sauerstoff unter Abgabe eines Photons in Form einer messbaren Lumineszenz. Die Luciferase der amerikanischen Firefly (*Photinus pyralis*) wurde als Reporter bei Expressionsanalysen für die Untersuchung der B19V-Promotoraktivität verwendet. Die Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät, entsprechend dem Versuchsaufbau am nächsten Tag transduziert bzw. transfiziert und je nach Versuchsaufbau für 12 h bis 48 h bei 37°C weiter kultiviert. Der Nachweis der Luciferase-Expression erfolgte mit Hilfe des Bright-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay Systems entsprechend den Anweisungen des Herstellers und die Luciferase-Aktivität wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm mit einer Meßzeit von 15 s mit dem Lumat LB 9501 Luminometer bestimmt.

## **3.9 Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen**

### **3.9.1 DNA-Transfer mittels Southern-Blot**

Mit Hilfe des Southern Blots, bei dem elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Moleküle auf eine Trägermembran transferiert werden, können DNA-Moleküle durch Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden spezifisch nachgewiesen werden. Der Southern Blot wurde zum Nachweis der B19V-DNA in HEK 293- und EA.hy926-Zellen verwendet. Hierzu wurden 6 µg nach Hirt aufgereinigter DNA (siehe Kap. 3.2.4) mit DpnI-verdaut und elektrophoretisch mit einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA durch eine Inkubation des Gels für 10 min in einer 0,25 M HCL-Lösung depurinisiert. Nach zwei kurzen Waschschritten in A. dest. wurde das Agarosegel dreimal für 30 min in Denaturierungspuffer (siehe Kap. 2.9) geschwenkt, wodurch die Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA überführt wurde. Anschließend wurde das Agarosegel dreimal für 30 min

in Neutralisierungspuffer (siehe Kap. 2.9) inkubiert und die DNA mittels Kappilar-Blot auf eine Nylonmembran transferiert (siehe Kap. 3.9.2) und hybridisiert (siehe Kap. 3.9.5.5).

### 3.9.2 Kapillar-Blot

Der Transfer von Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran erfolgte durch einen Kapillar-Blot, wobei der Nukleinsäuretransfer durch eine gerichtete Ionenwanderung erzielt wird. Hierzu wurde in 10x SSC grtränktes Whatman-Papier auf einen ebenen Untergrund gelegt und die Enden in 10x SSC-Puffer getaucht. Das Agarosegel wurde auf das Whatman-Papier gelegt (mit den Taschenöffnungen nach unten gerichtet) und ringsum auf allen Seiten mit einer Plastikfolie abgedeckt, um sicherzustellen, dass der Flüssigkeitsstrom ausschließlich an der Membran stattfindet. Auf das Gel wurden nun nacheinander eine feuchte Nylonmembran (*Hybond<sup>TM</sup> N-Hybridisation Membran*; Amersham), ein feuchtes und ein trockenes Whatman-Papier sowie ein Stapel trockener Papiertücher geschichtet (Abb. 3-1). Der Blot wurde dann mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert und über Nacht stehen gelassen. Der vollständige Transfer der RNA wurde durch eine Überprüfung des Gels unter dem Transilluminator kontrolliert. Die Position der 18S- und 28S-rRNA-Bande (für RNA) oder DNA-Marker (für DNA) wurde auf dem Filter markiert, der Filter beschriftet und 30 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die RNA durch zweimaliges Cross-linken unter UV-Licht ( $150 \text{ mJoule/cm}^2$ ) in einem Strata Linker 1200 kovalent an die Membran gebunden und die Membran bis zur Hybridisierung bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

\*20x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat

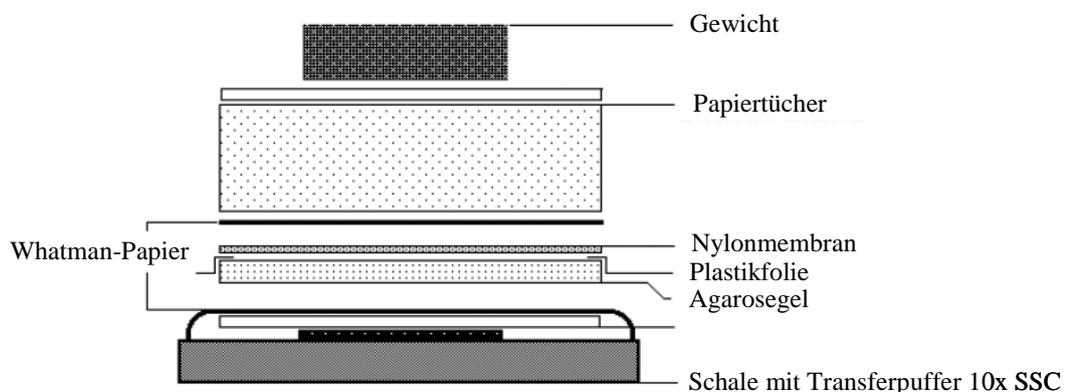


Abbildung 3- 1: Schematischer Aufbau eines Kapillarblots

### 3.9.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels PCR (siehe Kap. 3.4.29.3) nach dem Reaktionsansatz aus Tabelle 3-6. Das Prinzip der DNA-Markierung beruht auf der Synthese eines komplementären DNA-Matrizenstranges mit Hilfe der Taq-Polymerase unter Verwendung radioaktiv markierter Nukleotide. Als Sonde diente mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP radioaktiv markierte Einzelstrang-DNA, die unter Verwendung des entsprechenden sense- bzw. *antisense*-Primers (*Southern Blot*) mit Hilfe einer PCR hergestellt wurde.

Tabelle 3-6: Reaktionsansatz für die Herstellung von Einzelstrang-DNA-Sonden

Reagenzien	25 µl Ansatz
10x Taq PolymerasePuffer	2,5 µl
dNTP ohne dCTP (1 mM)	0,5 µl
Primer (100 µM)	0,25 µl
DNA-Matrize (100 ng)	X µl
Taq-Polymerase (5 Units/ µl)	0,25 µl
A. bidest	ad 25 µl
Mineralöl zur Überschichtung	15 µl
$^{32}\text{P}$ dCTP (10 µCi/ µl)	3 – 5 µl

### 3.9.4 Reinigung radioaktiv markierter Sonden

Die radioaktiv markierten PCR-Produkte wurden über Sephadex-Säulen gereinigt. Hierzu wurde in A. bidest gelöstes Sephadex G-50 luftblasenfrei von oben in eine Pasteurpipette geschichtet. Unter Plexiglas-Schutz wurde die Sonde zugegeben und durch Zugabe von A. bidest über die Polymersäule gespült. Die erste Fraktion von etwa 500 µl Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden acht Fraktionen je 50 µl aufgefangen und die Radioaktivität jeder Fraktion mit dem Bioscan QC 2000 gemessen. Die Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität wurden vereinigt und für die Hybridisierung verwendet.

### **3.9.5 Hybridisierung von Nukleinsäuren mit markierten DNA-Fragmenten**

Die Membran wurde in Hybridisierungsröhren mit 5 bis 10 ml ExpressHyb Hybridization Solution im Hybridisierungs-ofen bei 60°C (*Southern Blot*) für 30 min prähybridisiert. Anschließend wurden 500 µl der entsprechenden aufgereinigten Sonde (siehe Kap. 3.9.4) hinzugegeben und die Membran für 1 h bei 60°C (*Southern Blot*) hybridisiert. Nach Entfernen der Hybridisierungslösung wurde die Membran einmal für 15 min mit 10 ml Waschlösung I (siehe Kap. 2.9) bei RT und anschließend zweimal für 20 min mit je 20 ml der Waschlösung II bei 50°C gewaschen. Für die folgende Auswertung wurde die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

### **3.9.6 Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte**

Für die Detektion radioaktiv markierter DNA-Fragmente wurde hybridisierte Nylonmembran in eine Filmkassette gelegt und entweder nach Auflegen eines Röntgenfilms (FujiFilm-BAS-1500-Film-Kassette) bei - 80°C oder nach Auflegen einer Phosphoimager-Belichtungsplatte (Fuji Film-Platte BAS-1500) bei Raumtemperatur oder bei 4°C für mehrere Stunden bis hin zu mehreren Tagen inkubiert. Der Röntgenfilm wurde anschließend entwickelt und die Phosphoimager-Belichtungsplatte mit dem „Fuji Bas 2000 Phospho-Imager“ (Fuji) und der Software BAS Reader 2.21 digitalisiert. Die Intensität des Hybridisierungssignals wurde densitometrisch mittels Phosphoimaging unter Verwendung der Software Tina (Version 2.09g ©raytest Isotopenmessgeräte GmbH) bestimmt.

### **3.9.7 Waschen radioaktiv markierter DNA-Fragmente**

Nach der Auswertung der Membran wurde die Sonde durch Inkubation in einem Wasserbad bei 95 bis 98°C durch 5-minütiges Schwenken in 0,5 %igem SDS von der Membran gelöst (Strippen). Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis kein radioaktives Signal mehr gemessen wurde. Die Membran konnte anschließend für eine weitere Hybridisierung (siehe Kap. 9.5) verwendet werden und wurde solange bei -20°C gelagert.

### **3.10 Statistische Evaluierung**

Die Berechnung statistischer Parameter erfolgte mit Hilfe des Student-t-Test. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden bei einem p-Wert von  $< 0,05$  als signifikant bewertet.

## 4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Rolle des Rezeptor-vermittelten Aufnahmemechanismus von B19V in der Pathogenese der kardio-endothelialen B19V-Infektion sowie mögliche Reaktivierungsmechanismen von B19V durch humane Adenoviren untersucht.

### 4.1 Rezeptor-vermittelte Bindung und Internalisierung von B19V

Die Bindung von B19V an die Zelloberfläche wird durch den Hauptrezeptor, dem Erythrozyten-P-Antigen, vermittelt (169). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass das P-Antigen für eine B19V-Infektion nicht ausreichend ist, und dass weitere Rezeptoren für die Virusaufnahme eine Rolle spielen müssen (170). Das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin wurde daraufhin auf Knochenmarkszellen und der adhärennten humanen erythroiden Leukämiezelllinie K562 als Ko-Rezeptor für eine B19V-Infektion identifiziert (42). In nachfolgenden Studien zur Funktion des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins als Ko-Rezeptor für die B19V-Infektion stellte sich heraus, dass das  $\beta_1$ -Integrin für seine Ko-Rezeptorfunktion in einem aktivierten Zustand vorliegen muss (42; 48; 58). Zusätzlich zum  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin wurde später das KU80-Autoantigen auf Knochenmarkszellen und der humanen erythroiden Zelllinie Ku812Ep6 als weiterer Ko-Rezeptor für die Internalisierung von B19V identifiziert (63).

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Rezeptor-abhängige Aufnahme von B19V in Endothelzellen untersucht werden. Hierzu sollte die B19V-Rezeptorexpression auf Endothelzellen charakterisiert, das B19V-Adsorptions- und -Internalisierungsverhalten von Endothelzellen untersucht und die Rolle der B19V-Rezeptoren durch Modulation ihrer Expression analysiert werden.

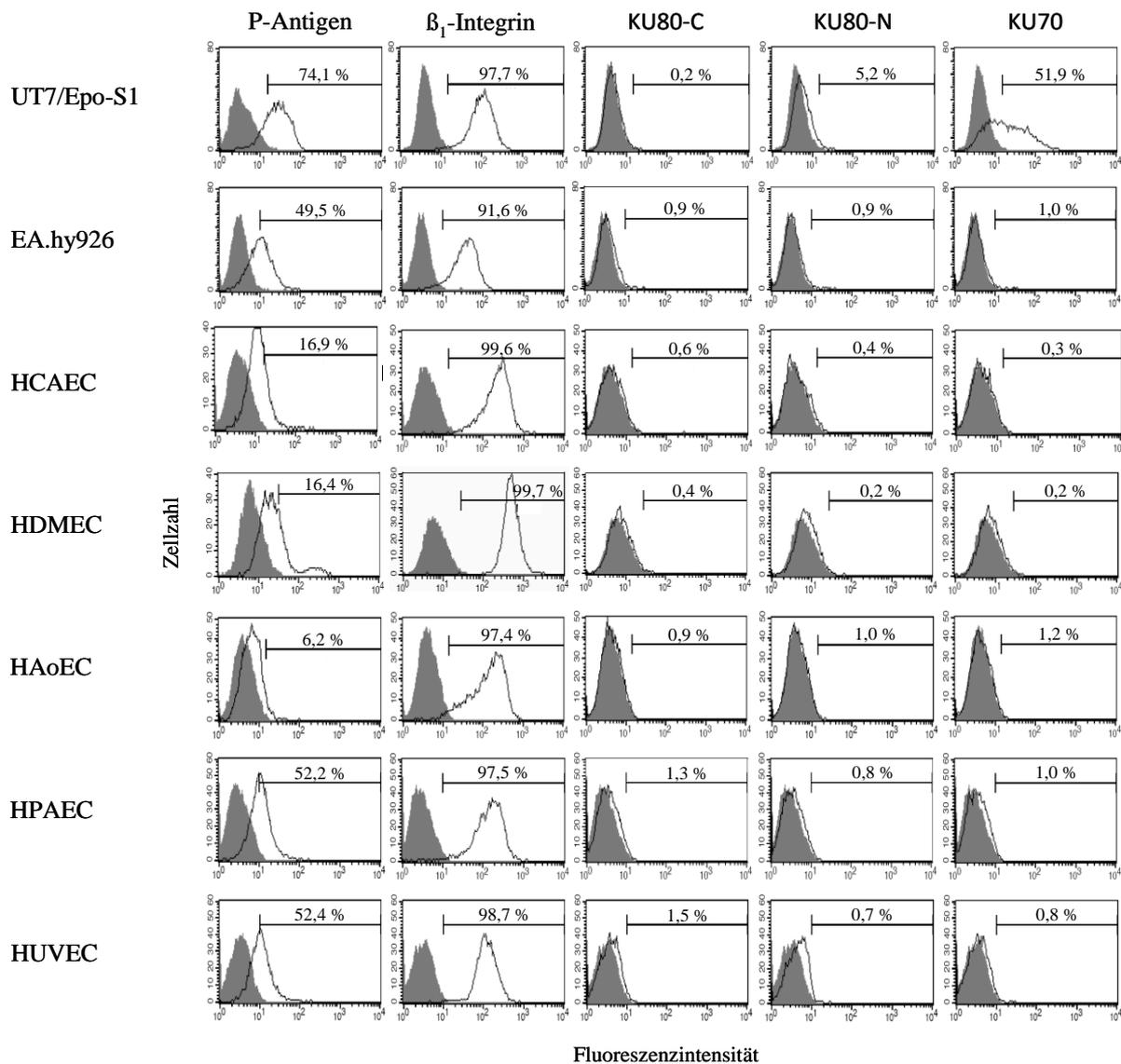
#### 4.1.1 Analyse der B19V Rezeptorexpression in Endothelzellen

Da es bisher keine Untersuchungen zur Expression der B19V-Rezeptoren auf Endothelzellen gab, wurden zu Beginn dieser Arbeit mit Hilfe von FACS-Messungen umfassende Analysen bezüglich des Expressionsprofils verschiedener humaner Endothelzellen hinsichtlich der B19V-Rezeptoren P-Antigen,  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und KU80-Autoantigen durchgeführt. Die Untersuchungen wurden an endothelialen Primärzellen der Koronararterie (HCAEC), der Haut (HDMEC), der Aorta (HAoEC), der Pulmonalarterie (HPAEC) und der Nabelschnur (HUVEC) vorgenommen. Zusätzlich wurde das Expressionsprofil der permanenten

endothelialen Hybridzelllinie EA.hy926 analysiert, welche durch die Fusion humaner Nabelschnurzellen (HUVEC) und der epithelialen Lungenkarzinomzellen A549 gewonnen wurde (171). Die für B19V semi-permissive erythroide Zelllinie UT7/Epo-S1 diente als Referenz.

Die UT7/Epo-S1 Zellen zeigten die stärkste Expression des B19V-Attachmentrezeptors P-Antigen (Abb. 4-1). Auf den Endothelzellen reichte die Anzahl der für P-Antigen positiven Zellen von 6 % bei den HAoEC bis hin zu 52 % bei den HUVEC und den HPAEC. Das  $\beta_1$ -Integrin konnte mit mindestens 91,6 % der EA.hy926-Zellen bis hin zu 99,7 % der HDMEC auf allen untersuchten Endothelzellen nachgewiesen werden.

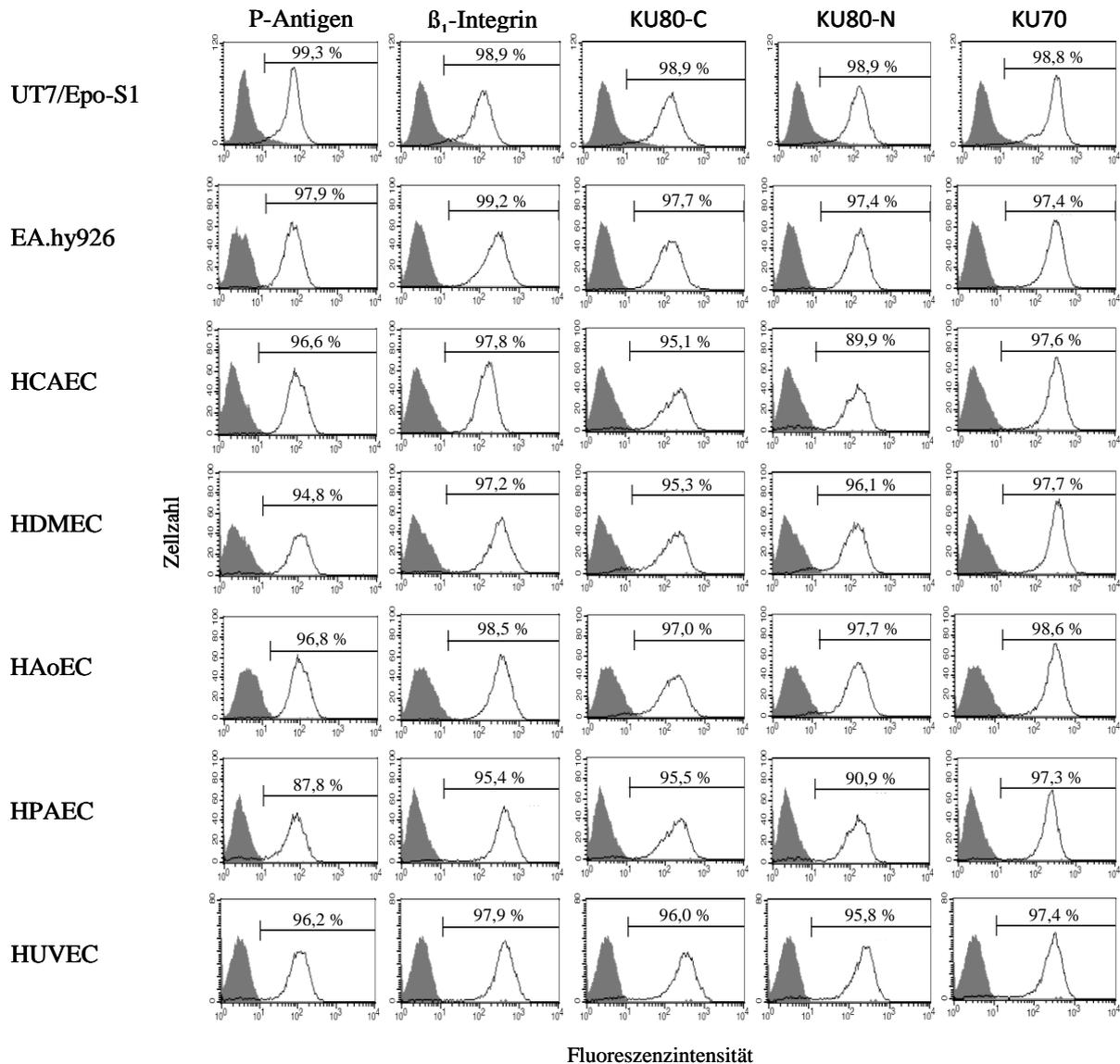
Da das KU80-Autoantigen als Heterodimer mit dem KU70 auftritt und keine weiteren Details zur Orientierung des Heterodimers in der Zellmembran bekannt sind, wurden für die Detektion des KU80 ein N- und ein C-Terminus spezifischer Antikörper verwendet. Zusätzlich wurde die Expression des KU70 analysiert. Die beiden Untereinheiten des Heterodimers KU80/70 konnten in allen untersuchten Endothelzellen zu nur maximal 1,5 % nachgewiesen werden. In den UT7/Epo-S1 Zellen ließ sich auf 5 % der Zellen ausschließlich der N-Terminus von KU80 detektieren. Der C-Terminus war nicht nachweisbar. Für KU70 waren hingegen 52 % der Zellen positiv.



**Abbildung 4- 1: FACS-Analyse zum extrazellulären Expressionsprofil der B19V-spezifischen Rezeptorproteine auf Endothelzellen.** Die B19V-Rezeptoren wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. P-Antigen: polyklonaler rabbit anti-globoside GL-4 Antikörper (Verdünnung 1:100);  $\beta_1$ -Integrin: monoklonaler mouse anti-Human Integrin  $\beta_1$  Antikörper (P4C10); KU80 C-Terminus: monoklonaler mouse Ku Ab-2 Antikörper (111); KU80 N-Terminus: monoklonaler mouse Ku Ab-7 Antikörper (S10B1); KU70: monoklonaler mouse Ku Ab-4 Antikörper (N3H10). Alle primären Antikörper wurden, wenn nicht anders vermerkt, in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Als sekundäre Antikörper wurden goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594 bzw. goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 594 in einer Verdünnung von 1:400 verwendet. Für die FACS-Analysen wurden 10.000 Zellen ausgezählt. Die grauen Kurven in den Histogrammen stellen die Negativkontrollen (mit ausschließlich den entsprechenden sekundären Antikörpern markierte Zellen) dar. Die für B19V semi-permissiven Zellen UT7/Epo-S1 dienen als Referenz. Die Prozentangaben geben die Anzahl der positiven Zellen wieder.

Da sowohl der C- als auch der N-Terminus des KU80-Autoantigens nur in sehr geringen Mengen auf allen getesteten Endothelzellen und der für B19V semi-permissiven Zelllinie UT7/Epo-S1 nachgewiesen werden konnte, wurde als Kontrolle zusätzlich zur Oberflächenexpression die intrazelluläre Expression der einzelnen Proteine analysiert. Hierzu

wurden die Zellen vor der Antikörpermarkierung permeabilisiert (siehe Kap. 3.8.1). Die Ergebnisse dieser FACS-Analyse sind in Abbildung 4-2 dargestellt.



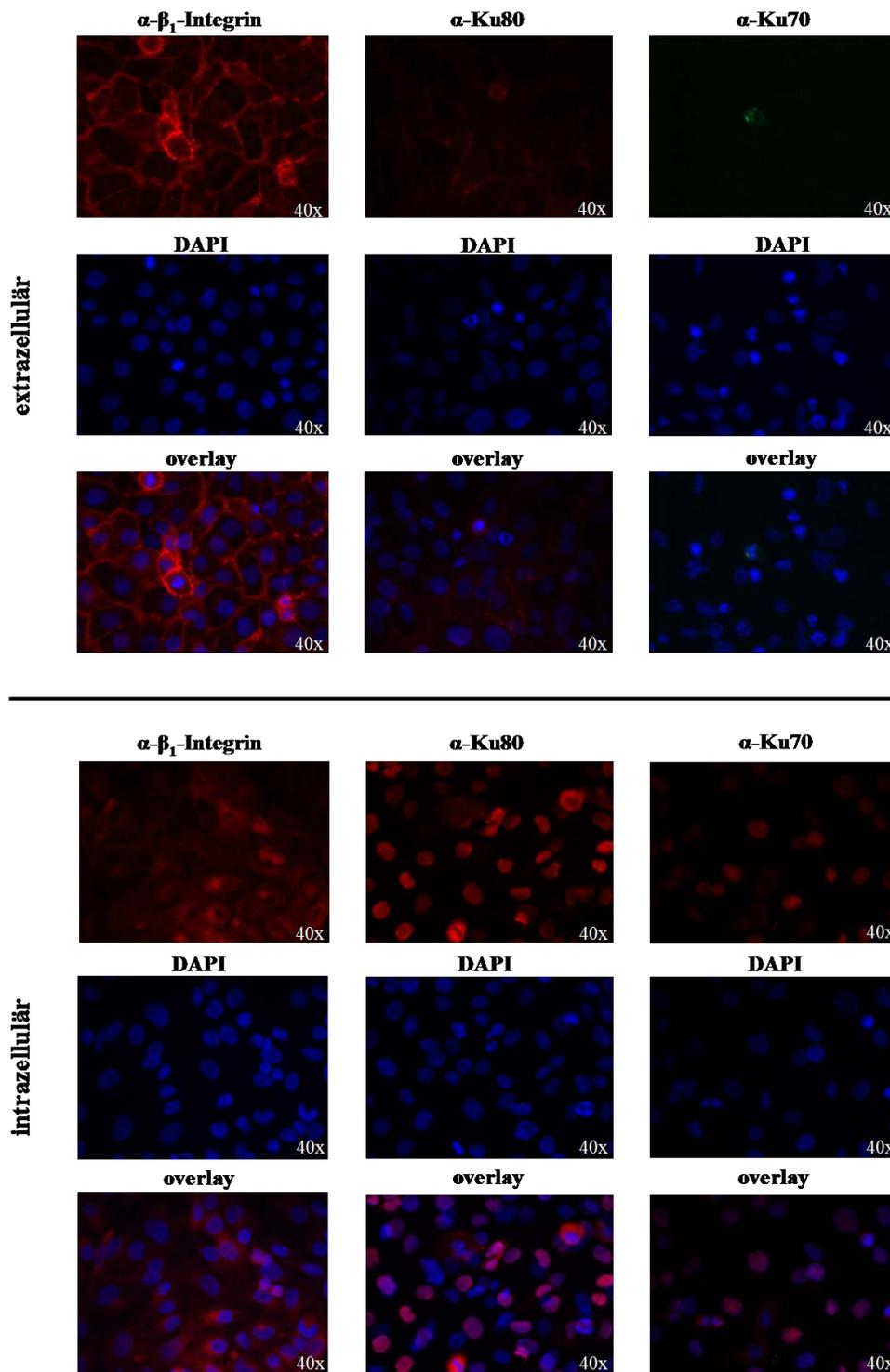
**Abbildung 4- 2: FACS-Analyse zum intrazellulären Expressionsprofil der B19V-spezifischen Rezeptorproteine in Endothelzellen.** Für den Nachweis der intrazellulären Expression der Rezeptorproteine wurden die Zellen vor der Antikörpermarkierung permeabilisiert. Die B19V-Rezeptoren wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. P-Antigen: polyklonaler rabbit anti-globoside GL-4 Antikörper (Verdünnung 1:100);  $\beta_1$ -Integrin: monoklonaler mouse anti-Human Integrin  $\beta_1$  Antikörper (P4C10); KU80 C-Terminus: monoklonaler mouse Ku Ab-2 Antikörper (111); KU80 N-Terminus: monoklonaler mouse Ku Ab-7 Antikörper (S10B1); KU70: monoklonaler mouse Ku Ab-4 Antikörper (N3H10). Alle primären Antikörper wurden, wenn nicht anders vermerkt, in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Als sekundäre Antikörper wurden goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594 bzw. goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 594 in einer Verdünnung von 1:400 verwendet. Für die FACS-Analysen wurden 10.000 Zellen ausgezählt. Die grauen Kurven in den Histogrammen stellen die Negativkontrollen (mit ausschließlich den entsprechenden sekundären Antikörpern markierte Zellen) dar. Die für B19V semi-permissiven Zellen UT7/Epo-S1 dienen als Referenz.

Die intrazelluläre Expression der B19V-Rezeptoren war in allen untersuchten Zellen ähnlich stark (Abb. 4-2). Die Expression des P-Antigens fiel im Vergleich zur extrazellulären Expression, bei der zwischen 6,2 % (HAoEC) und 74,1 % (UT7/Epo-S1) der Zellen positiv waren, intrazellulär mit 87,8 % (HAoEC) bis 99,3 % (UT7/Epo-S1) weniger variabel und deutlich höher aus. Mit 95,4 % (HPAEC) bis 99,2 % (EA.hy926) war die intrazelluläre  $\beta_1$ -Integrin-Expression in allen getesteten Zellen vergleichsweise hoch wie extrazellulär. Das primär im Zellkern lokalisierte KU80 und dessen Heterodimerisierungspartner KU70 waren wie zu erwarten in allen untersuchten Zellen mit 89,9 % bis 98,9 % nachzuweisen. Im Vergleich der Expression des C- und des N-Terminus des KU80-Autoantigens ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Zur Überprüfung der mittels FACS-Analyse erhobenen Resultate wurde zusätzlich eine indirekte Immunfluoreszenz mit den endothelialen EA.hy926-Zellen durchgeführt. Für den extrazellulären Nachweis der Rezeptoren wurden die Zellen unpermeabilisiert mit den entsprechenden Antikörpern markiert. Der Nachweis der intrazellulären Lokalisation der Proteine erfolgte an permeabilisierten Zellen (siehe Kap. 3.8.2).

Das  $\beta_1$ -Integrin ließ sich eindeutig sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär im Zytoplasma detektieren. Der Nachweis von KU80 und KU70 war ausschließlich intrazellulär möglich. Hierbei zeigte sich eine primäre Lokalisation im Nukleus. In mitotisch-aktiven Zellen, die in dieser Zellzyklusphase keine Kernmembran aufweisen, waren die Proteine im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Der Nachweis des P-Antigens mittels indirekter Immunfluoreszenz war nicht möglich, da der Antikörper sich für diese Nachweismethode als ungeeignet herausstellte. Die Ergebnisse zur extra- und intrazellulären Rezeptorexpression in EA.hy926-Zellen (siehe Abb. 4-1 und 4-2) ließen sich durch die indirekte Immunfluoreszenz bestätigen.

Die Analyse der B19V-Rezeptorexpression in Endothelzellen zeigte, dass das P-Antigen und das  $\beta_1$ -Integrin auf allen untersuchten Endothelzellen exprimiert werden, wobei die Expression des P-Antigens im Vergleich der Endothelzellen untereinander variabel ist. Das KU80-Autoantigen und der Heterodimerisierungspartner KU70 werden extrazellulär hingegen nur marginal exprimiert. Lediglich der N-Terminus des KU80 konnte auf einem geringen Teil der für B19V semi-permissiven UT7/Epo-S1-Zellen nachgewiesen werden.

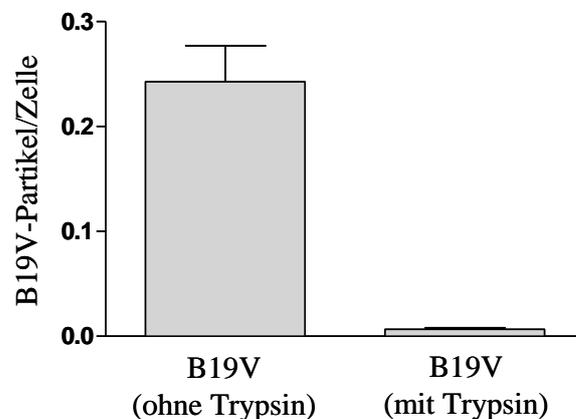


**Abbildung 4-3: Extra- und intrazellulärer Nachweis der B19V-Rezeptoren in EA.hy926-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz.** Für den Nachweis der extrazellulären Expression der B19V-Rezeptoren wurden für die Antikörpermarkierung unpermeabilisierte EA.hy926-Zellen verwendet. Der intrazelluläre Nachweis erfolgte an permeabilisierten Zellen. Die B19V-Rezeptoren wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.  $\beta_1$ -Integrin: monoklonaler mouse anti-Human Integrin  $\beta_1$  Antikörper (P4C10) (Verdünnung 1:400); KU80 N-Terminus: monoklonaler mouse Ku Ab-7 Antikörper (S10B1) (Verdünnung 1:200); KU70: monoklonaler mouse Ku Ab-4 Antikörper (N3H10) (Verdünnung 1:200). Als sekundärer Antikörper wurde der goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594 Antikörper (rot) in einer Verdünnung von 1:400 verwendet. Die Zellkerne sind mittels einer DAPI-Färbung blau dargestellt. Das overlay zeigt die Überlagerung der Aufnahmen eines Ansatzes. Die Vergrößerungen der Aufnahmen sind unten rechts in den Abbildungen vermerkt.

### 4.1.2 B19V-Bindung und -Internalisierung in Endothelzellen

Nachdem die B19V-Rezeptorexpression auf Endothelzellen unterschiedlicher Gewebe detailliert analysiert wurde, sollten die Zellen hinsichtlich ihrer Bindungs- und Internalisierungseigenschaften für B19V untersucht werden. Die Untersuchungen wurden an den endothelialen Primärzellen der Koronararterie (HCAEC), der Haut (HDMEC), der Aorta (HAoEC) und der Nabelschnur (HUVEC), sowie der endothelialen Zelllinie EA.hy926 durchgeführt. Als Referenz diente die semi-permissive Zelllinie UT7/Epo-S1.

Für die Analyse des B19V-Bindungs- und -Internalisierungsverhaltens von Endothelzellen und der Differenzierung von extrazellulär gebundenen und internalisierten Viruspartikeln musste zunächst untersucht werden, ob sich die extrazellulär, nicht-internalisierten B19V-Partikel mit Hilfe von Trypsin von der Zelloberfläche entfernen lassen. Hierzu wurden die Zellen für 1h mit  $1 \times 10^3$  B19V-Genomäquivalenten pro Zelle auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit auf Eis gekühltem PBS gewaschen, dann 5 min bei 37°C mit Trypsin behandelt und abschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nach der DNA-Aufreinigung wurde die Anzahl der internalisierten B19V-Partikel pro Zelle mittels quantitativer PCR ermittelt.



**Abbildung 4-4: Dissoziation extrazellulär-gebundener, nicht-internalisierter B19V-Partikel mittels Trypsinbehandlung.** EA.hy926-Zellen wurden mit  $1 \times 10^3$  B19V-Genomäquivalenten pro Zelle für 1 h auf Eis inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und dann 5 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals 3x mit PBS gewaschen, die DNA isoliert und mittels Real-Time-PCR die B19V-Partikel pro Zelle quantifiziert. Das Diagramm stellt die Zusammenfassung zweier unabhängig voneinander durchgeführter Versuche dar.

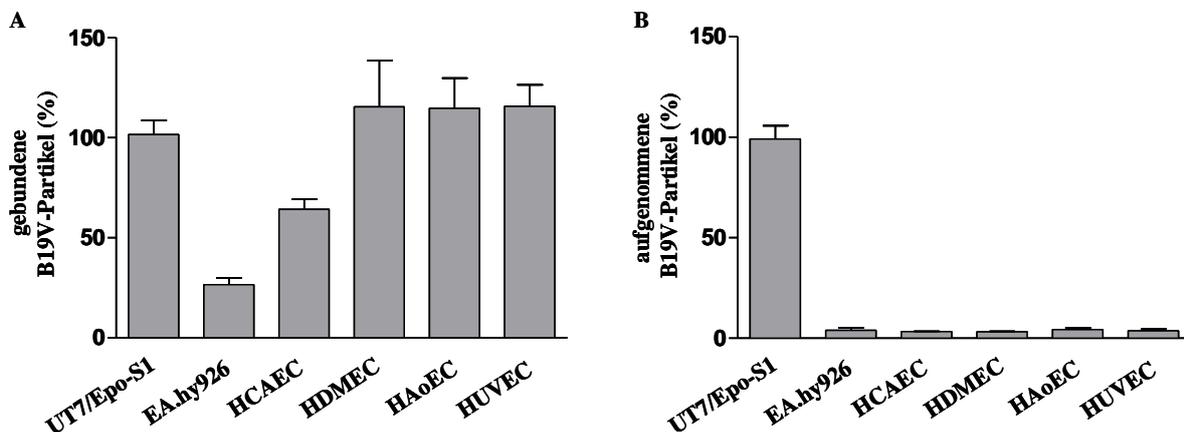
Abbildung 4-4 zeigt, dass mit einer 5-minütigen Trypsinbehandlung nahezu alle extrazellulär-gebundenen B19V-Partikel von der Zelloberfläche entfernt werden können.

Die Differenzierung der extrazellulär an der Zelloberfläche gebundenen, nicht-aufgenommenen B19V-Partikel von den internalisierten Viruspartikeln erfolgte nach

folgendem Versuchsablauf: Für die Quantifizierung der extrazellulär an die Zelloberfläche gebundenen B19V-Partikel wurden die Zellen für 1 h mit jeweils  $1 \times 10^4$  B19V-Genomäquivalenten pro Zelle auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3 x mit PBS gewaschen und die DNA aufgereinigt. Für die Bestimmung der internalisierten Viruspartikel folgte nach der einstündigen Inkubation auf Eis eine weitere Inkubation von 2 h bei  $37^\circ\text{C}$ . Um nicht-aufgenommene, extrazellulär gebundene B19V-Partikel zu entfernen, wurden die Zellen anschließend 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  trypsinisiert und 3 x mit PBS gewaschen.

Im Vergleich zu den UT7/Epo-S1-Zellen zeigten die Endothelzellen Schwankungen in der B19V-Bindung von etwa 30 % bei den EA.hy926-Zellen, über ca. 65 % bei den HCAEC bis hin zu etwa 115 % bei den HDMEC, HAoEC und HUVEC (Abb. 4-5). In der B19V-Aufnahme war jedoch unabhängig von der Anzahl der gebundenen B19V-Partikel in den Endothelzellen aller untersuchten Gewebe eine starke Inhibierung im Vergleich zu den UT7/Epo-S1-Zellen zu beobachten. So lag die B19V-Internalisierungsrate in allen Endothelzellen vergleichsweise unter 5 %.

Bei der Untersuchung von Endothelzellen hinsichtlich ihres B19V-Bindung und-Internalisierungsverhaltens konnte gezeigt werden, dass diese sich hinsichtlich der B19V-Bindung ähnlich wie die UT7/Epo-S1-Zellen verhalten, allerdings findet in Endothelzellen eine starke Inhibierung der B19V-Aufnahme statt.

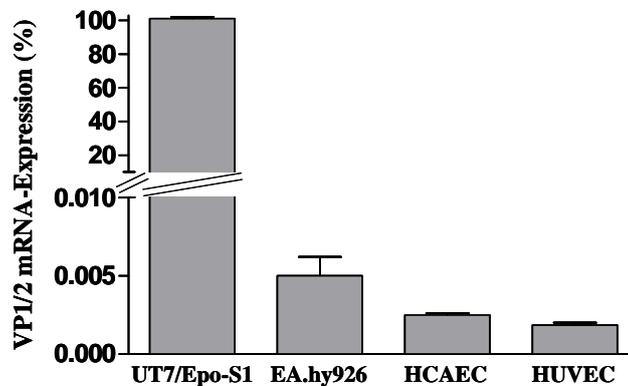


**Abbildung 4-5: Vergleich der B19V-Bindung und -Aufnahme verschiedener Endothelzellen.** Die Quantifizierung der (A) gebundenen bzw. (B) aufgenommenen Viruspartikel erfolgte mittels Real-Time-PCR. Die für B19V semi-permissiven UT7/Epo-S1-Zellen dienten als Referenz und wurden auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse der anderen Zellen wurden auf die UT7/Epo-S1-Zellen bezogen. Das Diagramm fasst die Daten von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zusammen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine starke, aber keine absolute Inhibierung der B19V-

Aufnahme in Endothelzellen erfolgt, sollte untersucht werden, ob die geringe Menge an aufgenommenen B19V-Partikeln für die Synthese B19V-spezifischer mRNAs der Kapsidproteine VP1/2 ausreichend ist. Hierzu wurde eine quantitative PCR durchgeführt, bei der die semi-permissive Zelllinie UT7/Epo-S1 wieder als Referenz diente.

Die Ergebnisse zeigten, dass Endothelzellen prinzipiell mit B19V infiziert werden können. Allerdings waren die VP1/2-mRNA-Expressionslevel in den Endothelzellen um etwa 10.000-fach niedriger als in den UT7/Epo-S1-Zellen. Die Endothelzellen zeigten im direkten Vergleich untereinander nur geringe Unterschiede in der VP1/2-Expressionsstärke.



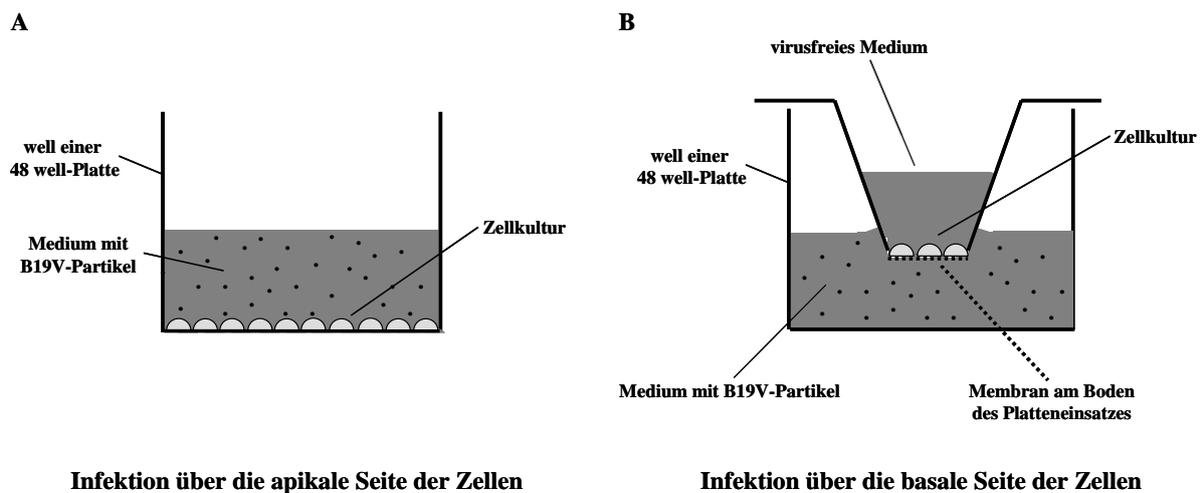
**Abbildung 4-6:** Nachweis der B19V Kapsidprotein-mRNA nach B19V-Infektion verschiedener Endothelzellen. Die Zellen wurden mit  $1 \times 10^4$  B19V-Genomäquivalenten pro Zelle infiziert. 72 h p.i. wurden die Zellen geerntet, die RNA der Zellen isoliert und mittels einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die VP1/2-mRNA-Expressionslevel wurden mittels Real-Time-PCR ermittelt. Die VP1/2-Expression in den UT7/Epo-S1-Zellen diente als Referenz und wurde auf einen Wert von 100 % gesetzt. Die gemessene Expressionstärke der Endothelzellen wurde auf diesen Richtwert bezogen. Das Diagramm stellt die Zusammenfassung dreier unabhängig voneinander durchgeführter Versuche dar.

### 4.1.3 Einfluss der Polarität von Endothelzellen auf die B19V-Infektion

Endothelzellen sind bipolare Zellen, die die Blutgefäße auskleiden. Sie besitzen jeweils eine zum Gefäßinnenraum (apikale) und eine zum Gewebe (basale) gerichtete Seite.

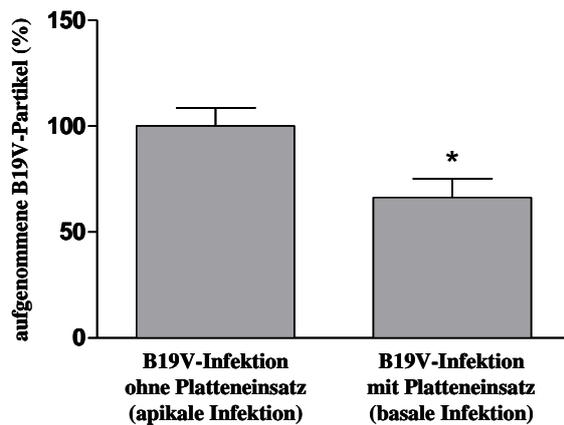
Im Verlauf dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass Endothelzellen zwar prinzipiell mit B19V infizierbar sind, allerdings eine starke Inhibierung in der Virusaufnahme besteht, welche durch die Aktivierung des Ko-Rezeptors  $\beta_1$ -Integrin nicht aufgehoben werden konnte. So stellte sich die Frage, ob die B19V-Aufnahme durch die bisher durchgeführte Applikation von B19V auf die apikale Seite der Endothelzellen limitiert wurde.

Um dieser Frage nachgehen zu können, wurden EA.hy926-Zellen zum einen in herkömmlicher Weise auf den Boden einer 48 well-Platte ausgesät. Zum anderen wurden einige wells mit einem Platteneinsatz versehen, dessen Boden aus einer Membran mit einer Porengröße von  $0,4\ \mu\text{m}$  bestand, auf die die EA.hy926-Zellen ausgesät wurden. Die Größe der Poren wurde so gewählt, dass einerseits eine Migration der Endothelzellen auf die gegenüberliegende Seite der Membran nicht möglich war, jedoch andererseits die B19V-Aufnahme ungehindert stattfinden konnte (Abb. 4-7).



**Abbildung 4-7: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur B19V-Infektion über die apikale bzw. basale Seite von Endothelzellen.** (A) Bei der apikalen Infektion werden die Zellen in einer 48 well-Platte ausgesät und mit dem virushaltigem Medium überschichtet. (B) Für die basale Infektion wird in das well ein Platteneinsatz eingehängt, welches am Boden mit einer Membran versehen ist. Die Membran besteht aus  $0,4\ \mu\text{m}$ -großen Poren, die groß genug für die Passierung der Viruspartikel sind und so eine Infektion der Zellen von der basalen Seite aus ermöglichen. Das well wird mit virushaltigem Medium befüllt, während der Platteneinsatz mit virusfreiem Zellmedium versehen wird, so dass eine Versorgung der Zellen mit ausreichend Nährstoffen gewährleistet ist.

Die B19V-Infektion der EA.hy926-Zellen über die apikale Seite zeigte eine signifikant höhere B19V-Aufnahme im Vergleich zur basalen Seite (Abb. 4-8). Dies deutet darauf hin, dass die im Vergleich zu den UT7/Epo-S1 inhibierte B19V-Aufnahme in den EA.hy926-Zellen nicht auf die Polarität der Endothelzellen und auf eine damit möglich einhergehende Rezeptorunzugänglichkeit zurückzuführen ist.



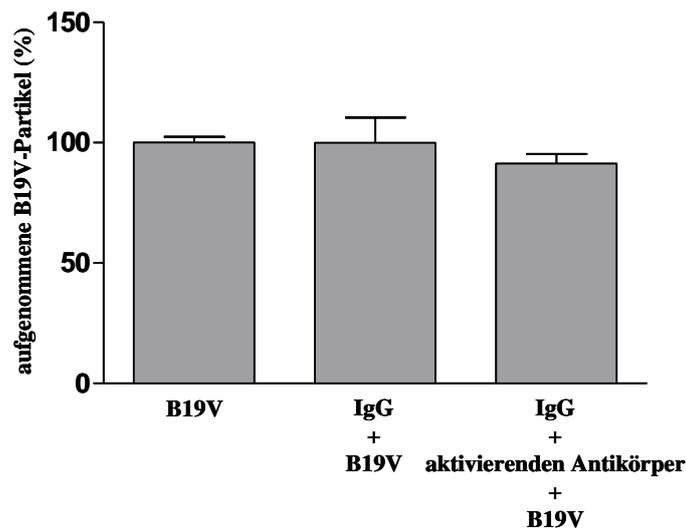
**Abbildung 4-8: Vergleich von apikaler und basaler B19V-Infektion in EA.hy926-Zellen.** Für die apikale Infektion wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 48 well-Platten ausgesät und für die basale Infektion  $2 \times 10^4$  Zellen in die Platteneinsätze. Die B19V-Infektion erfolgte für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $1 \times 10^4$  Genomäquivalente /Zelle unter mehrmaligem Schütteln der Platte um ein mögliches Absinken der Viruspartikel zu vermeiden. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt und die Anzahl der aufgenommenen B19V-Partikel mittels Real-Time-PCR ermittelt. Der apikale Infektionsansatz wurde auf 100 % gesetzt. \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Einfluss der $\beta_1$ -Integrin-Aktivierung auf die B19V-Internalisierung

In vorangegangenen Untersuchungen von K. Weigel-Van Aken et al. konnte gezeigt werden, dass das  $\beta_1$ -Integrin in einem aktivierten Zustand vorliegen muss, um als Ko-Rezeptor für die Internalisierung von B19V dienen zu können (42; 48; 58). Der Aktivitätszustand und somit die Stärke der Bindungsaffinität ist mit Hilfe von bivalenten Ionen regulierbar. So wird die Bindung von Fibrinogen an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin über die Kationen  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert. In Anwesenheit von  $\text{Mn}^{2+}$  wird die Bindung von Fibrinogen an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin induziert bzw. verstärkt, während sie in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  inhibiert ist (46; 47). Durch die zusätzliche Bindung von Antikörpern wird eine Stabilisierung des Aktivitätszustandes ermöglicht (47; 172).

Mit dem folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob eine Aktivierung des  $\beta_1$ -Integrins in Endothelzellen zu einer erhöhten B19V-Aufnahme führen kann. Hierzu wurden für die Aktivierung des  $\beta_1$ -Integrins EA.hy926-Zellen zunächst mit den divalenten Ionen  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  behandelt. Durch eine anschließende Vorinkubation der Zellen mit humanen IgGs wurden die Fc-Rezeptoren der Zelloberfläche blockiert und die Bindung der stabilisierenden  $\beta_1$ -Integrin-spezifischen Antikörper an das aktivierte  $\beta_1$ -Integrin gewährleistet. Zuletzt wurden die Zellen für 2 h mit B19V infiziert und die internalisierten B19V-Partikel mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Als Kontrollen dienten zum einen Zellen, die ausschließlich mit B19V inkubiert wurden, und zum anderen Zellen, die mit den divalenten Ionen und den Fc-blockierenden Antikörpern, jedoch nicht mit den stabilisierenden Antikörpern, vorinkubiert wurden.

Durch die Aktivierung und Stabilisierung des  $\beta_1$ -Integrins ließ sich im Vergleich zu den Kontrollen keine gesteigerte B19V-Aufnahme erzielen (Abb. 4-9). Die Untersuchungen lieferten somit keine Hinweise darauf, dass die in dieser Arbeit beobachtete inhibierte B19V-Internalisierung von Endothelzellen im Vergleich zu den UT7/Epo-S1-Zellen auf einen inaktiven Zustand des  $\beta_1$ -Integrins zurückzuführen ist.



**Abbildung 4-9: Auswirkungen der  $\beta_1$ -Integrin-Aktivierung auf die B19V-Internalisierung von EA.hy926-Zellen.**  $1 \times 10^5$  EA.hy926-Zellen wurden in 24 well-Platten ausgesät. Zur Aktivierung der Integrine wurden die Zellen 2x mit  $1 \text{ mM Mg}^{2+} / 1 \text{ mM Mn}^{2+}$ -DMEM gewaschen. Anschließend folgte die Blockierung der FC-Rezeptoren durch eine 10-minütige Inkubation bei RT mit  $200 \mu\text{l}$  humanem IgG ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). Die Zellen wurden 1x gewaschen und zur Stabilisierung des aktiven Konformationszustandes für 30 min bei RT mit  $200 \mu\text{l}$  des monoklonalen Antikörpers mouse anti-human  $\beta_1$ -Integrin (P4C10) ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 1x mit PBS gewaschen und für 2h bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $1 \times 10^4$  B19V-Genomäquivalenten pro Zelle infiziert. Um nicht-internalisierte, an der Zelloberfläche gebundene B19V-Partikel zu entfernen, wurden die Zellen vor der DNA-Isolierung 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  trypsinisiert. Die Quantifizierung der internalisierten B19V-Partikel erfolgte mittels Real-Time-PCR. Die Probe, bei der die Zellen ohne Vorbehandlung mit B19V infiziert wurden, wurde auf 100 % gesetzt.

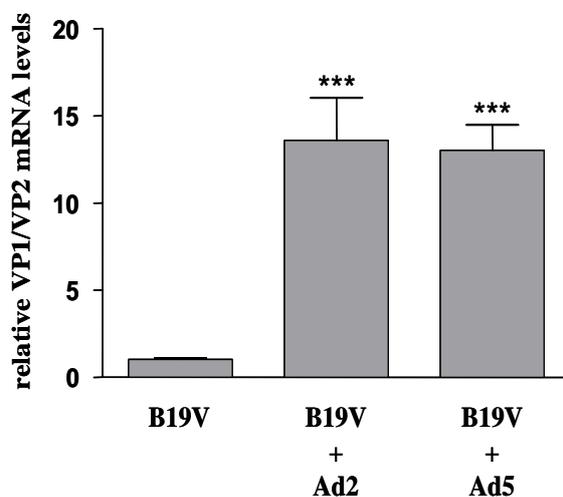
## 4.2 Adenovirus-induzierte B19V-Transaktivierung

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass B19V prinzipiell Endothelzellen infizieren kann, wobei jedoch die Expression der parvoviralen Proteine NS1, und insbesondere die der Kapsidproteine VP1 und VP2, im Vergleich zu humanen erythroiden Vorläuferzellen in Endothelzellen niedrig ist (173; 29). Des Weiteren konnte in Endothelzellen bisher für B19V weder eine DNA-Replikation noch die Synthese neuer Viruspartikel nachgewiesen werden. B19V liegt somit in Endothelzellen in einem latenten Zustand vor.

B19V gehört in die gleiche Virusfamilie wie das AAV, das für seine Replikation auf die Helferfunktionen von Adeno- bzw. Herpesviren angewiesen ist. Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Endothelzellen trotz einer starken Inhibierung in der Virusaufnahme prinzipiell mit B19V infizierbar sind und B19V-Kapsid-mRNA gebildet wird, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob Adenoviren für die Reaktivierung des in Endothelzellen latent vorliegenden B19V ähnlich wie beim AAV eine Helferfunktion übernehmen können.

#### 4.2.1 B19V Protein-Expression nach Ko-Infektion mit Adenovirus

In einem initialen Experiment sollte zunächst untersucht werden, ob durch eine Adenovirus Ko-Infektion eine gesteigerte B19V-Kapsidexpression erzielt werden kann. Hierzu wurde die endotheliale Zelllinie EA.hy926 für 24 h mit B19V und anschließend für weitere 72 h mit Adenovirus Serotyp 2 (Ad2) bzw. Serotyp 5 (Ad5) infiziert. Mittels Real-Time-PCR wurde die Gesamtexpression der mRNA der B19V-Kapsidproteine VP1 und VP2 gemessen. Als Kontrolle dienten ausschließlich mit B19V infizierte Zellen.

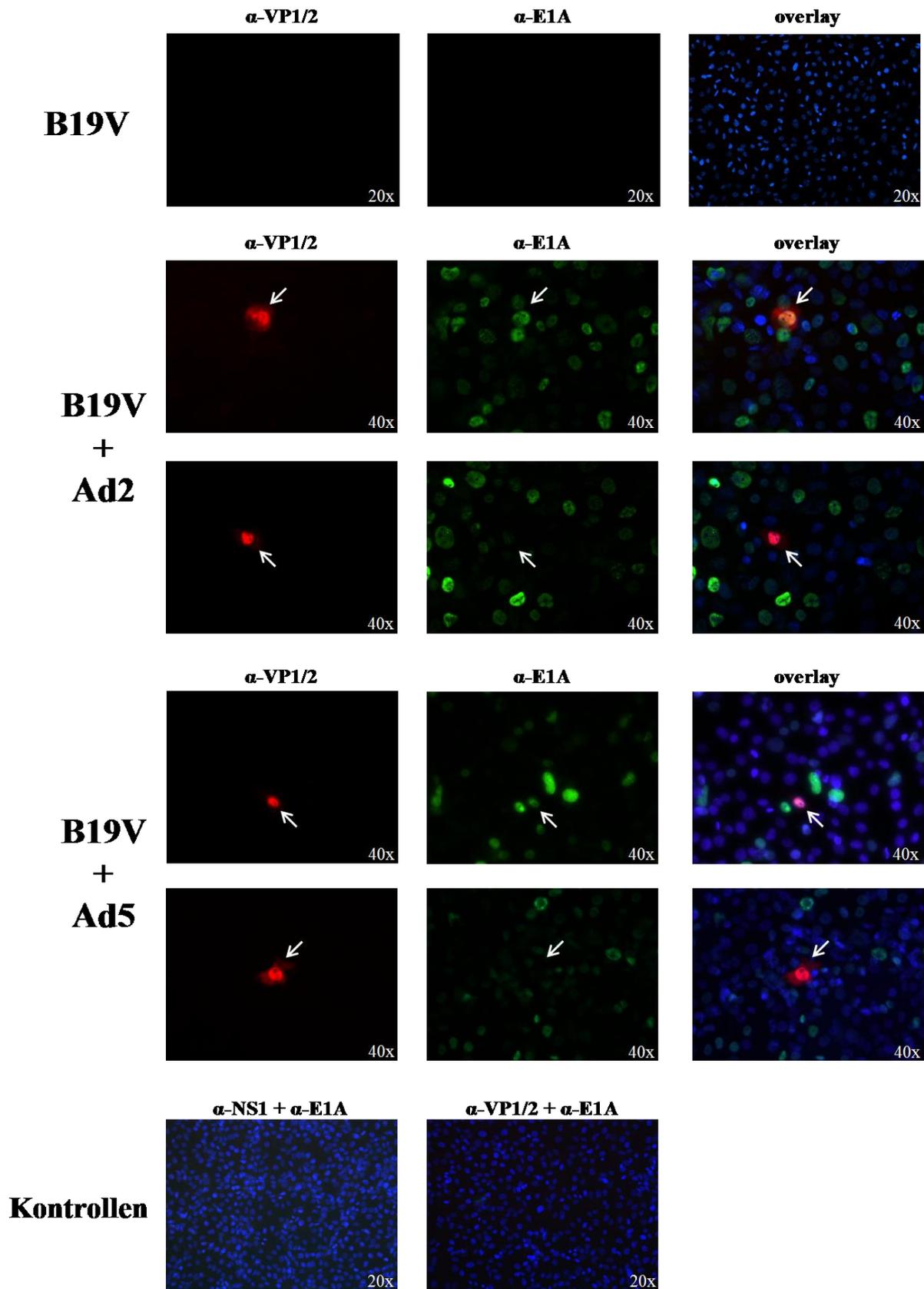


**Abbildung 4-10: VP1/2-mRNA-Expression von B19V nach Ko-Infektion mit Ad2 und Ad5 in EA.hy926-Zellen.** EA.hy926-Zellen wurden für 24 h mit  $1 \times 10^4$  Genomäquivalenten an B19V und im Anschluss für weitere 72 h mit 10 MOI Ad2 bzw. Ad5 infiziert. Die mRNA-Expressionsstärken wurden mit Hilfe einer Real-Time-PCR quantifiziert. Die relative mRNA-Expression bezieht sich auf den linken Balken, der die B19V infizierten Zellen ohne eine Adenovirus Ko-Infektion repräsentiert und als Referenz dienend auf einen Wert von 1 gesetzt wurde. Die Daten wurden aus 3 unabhängigen Versuchen generiert und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. \*\*\*,  $p < 0,001$

Die Ko-Infektion von B19V mit Adenovirus führte zu einer bis zu 14-fach stärkeren VP1/2 mRNA-Expression im Vergleich zu einer Infektion der Zellen ausschließlich mit B19V (Abb. 4-10). Die Adenovirus-Typen 2 und 5 zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Stimulierung der VP1/2-Expression.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine adenovirale Ko-Infektion zu einer gesteigerten VP1/2-Expression von B19V führt, wurde mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenz die VP1/2-Expression auf Einzelzellebene untersucht. Zusätzlich wurde aufgrund seiner Funktion als Transaktivator für die anderen frühen adenoviralen Proteine und diverser viraler und zellulärer Promotoren die Expression des adenoviralen E1A untersucht.

In den nur mit B19V infizierten EA.hy926-Zellen konnte die Expression der Kapsidproteine VP1 und VP2 in einer nur sehr geringen Anzahl von Zellen (ca.  $1/1 \times 10^5$  Zellen) nachgewiesen werden, welche zusätzlich eine sehr geringe Expression aufwiesen (Abb. 4-11, Zeile 1). In den mit Ad2 bzw. Ad5 ko-infizierten Ansätzen konnten die Kapsidproteine ebenfalls nur in einem kleinen Teil der Zellpopulation detektiert werden (ca.  $4/1 \times 10^5$  Zellen), allerdings zeigten diese einzelnen Zellen eine starke VP1/2-Expression. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass hinsichtlich des Expressionsmusters von E1A und VP1/2 zwei unterschiedliche Phänotypen auftraten. Zum Einen traten Zellen auf, die sowohl für VP 1/2 von B19V als auch für das adenovirale E1A positiv waren (Zeilen 2 und 4), zum Anderen waren Zellen zu beobachten, in denen nur die parvoviralen Kapsidproteine ohne Ko-Lokalisation des E1A detektiert werden konnten (Zeilen 3 und 5). Als Kontrollansatz für die Spezifität des E1A-Nachweises diente die Markierung der nur mit B19V-infizierten Zellen. Erwartungsgemäß konnte in der Kontrollfärbung das adenovirale E1A nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 4-11: B19V-Kapsidexpression nach Ko-Infektion mit Ad2 und Ad5 in EA.hy926-Zellen.** EA.hy926-Zellen wurden für 24 h mit  $1 \times 10^4$  Genomäquivalenten an B19V und anschließend für weitere 48 h mit 10 MOI Ad2 bzw. Ad5 infiziert. Nach Fixierung der Zellen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz die Expression der B19V Kapsidproteine VP1 und VP2 (monoklonaler mouse anti-

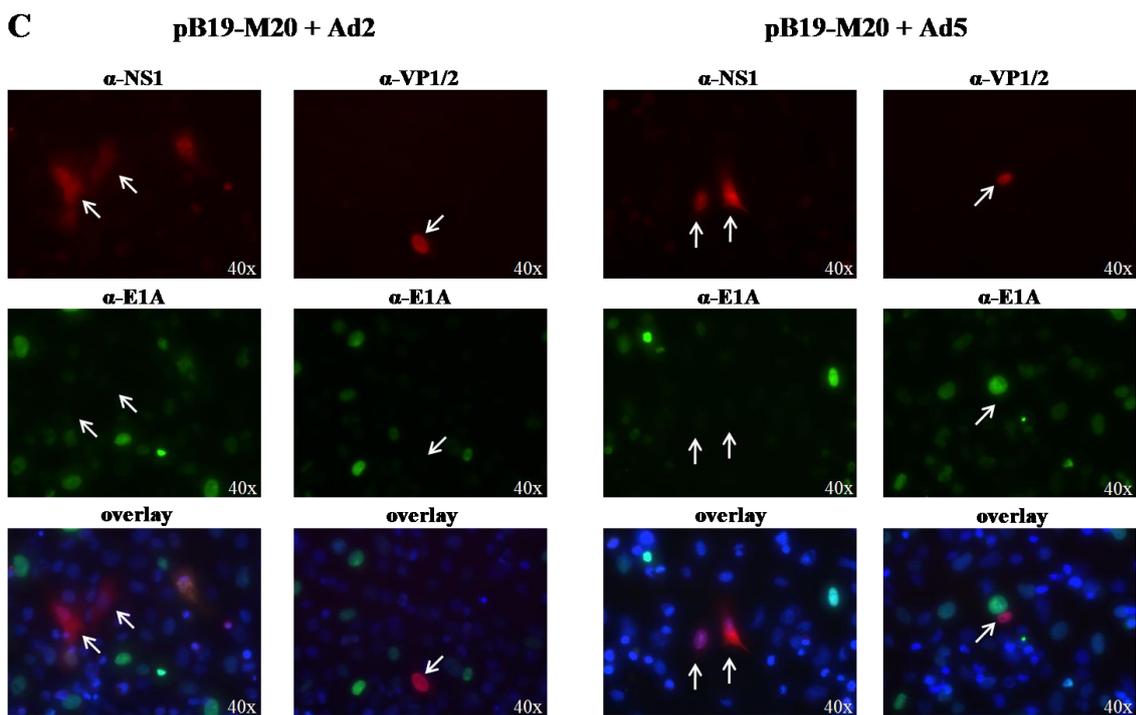
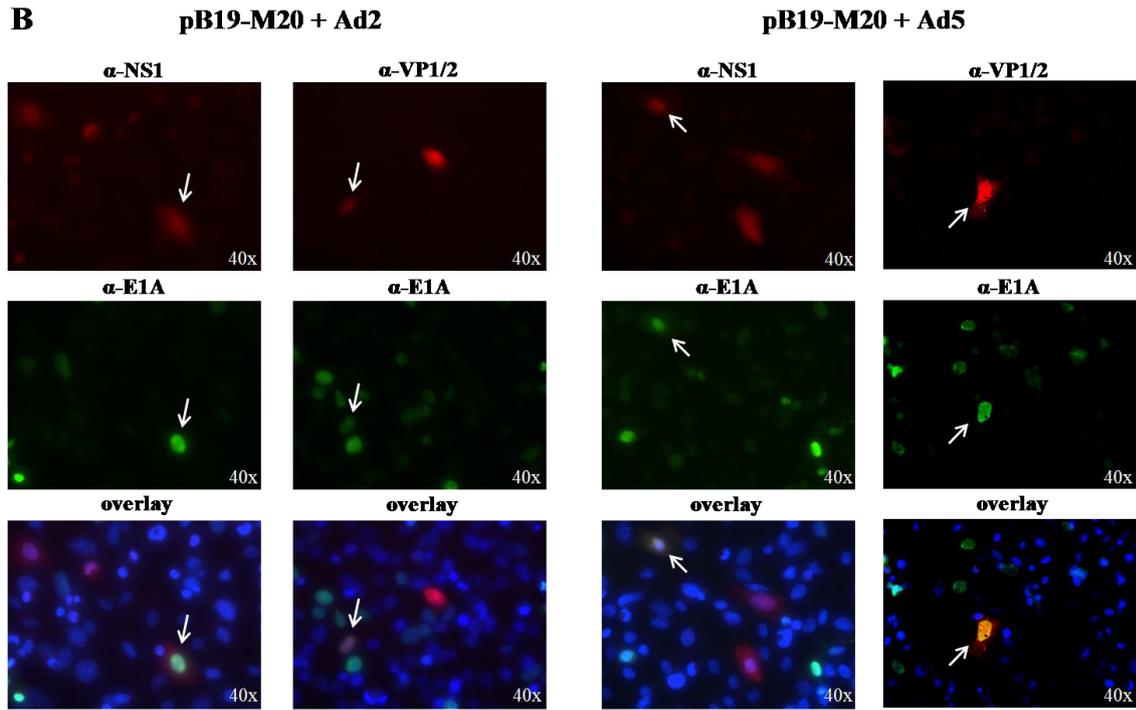
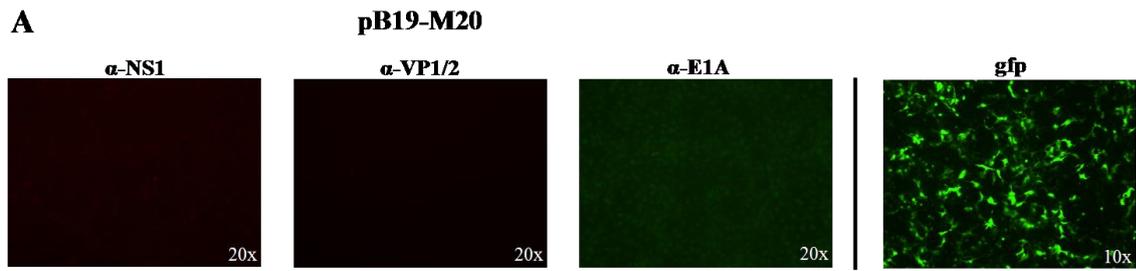
Parvovirus B19 Antikörper gegen VP1/2, Verdünnung 1:400; sekundärer Antikörper goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 594 (rot), Verdünnung 1:400) bzw. des adenoviralen E1A (polyklonaler rabbit anti-Ad2/5 E1A Antikörper 13s-5, Verdünnung 1:400; sekundärer Antikörper goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (grün), Verdünnung 1:400) nachgewiesen. Die Zellkerne sind mittels einer DAPI-Färbung blau dargestellt. Pfeile markieren die VP1/2-positiven Zellen, die entsprechenden Zellen nach E1A-Färbung und im overlay die Überlagerung der E1A- und VP1/2-markierten Zellen. Die Vergrößerungen der Aufnahmen sind unten rechts in den Abbildungen vermerkt.

#### **4.2.2 Einfluss der Adenovirus Ko-Infektion auf die B19V-Aufnahme und Freisetzung der B19V-DNA**

Wie zuvor in Abbildung 11 dargestellt wurde wies nur ein sehr kleiner Teil der mit B19V und Adenovirus ko-infizierten Zellen eine verstärkte VP1/2 Proteinexpression auf. Um ausschließen zu können, dass diese Beobachtung auf eine inhibierte B19V-Aufnahme bzw. eine Blockade in der Freisetzung der B19V-DNA zurückzuführen ist, wurde für das folgende Experiment das Plasmid pB19-M20 verwendet, welches ein infektiöses B19V-Genom enthält.

Nach Transfektion von pB19-M20 und Infektion mit Ad2 bzw. Ad5 zeigte sich ebenfalls, wie bereits mit B19V beobachtet, im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen eine verstärkte Expression der Kapsidproteine VP1 und VP2 (Abb. 4-12). Auch hier war wieder nur eine kleine Subpopulation der Zellen für VP1/2 positiv. Im Vergleich zu den Kapsidproteinen fiel die Expression des B19V-Nichtstrukturproteins NS1 wie erwartet stärker aus. Außerdem zeigten sich auch hier wieder wie bereits in Abbildung 4-11 beobachtet grundsätzlich zwei unterschiedliche Phänotypen: Zum einen Zellen, in denen die parvoviralen Proteine VP1/2 bzw. NS1 mit dem E1A ko-lokalisiert auftraten, und zum anderen Zellen, in denen das E1A neben den Parvovirus-Proteinen nicht detektiert werden konnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proteinexpression von B19V durch eine adenovirale Ko-Infektion aktiviert wird. Die verstärkte B19V-Proteinexpression lässt sich allerdings nur in einem geringen Teil der Zellpopulation nachweisen und ist unabhängig von der zeitgleichen Expression des adenoviralen E1A. Da hinsichtlich der VP1/2-Expression nach Transfektion des pB19-M20-Plasmids die gleichen Ergebnisse wie nach einer B19V-Infektion erhalten wurden, kann ausgeschlossen werden, dass das beobachtete VP1/2-Expressionsmuster auf eine gehemmte B19V-Aufnahme bzw. Inhibierung der Freisetzung der B19V-DNA zurückzuführen ist.

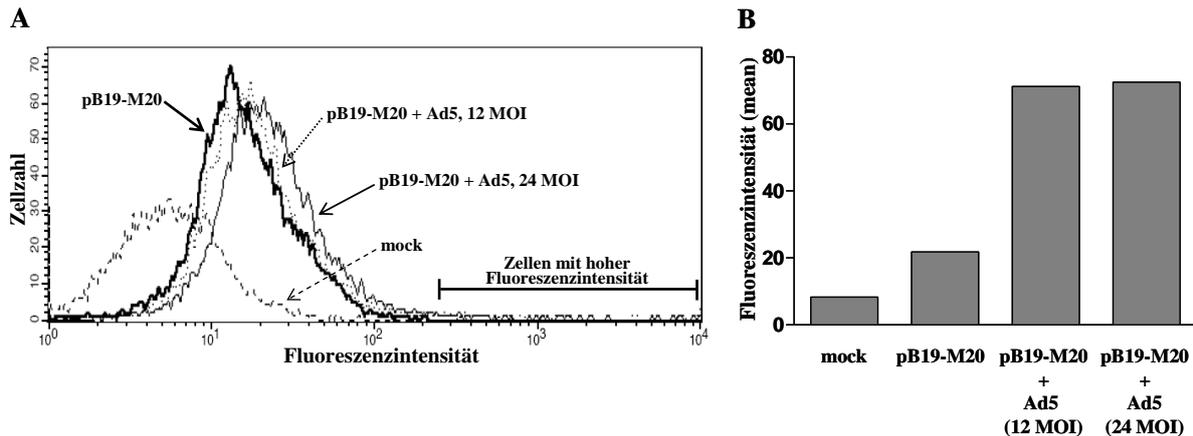


**Abbildung 4-12: Einfluss der Ad2 und Ad5 Ko-Infektion auf die NS1- und VP1/2-Expression nach Transfektion des Plasmids pB19-M20 in EA.hy926-Zellen.** EA.hy926-Zellen wurden für 1 h mit 10 MOI Ad2 bzw. Ad5 infiziert und anschließend mit dem *Sall*-linearisierten Plasmid pB19-M20 transfiziert. Nach 48 h erfolgte der Proteinnachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz. NS1-Nachweis: monoklonaler human anti-B19-NS1 Antikörper MAB1424, Verdünnung: 1:400, sekundärer Antikörper goat anti-human IgG (H+L), Alexa Fluor 594 (rot), Verdünnung 1:400. VP1/2-Nachweis: monoklonaler mouse anti-Parvovirus B19 Antikörper gegen VP1/2, Verdünnung 1:400; sekundärer Antikörper goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 594 (rot), Verdünnung 1:400. E1A-Nachweis: polyklonaler rabbit anti-Ad2/5 E1A Antikörper 13s-5, Verdünnung 1:400; sekundärer Antikörper goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (grün), Verdünnung 1:400. Die Zellkerne sind mittels einer DAPI-Färbung blau dargestellt. Pfeile markieren die B19V-positiven Zellen und die entsprechenden Zellen in der E1A-Färbung und im overlay die Überlagerung der NS1- und E1A- bzw. der VP1/2- und E1A-markierten Zellen. Die Vergrößerungen der Aufnahmen sind unten rechts in den Abbildungen vermerkt. (A) links: Nachweis von B19V-VP1/2 und adenoviralem E1A ohne Ad2/Ad5-Infektion. rechts: Transfektionskontrolle mit pGFP. (B) Ko-Lokalisation von B19V NS1 bzw. VP1/2 mit adenoviralem E1A. (C) Nachweis von NS1 bzw. VP1/2 ohne adenovirale E1A Ko-Expression.

Nach Untersuchung der B19V-Proteinexpression auf Einzelzellebene mittels indirekter Immunfluoreszenz, sollte die VP1/2-Expression der gesamten Zellpopulation näher analysiert werden. Hierzu wurde eine FACS-Messung durchgeführt.

EA.hy926-Zellen wurden mit dem *Sall*-linearisierten pB19-M20-Plasmid transfiziert und anschließend für weitere 3 h mit Ad5 mit einer MOI von 12 bzw. 24 infiziert. 48 h p. i. erfolgte der Nachweis von VP1/2.

Durch eine Ad5-Infektion ließ sich das B19V-Genom des pB19-M20-Plasmids transaktivieren. Dies zeigte sich durch eine geringfügig höhere Fluoreszenzintensität der mit pB19M20-transfizierten und mit Ad5 infizierten Zellen im Vergleich zu den ausschließlich mit pB19-M20 transfizierten Zellen (Verschiebung nach rechts; Teil (A) der Abbildung 4-13). Zudem konnte eine im Vergleich von 12 und 24 MOI an Adenovirus eine Dosisabhängigkeit dieses Effektes nachgewiesen werden. Zusätzlich gab es auch hier wieder eine kleine Subpopulation an Zellen, die eine sehr hohe Fluoreszenzintensität aufwies und auch nur bei den Ko-Infektionsansätzen zu beobachten war. Der Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensitäten zeigt eine etwa 3,5-fache Steigerung der B19V-Kapsidexpression der mit pB19-M20-transfizierten und mit Ad5-infizierten Zellen im Vergleich zu den ausschließlich mit pB19-M20-transfizierten Zellen (Teil (B) der Abb. 4-13). Die Dosisabhängigkeit von Ad5 läßt sich hieraus jedoch nicht entnehmen.

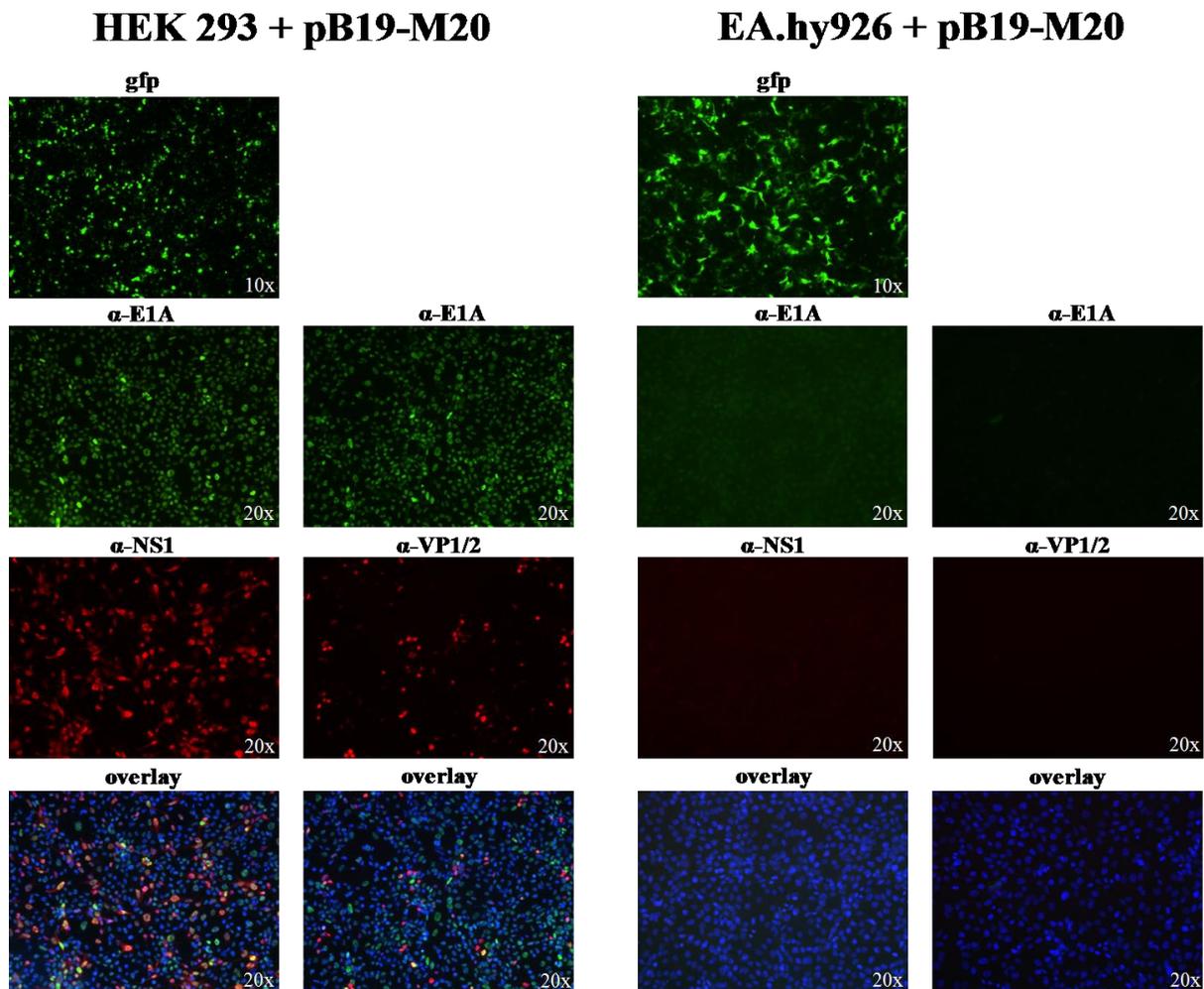


**Abbildung 4-13: FACS-Messung zur Transaktivierung von pB19-M20 durch Ad5 in EA.hy926-Zellen.** EA.hy926-Zellen wurden mit dem *Sall*-linearisierten Plasmid pB19-M20 transfiziert und mit einer MOI von 12 bzw. 24 mit Ad5 infiziert. 48 h p.i. erfolgte die Analyse der VP1/2-Expression mittels FACS-Messung (monoklonaler mouse anti-Parvovirus B19 Antikörper gegen VP1/2, Verdünnung 1:400; sekundärer Antikörper goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 594 (rot), Verdünnung 1:400). (A) repräsentiert die gemessene VP1/2-Expression als Histogramm. In (B) sind die quantitativen Fluoreszenzintensitäten (Mean) der verschiedenen Ansätze aus (A) dargestellt.

### 4.2.3 Einfluss der adenoviralen E1A-Proteine auf die B19V-Proteinexpression

Untersuchungen vorangegangener Arbeiten haben gezeigt, dass das adenovirale E1A ein Transaktivator für Promotoren ist und bei der Helferfunktion des Adenovirus für die AAV-Replikation eine zentrale Rolle einnimmt (157; 158). Das adenovirale E1B fördert mitunter mit E1A die Transformation der Zelle und wird im Zusammenspiel mit E4orf6 für den Transport der viralen mRNA aus dem Nukleus ins Zytoplasma benötigt (161; 174).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die in den vorangegangenen Experimenten beobachtete verstärkte parvovirale Protein-Expression bei einer Ad2 bzw. Ad5 Ko-Infektion auf die transaktivierende Wirkung des adenoviralen E1A-Proteins zurückzuführen ist. Hierzu wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293 verwendet, die die adenoviralen Proteine E1A und E1B exprimiert. Für das folgende Experiment wurde das pB19-M20-Plasmid zunächst mit Hilfe eines *Sall*-Verdau linearisiert, so dass das infektiöse B19V-Genom von dem Basisplasmid isoliert werden konnte. Dieses doppelsträngige, lineare B19V-Genom wurde anschließend in HEK 293-Zellen und in EA.hy926-Zellen transfiziert. Mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenz wurden 48 h nach Transfektion die B19V-Proteine NS1 und VP1/2 und das adenovirale E1A nachgewiesen.



**Abbildung 4-14: Vergleich der B19V-Kapsidexpression nach Transfektion mit dem infektiösen pB19-M20-Plasmid in HEK 293- und EA.hy926-Zellen.** Humane Nierenzellen (HEK 293) und Endothelzellen (EA.hy926) wurden mit dem *Sall*-linearisiertem infektiösen Plasmid pB19-M20 transfiziert und nach 48 h fixiert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz erfolgte der Nachweis von B19V-VP1/2 (monoklonaler mouse anti-Parvovirus B19 Antikörper gegen VP1/2, Verdünnung 1:400; sekundärer Antikörper goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 594 (rot), Verdünnung 1:400), B19-NS1 (monoklonaler human anti-B19-NS1 Antikörper MAB1424, Verdünnung: 1:400, sekundärer Antikörper goat anti-human IgG (H+L), Alexa Fluor 594 (rot), Verdünnung 1:400) und des adenoviralen E1A (polyklonaler rabbit anti-Ad2/5 E1A Antikörper 13s-5, Verdünnung 1:400; sekundärer Antikörper goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (grün), Verdünnung 1:400). Die Zellkerne sind durch eine DAPI-Färbung blau markiert. Das overlay zeigt die Überlagerung der E1A- und NS1- bzw. E1A- und VP1/2-markierten Zellen. In der ersten Reihe der Abbildung ist durch die Transfektion mit dem Plasmid pGFP die Transfektionsrate der HEK 293- und EA.hy926-Zellen dargestellt. Die Vergrößerungen der Aufnahmen sind unten rechts in den Abbildungen vermerkt.

In den HEK 293-Zellen konnte eine starke Expression von E1A nachgewiesen werden, während die E1A-Färbung in den EA.hy926-Zellen erwartungsgemäß negativ ausfiel. Sie diente als Kontrolle für die Spezifität des E1A-Antikörpers. Während in den EA.hy926-Zellen weder das B19V-NS1 noch das -VP1/2 detektiert werden konnten, zeigten etwa 50 % der HEK 293-Zellen ein positives Signal für NS1 und etwa 10-20 % der Zellen für die B19V-

Kapsidproteine VP1/2. Aufgrund der vergleichbaren gfp-Expression beider Zelllinien (siehe Zeile 1 der Abbildung 4-14) konnte ausgeschlossen werden, dass die starken Unterschiede der parvoviralen Protein-Expression in den HEK 293- und den EA.hy926-Zellen auf unterschiedliche Transfektionsraten zurückzuführen waren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die B19V-Proteinexpression durch die in den HEK 293-Zellen exprimierten E1-Proteine aktiviert wird. Dies ist vermutlich auf die transaktivierende Wirkung des adenoviralen E1A zurückzuführen ist.

#### **4.2.4 Adenovirus-vermittelte Transaktivierung des isolierten B19V p6-Promotors im Kontext eines einzelsträngigen Genoms**

Die Synthese aller B19V exprimierten Proteine steht unter Kontrolle eines einzigen funktionell aktiven Promotors, dem p6-Promotor.

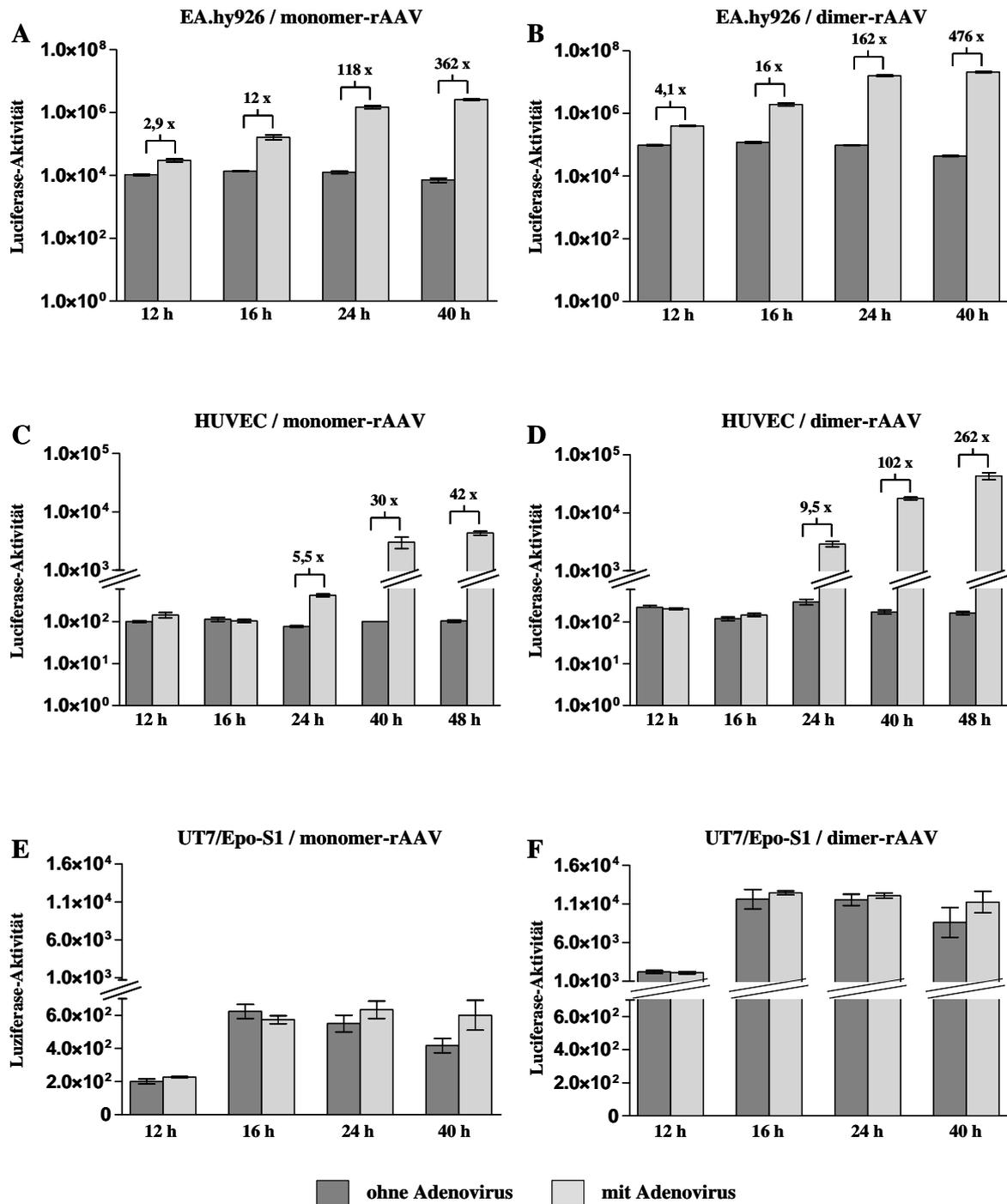
Zur Analyse des Mechanismus der Adenovirus-vermittelten Induktion der B19V-Proteinexpression wurde untersucht, ob die adenovirale Helferfunktion in der Überführung des einzelsträngigen B19V-Genoms in die doppelsträngige, transkriptionskompetente Form besteht. Hierzu wurde der p6-Promotor anlehnend an das B19V-Isolat J35 (GenBank Accession Number: AY386330) von Nukleotidposition 381 bis 615 isoliert, vor ein Luciferase-Reportergen geschaltet und in rekombinante AAV-Vektoren (rAAV) kloniert. Um die natürlichen, physiologischen Umstände einer B19V-Infektion simulieren und die Rolle der Zweitstrangsynthese untersuchen zu können, wurden zum einen einzelsträngige (monomerische) rAAVs generiert, welche transkriptionsinaktiv sind und für die Transkription zunächst in einen Doppelstrang überführt werden müssen. Zum anderen wurden selbstkomplementäre (sc) AAV-Vektoren generiert, bei denen aufgrund ihres doppelsträngigen (dimerischen) Genoms die Genexpression direkt nach der Transduktion erfolgen kann, so dass sie im Vergleich zu monomerischen rAAVs eine schnellere und stärkere Genexpression aufweisen (175).

Durch die Messung der Luciferaseaktivität konnte die Adenovirus-vermittelte Stimulierung der p6-Promotoraktivität ermittelt werden. Die Untersuchungen wurden in der endothelialen Zelllinie EA.hy926, in humanen endothelialen Primärzellen der Nabelschnur (HUVEC) und in die für B19V semi-permissiven UT7/Epo-S1-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit den monomerischen bzw. dimerischen rAAVs transduziert und mit Ad2 ko-infiziert. Nach 12, 16, 24 und 40 bzw. 48 h erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität.

Die Ergebnisse zeigen, dass der p6-Promotor im Kontext eines AAV-Genoms durch Ad2 in Endothelzellen transaktiviert wird. So konnte in den EA.hy926-Zellen bereits nach 12 h bei einer Ko-Infektion mit Ad2 sowohl mit den monomerischen als auch mit den dimerischen rAAVs eine 3- bzw. 4-fache Steigerung der Luciferaseaktivität beobachtet werden (Abb. 4-15, Teil A und B). Nach 40 h Inkubationszeit war bei den monomerischen mit einer Steigerung um das 362-fache und bei den dimerischen mit einer Steigerung um das 476-fache im Vergleich zu den nicht mit Ad2 ko-infizierten Ansätzen die jeweils höchste Reporterogen-Aktivität zu messen. Die Basalaktivität des monomerischen rAAVs ohne Ad2 Ko-Infektion war zwar um etwa den Faktor 10 niedriger als die des dimerischen rAAVs, allerdings zeigten beide Vektoren eine vergleichbare Transaktivierungsrate von etwa 25-fach. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erhöhte Luciferaseaktivität auf eine erhöhte p6-Promotoraktivität zurückzuführen ist, und dass eine mögliche durch Ad2 induzierte Zweitstrangsynthese des monomerischen rAAVs eine untergeordnete Rolle spielt.

In den endothelialen Primärzellen HUVEC fiel die Basalaktivität des p6-Promotors beider rAAV-Konstrukte um etwa das 100-fache geringer aus als in den EA.hy926-Zellen. Trotzdem ließ sich mit einer 262-fachen Steigerung der Luciferasereporterogen-Aktivität des dimerischen rAAVs bei einer Adenovirus Ko-Infektion ebenfalls eine hohe Transaktivierungsrate beobachten (siehe Abbildung 4-C und D). Allerdings setzte bei einer Ad2 Ko-Infektion die gesteigerte Promotoraktivität in den HUVECS im Vergleich zu den EA.hy926-Zellen insgesamt später ein. Statt nach 12 h war erst nach 24 h p.i. eine mit 5,5-fach bei dem monomerischen und mit 9,5-fach bei dem dimerischen rAAV gesteigerte Luciferase-Aktivität zu messen. Des Weiteren lag die Luciferase-Aktivitätssteigerung bei einer Ad2 Ko-Infektion nach 48 h mit einem Faktor von 42-fach deutlich unter der Transaktivierungsrate des dimerischen rAAVs.

Im Vergleich zu den untersuchten Endothelzellen konnte in den für B19V semi-permissiven UT7/Epo-S1-Zellen keine Aktivitätssteigerung des p6-Promotors bei einer adenoviralen Ko-Infektion beobachtet werden (siehe Abbildung 4-15, E und F). Aufgrund der hohen Luciferase-Aktivität der dimerischen rAAVs konnte ausgeschlossen werden, dass die fehlende Reporterogen-Aktivitätssteigerung bei einer Ad2 Ko-Infektion auf eine nicht Transduzierbarkeit der UT7/Epo-S1-Zellen mit den rAAV-Vektoren zurückzuführen ist. Zudem konnte in Kontrollexperimenten mit einem gfp-exprimierenden Adenovektor Typ 5 gezeigt werden, dass UT7/Epo-S1-Zellen ebenfalls mit Adenoviren transduziert bzw. infiziert werden können.

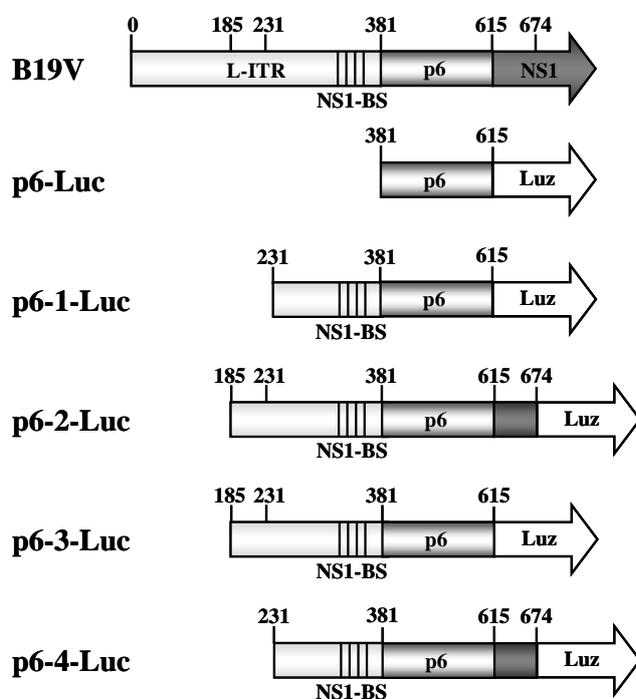


**Abbildung 4-15: Kinetik zur Ad2-vermittelten Stimulierung der p6-Promotoraktivität im Kontext rekombinanter AAV-Vektoren in Endothelzellen.** EA.hy926- (A+B), HUVEC- (C+D) und UT7/Epo-S1-Zellen (E+F) wurden mit  $1 \times 10^3$  Genomäquivalenten pro Zelle an rekombinanten AAV-p6-Luciferase-Reporter-gen-Vektoren und mit Ad2 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität. Das Verhältnis der Luciferaseaktivität ist, sofern signifikant, über den entsprechenden Balken vermerkt. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen gewonnen und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

## 4.2.5 Transaktivierende Wirkung von Adenovirus auf den isolierten p6-Promotor

Für eine detaillierte Analyse der Transaktivierung des p6-Promotors durch Adenovirus und der Identifizierung möglicher cis-regulatorischer Elemente des B19V-Genoms außerhalb der Kernsequenz des Promotors wurden diverse p6-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte generiert. Neben der Sequenz des Kernpromotors, die anlehnt an das B19V-Isolat J35 (GenBank Accession Number: AY386330) von Nukleotidposition 381 bis 615 reicht, wurden vier weitere Sequenzabschnitte mit unterschiedlich langen Promotor-flankierenden Bereichen kloniert (Abb. 4-16).

Das Konstrukt p6-Luc enthält ausschließlich den Sequenzbereich des p6-Promotors. An das 5'-Ende des p6-Promotors der Konstrukte p6-Luc-1 und p6-Luc-4 sind 150 Nukleotide der B19V 5'-ITR vorgeschaltet. Die Konstrukte p6-2-Luc und p6-3-Luc weisen hingegen einen 196-Nukleotid-langen Bereich der B19V 5'-ITR auf. Die Promotorkonstrukte p6-Luc-2 und p6-Luc-4 enthalten zusätzlich am 3'-Ende die ersten 59 Nukleotide des ORF des NS1-Proteins. Bis auf das p6-Luc-Konstrukt enthalten alle Promotorkonstrukte die in der Literatur beschriebenen NS1-Bindungsstellen (103).



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der p6-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte.** Die 5'-ITR des B19V, der p6-Promotor und der offene Leserahmen des NS1 sind in verschiedenen Graustufen und der ORF des Luciferasegens ist in weiß dargestellt. Die B19V-Nukleotidpositionen sind über den Balken angegeben. Als Referenz diente das B19V-Isolat J35 (GenBank Accession Number: AY386330). Die postulierten NS1-Bindungsstellen (NS1-BS) sind durch schwarze Striche gekennzeichnet.

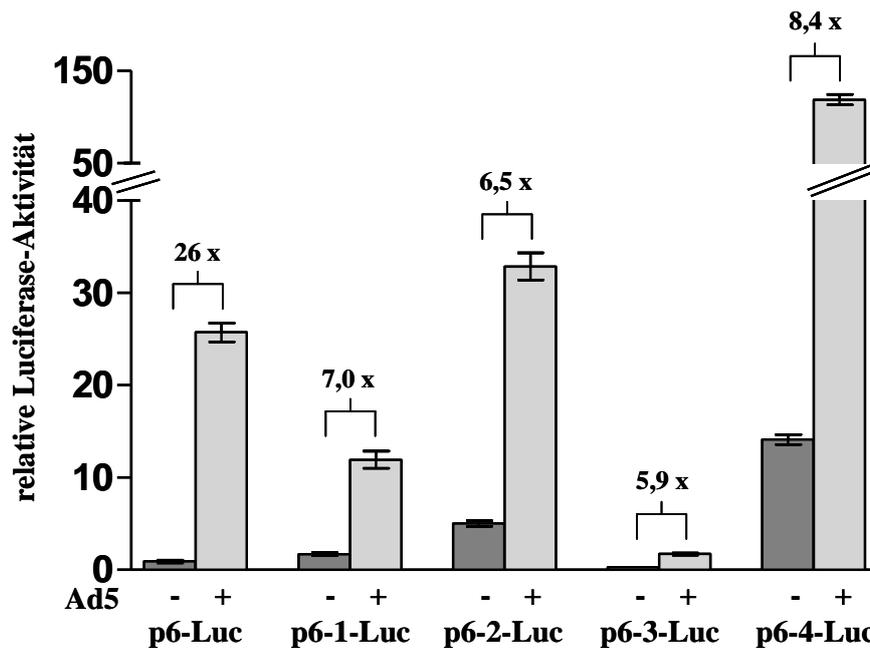
In einem initialen Experiment wurden zunächst die einzelnen p6-Promotor-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte auf eine Transaktivierung durch Ad5 hin getestet.

Die verschiedenen p6-Promotorkonstrukte ließen bereits in ihrer Basalaktivität Unterschiede beobachten (Abb. 4-17). So zeigte das p6-Luc-3-Konstrukt, das einen 196-Nukleotid-langen Bereich der B19V 5'-ITR aufweist, die geringste Basalaktivität, und das p6-Luc-4-Konstrukt, welches im Vergleich zusätzlich zu den 150 Nukleotiden der B19V 5'-ITR weitere 59 Nukleotide des NS1 enthält, mit einer Steigerung um den Faktor 13 die höchste Basalaktivität. Auch das p6-2-Luc-Konstrukt zeigte eine verhältnismäßig hohe Basalaktivität. Die Konstrukte p6-Luc-1 und p6-Luc, welche sich in den 150 Nukleotiden der 5'-ITR unterscheiden, wiesen hingegen eine vergleichsweise geringe Aktivität auf.

Durch den Vergleich der Basalaktivitäten der Konstrukte p6-2-Luc mit p6-4-Luc und p6-1-Luc mit p6-3-Luc ließ sich schlussfolgern, dass im 5'-flankierenden Bereich des p6-Promotors zwischen Nukleotidposition 185 nt und 231 nt eine potentielle Repressor-Domäne vorhanden ist. Der Vergleich der Konstrukte p6-2-Luc mit p6-3-Luc bzw. p6-1-Luc mit p6-4-Luc zeigte, dass sich im 3'-flankierenden Bereich zwischen Nukleotidposition 615 nt und 674 nt potentielle Enhancer-Domäne befindet.

Eine Adenovirus Ko-Infektion führte bei allen generierten p6-Promotorkonstrukten grundsätzlich zu einer gesteigerten Promotoraktivität, allerdings zeigten sich auch hier in Abhängigkeit der flankierenden Regionen unterschiedliche Transaktivierungsraten des p6-Promotors. Das p6-Luc-Konstrukt, welches nur den p6-Promotor ohne flankierende 5'- und 3'-Sequenzen enthält, wies mit einem Faktor von 26 die höchste Transaktivierungsrate auf. Eine deutlich geringere Transaktivierungsrate mit einem Faktor von 8,4 zeigte das Konstrukt p6-4-Luc, welches jedoch die höchste Basalaktivität aufwies. Die restlichen Promotorkonstrukte p6-Luc-1, p6-Luc-2 und p6-Luc-3 zeigten nur geringfügige Unterschiede in ihrer Transaktivierungsrate. Allerdings ließen die Transaktivierungsraten keine Korrelation zu den Basalaktivitäten beobachten.

Die Untersuchung der p6-Promotorkonstrukte zeigt, dass sich der isolierte p6-Promotor grundsätzlich durch Ad5 transaktivieren lässt. Außerdem zeigen die Ergebnisse deutlich, dass die den p6-Promotor umgebenden cis-aktiven Elemente die Adenovirus-vermittelte Transaktivierung des p6-Promotors beeinflussen.



**Abbildung17: Transaktivierung der verschiedenen p6-Promotor-Luciferase-Reporter-Konstrukte durch Ad5.** EA.hy926-Zellen wurden mit den verschiedenen p6-Promotor-Luciferase-Reporter-Konstrukten transfiziert und anschließend mit Ad5 mit einer MOI von 10 infiziert. Nach 48 h erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität. Der Luciferaseaktivitätswert des p6-Luc-Konstruktes ohne Adenovirus-Infektion wurde auf den Wert 1 gesetzt und diente als Referenz für die restlichen Ansätze. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

#### 4.2.5.1 Transaktivierende Wirkung adenoviraler Funktionen und B19V-NS1 auf den isolierten p6-Promotor

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der isolierte p6-Promotor durch Adenovirus in Endothelzellen transaktiviert werden kann, sollte mit den folgenden Experimenten analysiert werden, welche adenoviralen Funktionen für die Transaktivierung des B19V-Promotors essentiell sind. Zusätzlich sollte aufgrund der beschriebenen transaktivierenden Wirkung des B19V-NS1 mit den zellulären Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 auf den p6-Promotor (23) die Rolle des NS1 bei der Adenovirus-vermittelten Transaktivierung des p6-Promotors untersucht werden. Hierzu wurden die verschiedenen p6-Promotor-Luciferase-Reporter-Konstrukten aus Abbildung 4-16 mit den Expressionsplasmiden für E1A, E1B und NS1 und mit dem kommerziell erhältlichen pHelper-Plasmid (Stratagene), welches die adenoviralen Funktionen E2A, E4 und VA RNA unter Kontrolle ihrer natürlichen Promotoren enthält, in EA.hy926-Zellen ko-transfiziert.

Die Ko-Transfektionsexperimente zeigen, dass das adenovirale E1A und die Funktionen des pHelper-Plasmids bei allen p6-Promotorkonstrukten, mit Ausnahme von Konstrukt p6-3-Luc,

eine Stimulierung der p6-Promotoraktivität induzieren konnten (Abb. 4-18). Zudem war bei der Ko-Transfektion von E1A und pHelper bei allen p6-Konstrukten ein synergistischer Effekt auf die Promotoraktivität zu beobachten. Das adenovirale E1B und das B19V-NS1 führten bei keinem der p6-Promotorkonstrukte zu einer nennenswerten Steigerung der Luciferaseaktivität.

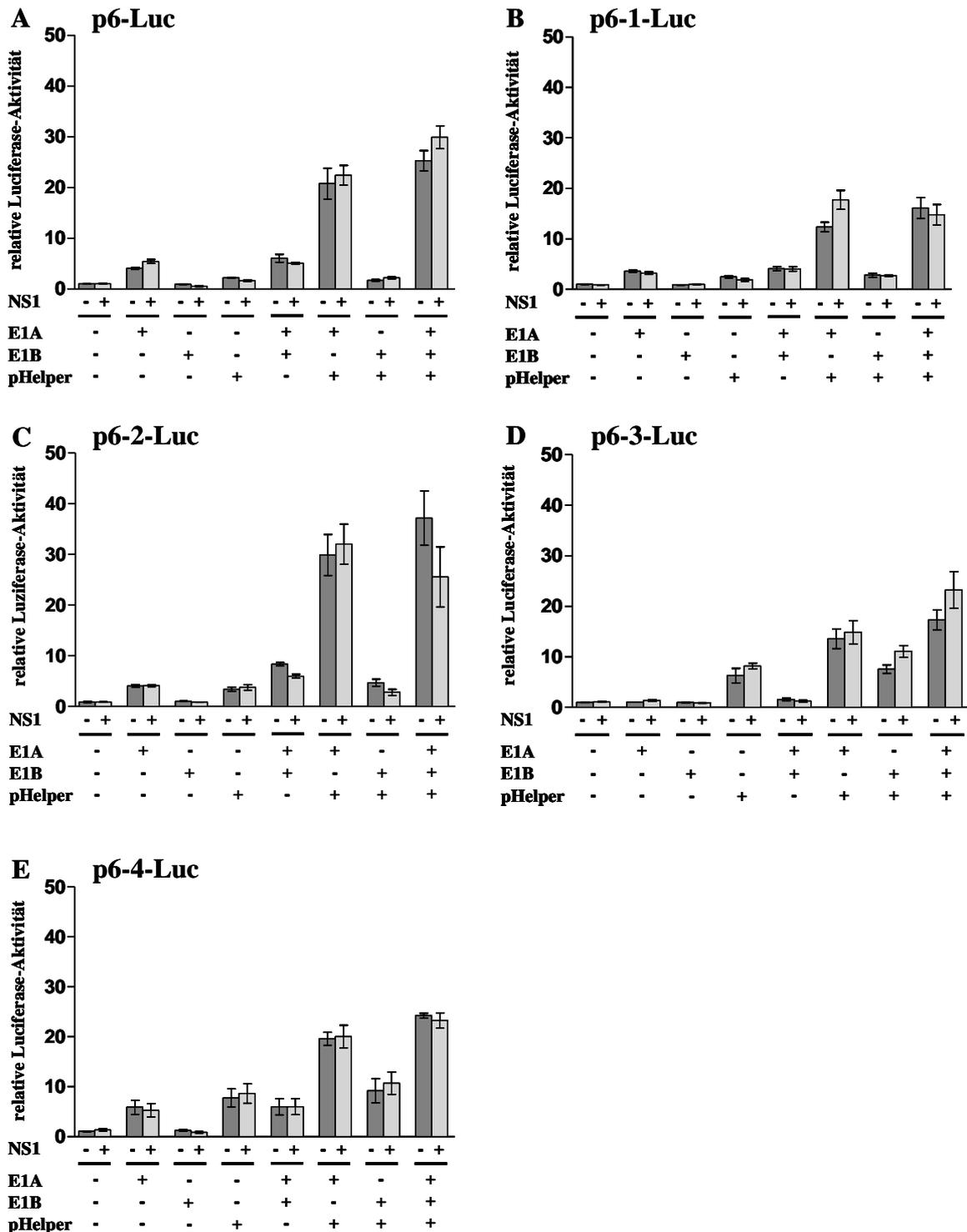


Abbildung 4-18: Identifizierung der für die Transaktivierung des p6-Promotors notwendigen adenoviralen Funktionen in EA.hy926-Zellen. EA.hy926-Zellen wurden mit den unterschiedlichen

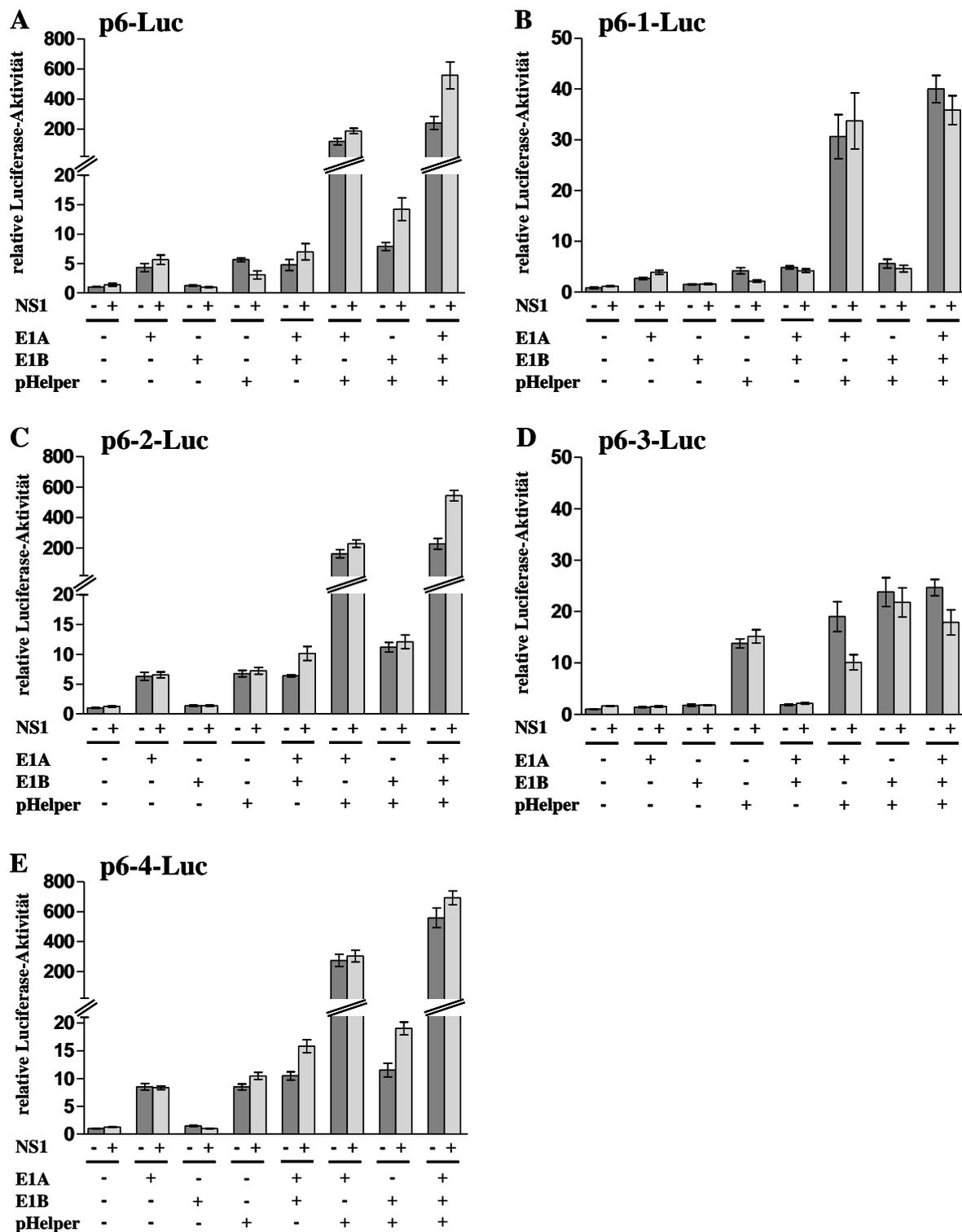
p6-Promotor-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukten und den entsprechenden adenoviralen Funktionen bzw. dem parvoviralen NS1 ko-transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Als Referenz innerhalb jedes Diagramms dienten die Transfektionsansätze mit den p6-Promotor-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukten ohne zusätzliche adenovirale Funktionen. Diese wurden auf einen Wert von 1 gesetzt und alle anderen Werte eines Datensatzes wurden auf diesen Referenzwert bezogen. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen generiert und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Neben den Untersuchungen in der endothelialen Zelllinie EA.hy926 wurden die für die Transaktivierung des p6-Promotors notwendigen adenoviralen Funktionen auch in den primären Endothelzellen der Koronararterie (HCAEC) analysiert.

Wie bereits in den EA.hy926-Zellen konnte auch in den HCAEC durch E1A, mit Ausnahme des Konstruktes p6-3-Luc, eine Aktivitätssteigerung des p6-Promotors beobachtet werden. Zudem konnte mit dem pHelper-Plasmid auch in den HCAEC eine klare Stimulierung des p6-Promotors detektiert werden, wobei bei den Konstrukten p6-Luc und p6-1-Luc die Aktivitätssteigerung, wie bereits in den EA.hy926-Zellen beobachtet, nur gering ausfiel.

Im Vergleich zu den EA.hy926-Zellen konnte auch in den HCAEC ein synergistischer Effekt von E1A und den pHelper-Funktionen gemessen werden, allerdings fiel dieser bezeichnenderweise bei den Promotorkonstrukten p6-Luc, p6-2-Luc und p6-4-Luc in den HCAEC bis zu etwa 20-fach stärker aus als in den EA.hy926-Zellen (Abb. 4-19). Das Promotorkonstrukt p6-1-Luc zeigte in den HCAEC im Vergleich zu den EA.hy926-Zellen nur eine etwa 2-fache Aktivitätssteigerung bei einer Ko-Transfektion von E1A und pHelper und beim p6-3-Luc-Konstrukt fiel der synergistische Effekt in beiden Endothelzellen gleich stark aus. Wie auch für die EA.hy926-Zellen beobachtet, zeigten sowohl E1B als auch NS1 in den HCAEC keine signifikante Wirkung auf die Transaktivierung des p6-Promotors.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sowohl E1A als auch die adenoviralen Funktionen des pHelper-Plasmids prinzipiell den isolierten B19V-Promotor transaktivieren können. Zudem wirken E1A und die pHelper-Funktionen synergistisch auf die p6-Promotoraktivität und zeigen in Abhängigkeit der flankierenden p6-Promotorsequenzen in den primären HCAEC eine bis zu etwa 20-fach höhere Transaktivierungsrate als in der endothelialen Zelllinie EA.hy926. E1B spielt keine und NS1 nur eine untergeordnete Rolle bei der Transaktivierung des p6-Promotors.



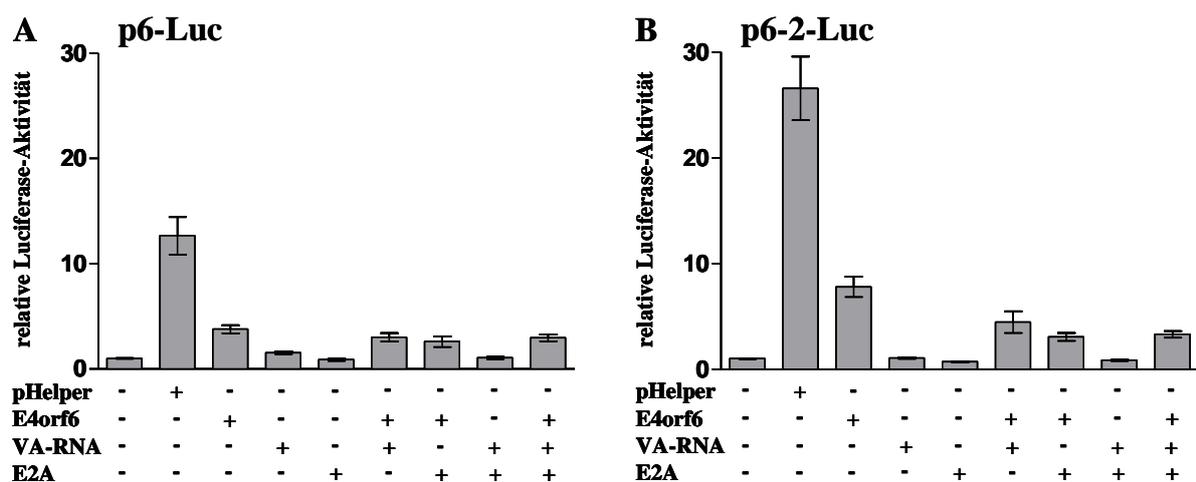
**Abbildung 4-19: Identifizierung der für die Transaktivierung des p6-Promotors notwendigen adenoviralen Funktionen in den Primärzellen HCAEC.** Die Zellen wurden mit den unterschiedlichen p6-Promotor-Luciferase-Reportergen-Konstrukten und den entsprechenden adenoviralen Funktionen bzw. dem parvoviralen NS1 ko-transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Als Referenz innerhalb jedes Diagramms dienen die Transfektionsansätze mit den p6-Promotor-Luciferase-Reportergen-Konstrukten ohne zusätzliche adenovirale Funktionen. Diese wurden auf einen Wert von 1 gesetzt und alle anderen Werte eines Datensatzes wurden auf

diesen Referenzwert bezogen. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen generiert und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

#### 4.2.5.2 Analyse zur transaktivierenden Wirkung der adenoviralen Funktionen des pHelper-Plasmids

Da unter Punkt 4.2.5.1 gezeigt werden konnte, dass die adenoviralen Funktionen des pHelper-Plasmids transaktivierend auf den p6-Promotor wirken, sollte als nächstes untersucht werden, welche der einzelnen pHelper-Funktionen an der Transaktivierung des p6-Promotors beteiligt sind.

Hierzu wurden für E2A, E4 und VA RNA Expressionsplasmide verwendet, die in verschiedenen Kombinationen in die endotheliale Zelllinie EA.hy926 ko-transfiziert wurden. Diese Konstrukte wurden freundlicher Weise von David Pintel (University of Missouri, Columbia, USA) und Tom Shenk (Princeton University, USA) zur Verfügung gestellt. Für die E4-Region des pHelper-Plasmids wurde aufgrund der Komplexbildung mit E1A und E1B 55KD der für das E4orf6-kodierende Sequenzbereich verwendet (157; 161). Für die Promotoraktivitätsbestimmungen wurden nur zwei der fünf p6-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte eingesetzt. Zum einen das Konstrukt p6-Luc, welches den reinen p6-Promotor enthält und zum anderen das Konstrukt p6-2-Luc, das 150 Nukleotide der B19V 5'-ITR und zusätzlich die ersten 59 Nukleotide des OFR des NS1-Proteins umfasst.



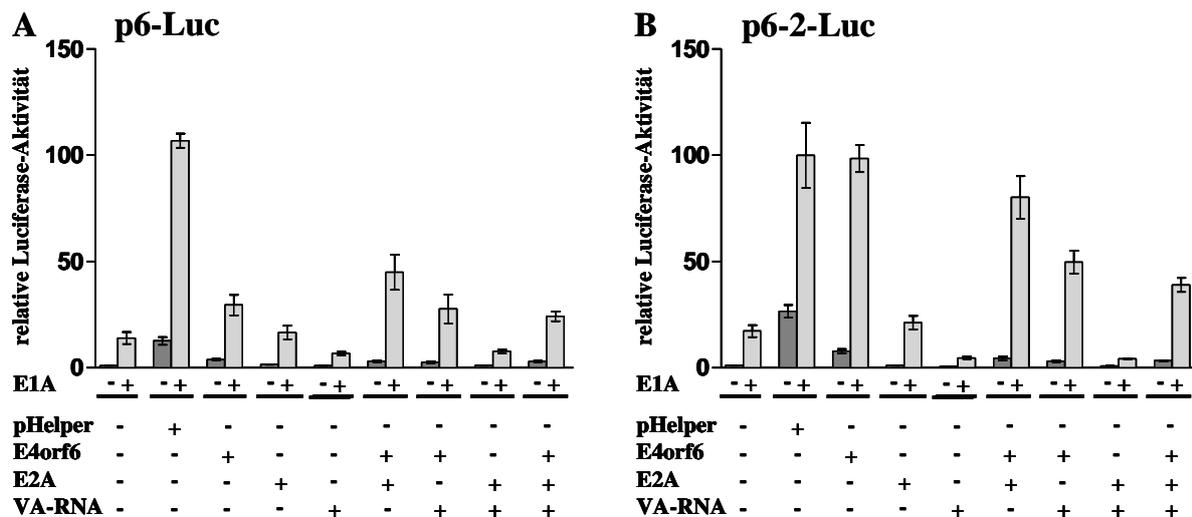
**Abbildung 4-20: Analyse der für die Transaktivierung des p6-Promotors notwendigen Funktionen des pHelper-Plasmids in EA.hy926-Zellen.** EA.hy926-Zellen wurden mit den p6-Promotor-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukten p6-Luc bzw. p6-2-Luc und den isolierten adenoviralen Funktionen des pHelper-Plasmids ko-transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Als Referenz innerhalb jedes Diagramms diente das entsprechende p6-Promotor-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte ohne zusätzliche adenovirale Funktionen. Diese wurde auf einen

Wert von 1 gesetzt und die restlichen Werte des Datensatzes wurden auf diesen Referenzwert bezogen. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen generiert und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Bei beiden untersuchten Promotorkonstrukten konnte nur durch E4orf6 eine Steigerung der Promotoraktivität gemessen werden (Abb. 4-20). E2A und VA RNA zeigten keinen Einfluss auf die p6-Aktivität. Die Kombination der einzelnen pHelper-Funktionen führte ebenfalls nur bei Vorhandensein von E4orf6 zu einer Stimulierung des p6-Promotors, allerdings war die gemessene p6-Promotoraktivität im Vergleich zu E4orf6 allein leicht vermindert. Auffallend war, dass die Ko-Transfektion von E2A, E4orf6 und VA RNA zu einer geringeren Aktivierung des p6-Promotors führte als die Transfektion mit dem pHelper-Plasmid.

Ähnliche Beobachtungen ließen sich in Anwesenheit von E1A, wie in Abbildung 4-21 dargestellt, anstellen. Nur in den Ansätzen, in denen E4orf6 und E1A ko-transfiziert wurden, konnte eine Stimulierung der p6-Promotoraktivität beobachtet werden. Im Gegensatz zum p6-Luc-Konstrukt konnte beim p6-2-Luc-Konstrukt durch die Kombination von E1A und E4orf6 eine vergleichbar hohe Transaktivierung des p6-Promotors erzielt werden wie bei der Kombination des pHelper-Plasmids mit E1A (siehe Abbildung 4-21, Teil B, Balken 4 und 6). Die Ko-Transfektion von E2A und VA RNA mit E1A führte zu keiner gesteigerten Luciferaseaktivität.

Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass E2A und VA RNA des pHelper-Plasmids eine Rolle bei der Transaktivierung des p6-Promotors spielen, so zeigen die Ergebnisse der Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21, dass im Vergleich mit den anderen pHelper-Funktionen E4orf6 eine entscheidende Rolle spielt und in Kombination mit E1A die stärkste Aktivierung des Promotors bewirkt.



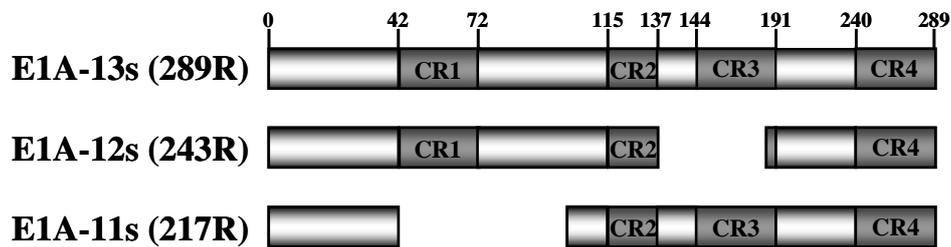
**Abbildung 4-21: Analyse zur Wechselwirkung von E1A mit den einzelnen Funktionen des pHHelper-Plasmids auf den isolierten p6-Promotor in EA.hy926-Zellen.** EA.hy926-Zellen wurden mit den p6-Promotor-Luciferase-Reportergen-Konstrukten p6-Luc bzw. p6-2-Luc, E1A und den isolierten adenoviralen Funktionen des pHHelper-Plasmids ko-transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Die Ansätze ohne E1A sind in dunkel-grau, die mit E1A in hell-grau dargestellt. Als Referenz innerhalb jedes Diagramms diente das entsprechende p6-Promotor-Luciferase-Reportergen-Konstrukte ohne zusätzliche adenovirale Funktionen und wurde auf einen Wert von 1 gesetzt. Die restlichen Werte des Datensatzes wurden auf diesen Referenzwert bezogen. Die Daten wurden durch drei unabhängige Versuche gewonnen und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

#### 4.2.6 Transaktivierende Funktion der E1A-Proteine

Das E1A-Gen kodiert für fünf verschiedene mRNA-Isoformen, welche durch differenziertes Spleißen aus einer gemeinsamen prä-mRNA resultieren (176-178). Die mRNAs unterscheiden sich anhand der herausgeschnittenen Introns unterschiedlicher Größe, weisen aber die gleichen 5'- und 3'-Enden auf. Innerhalb des E1A-Gens wurden vier hochkonservierte Sequenzbereiche identifiziert, die als konservierte Regionen 1-4 (CR1-4) bezeichnet werden (179; 180). Die verschiedenen E1A mRNA-Isoformen weisen je nach Spleißmuster eine unterschiedliche Ausstattung dieser konservierten Regionen auf.

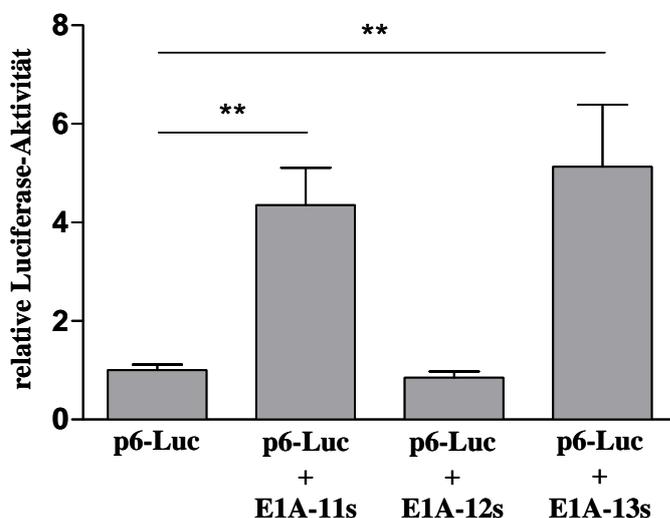
Da bei den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass E1A eine wesentliche Komponente bei der Transaktivierung des p6-Promotors darstellt, sollte im Folgenden untersucht werden, welche der vier konservierten Regionen des E1A-Proteins für die Transaktivierung des p6-Promotors essentiell sind. Für die Analyse wurden die Isoformen E1A-13s, E1A-12s und E1A-11s verwendet (Abb. 4-22). Das E1A-13s ist die längste Isoform und enthält alle vier möglichen konservierten Regionen des E1A. Das E1A-12s zeichnet sich durch einen fehlenden Sequenzbereich aus, der die konservierte Region 3 umfasst. Dem E1A-

11s fehlt die gesamte konservierte Region 1 mit einem Großteil der am 3'-Ende angrenzenden Spacersequenz.



**Abbildung 4-22: schematische Darstellung von E1A-11s, E1A-12s und E1A-13s.** Die konservierten Regionen sind mit CR1, CR2, CR3 und CR4 bezeichnet. Die Aminosäurebezeichnung richtet sich nach dem E1A 289R-Protein (Abbildung modifiziert nach (181))

Die Untersuchungen zur Transaktivierung des p6-Promotors durch die Isoformen E1A-13s, E1A-12s und E1A-11s wurden in EA.hy926-Zellen durchgeführt. E1A-11s und E1A-13s, welche beide die konservierte Region 2, 3 und 4 enthalten, zeigten eine vergleichbar starke Stimulierung der p6-Promotoraktivität um etwa den Faktor 5. Die Ko-Transfektion mit dem Konstrukt E1A-12s, bei dem ausschließlich die konservierte Region 3 deletiert ist, ließ keine Aktivitätssteigerung des Promotors erkennen (Abb. 4-23). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Vorhandensein der konservierten Region 3 für die Transaktivierung des p6-Promotors essentiell ist, und dass die konservierten Regionen 1, 2 und 4 für die Transaktivierung keine Rolle spielen.



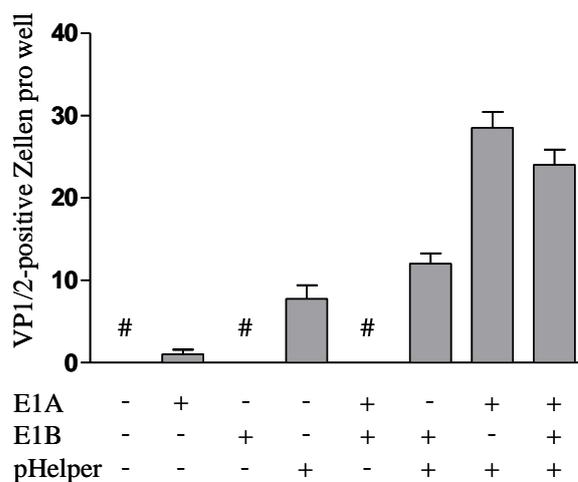
**Abbildung 4-23: Transaktivierung des p6-Promotors durch E1A-Isoformen.** EA.hy926-Zellen wurden mit dem p6-Luciferase-Reportergen-Konstrukt und den Konstrukten E1A-11s, E1A-12s und E1A-13s ko-transfiziert. Die Luciferase-Aktivitäten wurden 48 h nach der Transfektion gemessen und sind als relative Werte dargestellt. Die Probe p6-Luc ohne E1A wurde auf den Wert 1 gesetzt und diente als Referenz für die weiteren Ansätze. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen generiert und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

\*\* $p < 0,01$

Wie in den bisherigen Versuchen gezeigt werden konnte, findet durch das adenovirale E1A im Zusammenspiel mit den adenoviralen Funktionen des pHelper-Plasmids in Endothelzellen eine starke Transaktivierung des isolierten p6-Promotors statt. Diese p6-Transaktivierung ist unabhängig vom B19V-NS1.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob diese identifizierten adenoviralen Funktionen in Endothelzellen auch zu einer Stimulierung der B19V-Protein-Expression im Kontext eines infektiösen B19V-Genoms führen können. Hierzu wurden EA.hy926-Zellen mit dem pB19-M20-Plasmid und den adenoviralen Proteinen E1A, E1B und denen des pHelper-Plasmids ko-transfiziert und die VP1/2-positiven Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert.

In Abbildung 4-24 ist die Anzahl der im Rahmen dieser Untersuchung VP1/2-exprimierenden Zellen dargestellt. Die Ko-Transfektion von pB19-M20 mit E1A allein zeigte in einer mit ursprünglich 100.000 Zellen ausgesäten 24-well-Platte nur eine einzige VP1/2-positive Zelle. Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen beobachtet, reichte E1B für die Transaktivierung des p6-Promotors nicht aus. Die Ko-Transfektion von E1A mit E1B war für eine detektierbare VP1/2-Expression auch nicht ausreichend. Die Ko-Transfektion von pB19-M20 mit dem pHelper-Plasmid zeigte hingegen eine etwa 10-fach höhere Anzahl an positiven Zellen und etwa gleich viele positive Zellen wie die Ko-Transfektion von E1B und pHelper. In Anlehnung an die erzielten Ergebnisse zum isolierten p6-Promotor zeigte eine Ko-Transfektion von E1A mit pHelper mit einer etwa 25- bis 30-fachen Steigerung der VP1/2-positiven Zellen die höchste Effektivität.

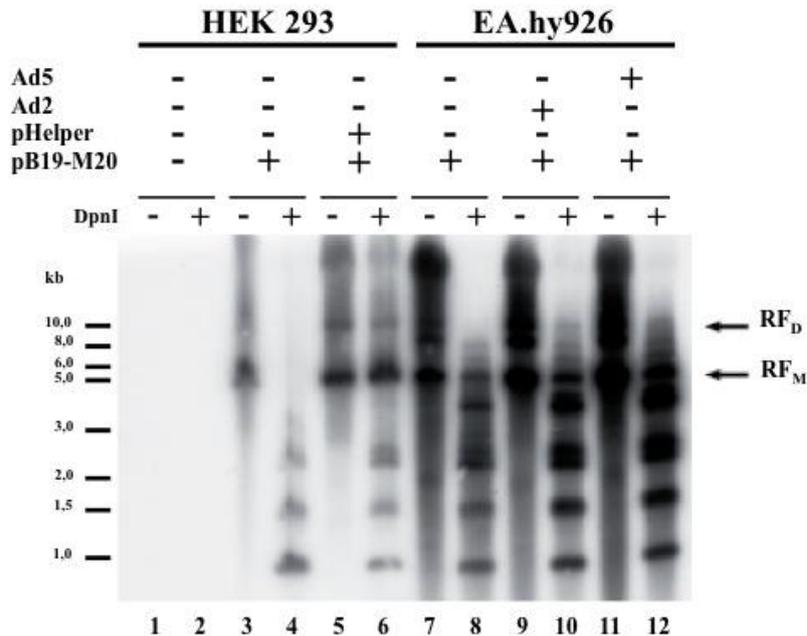


**Abbildung 4-24: Auszählung der VP1/2-positiven Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz.** EA.hy926-Zellen wurden mit dem *SalI*-linearisierten pB19-M20-Plasmid und den entsprechenden adenoviralen Funktionen in einer 24-well-Platte ko-transfiziert und nach 48 h die VP-Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. #, keine positive Zelle

#### 4.2.7 Synthese von B19V DNA-Replikationsintermediaten nach Ko-Infektion mit Adenovirus in Endothelzellen

Kürzlich wurde von Guan et al gezeigt, dass B19V in den nicht-permissiven HEK 293-Zellen mit Hilfe der adenoviralen Proteine E1A, E1B, E2A, E4 und VA RNA replizieren kann (103). Basierend auf den bisher erzielten Ergebnissen zur Adenovirus-vermittelten Transaktivierung des p6-Promotors und der darauf zurückgehenden Stimulierung der B19V-Proteinexpression, sollte nachfolgend untersucht werden, ob auch Endothelzellen die Replikation von B19V nach einer Adenovirus Ko-Infektion unterstützen. Hierzu wurde die endotheliale Zelllinie EA.hy926 mit dem Plasmid pB19-M20 transfiziert und anschließend mit Ad2 infiziert. Als Kontrolle wurden zusätzlich HEK 293-Zellen mit pB19-M20 und dem pHelper-Plasmid ko-transfiziert. Um die neu-synthetisierte DNA von der Ausgangs-DNA unterscheiden zu können, folgte nach der Isolierung der niedermolekularen DNA nach Hirt ein *DpnI*-Verdau. Das Restriktionsenzym *DpnI* benötigt für die Spaltung der DNA eine Methylierung der Adeninmoleküle, welche in Bakterien, aber nicht in eukaryotischen Zellen erfolgt. Nicht-methylierte DNA kann demnach mit *DpnI* nicht geschnitten werden und hemimethylierte DNA wird mit einer 60-fach geringeren Effizienz verdaut.

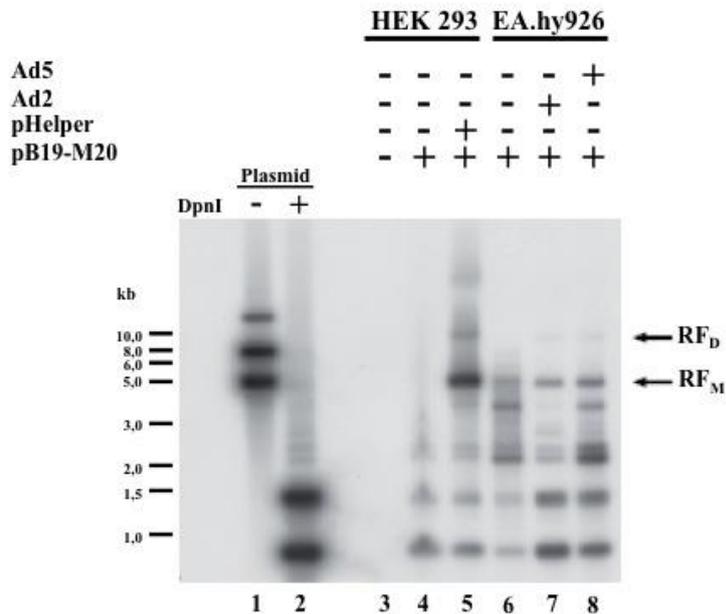
In den HEK 293-Zellen konnte nach Ko-Transfektion von pB19-M20 mit dem pHelper-Plasmid eine *DpnI*-resistente Bande nachgewiesen werden, die den monomeren und dimeren Intermediaten der B19V-Replikation entsprechen (Abb. 4-25, Spur 6). In den EA.hy926-Zellen konnte hingegen bereits ohne eine Adenovirus Ko-Infektion eine *DpnI*-resistente Bande detektiert werden, die auf der Höhe von 5,6 kb lief und so dem monomeren Replikationsintermediat von B19V entsprach (Spur 8). Bei einer Ad2 bzw. Ad5 Ko-Infektion nahm diese Bande an Intensität zu und zusätzlich konnte auf der Höhe des dimeren Replikationsintermediates ebenfalls eine schwache Bande beobachtet werden (Spur 11 und 12). Eine Unspezifität der Hybridisierungssonde konnte ausgeschlossen werden, da in den HEK 293-Zellen bei einer fehlenden pB19-M20-Transfektion keine Banden auf der entsprechenden Höhe detektiert werden konnten (Spur 4).



**Abbildung 4-25: Vergleich der B19V-Replikation in HEK 293- und EA.hy926-Zellen.** HEK 293- und EA.hy926-Zellen wurden mit dem *Sall*-linearisierten pB19-M20-Plasmid transfiziert. Die HEK 293-Zellen wurden zusätzlich mit dem pHelper-Plasmid ko-transfiziert, während die EA.hy926-Zellen mit 10 MOI Ad2 bzw. Ad5 infiziert wurden. 48 h nach Transfektion und Infektion erfolgte die Isolierung der niedermolekularen DNA nach Hirt. Jeweils 6 µg der aufgereinigten DNA wurden für 3 h mit 40 units *DpnI* verdaut. Die zusammengehörigen *DpnI*-verdauten und unverdauten Proben (mit +/- gekennzeichnet) wurden für den Southern Blot nebeneinander aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer <sup>32</sup>P-markierten Sonde gegen B19V. Pfeile markieren die potentielle monomerische (RF<sub>M</sub>) und dimerische (RF<sub>D</sub>) Form der B19V-Replikationsintermediate.

Mit dem folgenden Experiment sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten B19V-Replikationsintermediate auf einen unvollständigen *DpnI*-Verdau zurückzuführen sind. Hierzu wurde ein zweites unabhängiges Experiment durchgeführt, bei dem die gewonnene DNA dieses Mal mit 60 statt 40 units an *DpnI* und statt 3 h über Nacht bei 37°C verdaut wurde. Als weitere Kontrolle wurde die DNA der nicht mit pB19-M20 transfizierten HEK 293-Zellen mit der gleichen Menge an *Sall*-linearisierter pB19-M20-DNA versetzt und unter identischen Bedingungen mit *DpnI* verdaut. Diese Kontrolle zeigte einen kompletten Verdau der überschüssigen DNA (Spur 2). Wie bereits in Abbildung 4-25 gezeigt, wiesen auch hier die EA.hy926-Zellen bereits ohne Ad2 bzw. Ad5 Infektion eine Bande in Höhe des monomerischen B19V-Replikationsintermediates auf (siehe Abb. 4-26, Spur 6). Außerdem

ließ sich bei einer Adenovirus-Infektion auch hier wieder eine schwache Bande auf Höhe des dimerischen B19V-Genoms erkennen (Spur 7 und 8).



**Abbildung 4-26 Kontrolle des *DpnI*-Verdau.** HEK 293- und EA.hy926-Zellen wurden mit dem *Sall*-linearisierten pB19-M20-Plasmid transfiziert. Die HEK 293-Zellen wurden zusätzlich mit dem pHelper-Plasmid ko-transfiziert, während die EA.hy926-Zellen mit 10 MOI Ad2 bzw. Ad5 infiziert wurden. 48 h nach Transfektion und Infektion erfolgte die Isolierung der niedermolekularen DNA nach Hirt. Jeweils 6 µg der aufgereinigten DNA wurden über Nacht mit 60 units *DpnI* verdaut. Die zusammengehörigen *DpnI*-verdauten und unverdauten Proben (mit +/- gekennzeichnet) wurden für den Southern Blot nebeneinander aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde gegen B19V. Pfeile markieren die potentielle monomerische ( $\text{RF}_M$ ) und dimerische ( $\text{RF}_D$ ) Form der B19V-Replikationsintermediate.

Aufgrund der Tatsache, dass hemimethylierte DNA, welche bei einer Zweitstrangsynthese entstehen würde, weitestgehend gegen *DpnI* resistent wäre, kann nicht davon ausgegangen werden, dass die monomerische Bande mit einer Größe von 5,6 kb einem komplett neu-synthetisiertem B19V-Genom entspricht. Jedoch zeigen die Ergebnisse der Southern Blots, dass in den EA.hy926-Zellen ohne adenovirale Helferfunktionen eine Zweitstrangsynthese stattfindet. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei einer Ad2- bzw. Ad5-Infektion potentielle dimerische Replikationsintermediate auftreten.

## 5 Diskussion

B19V gilt als Erreger der Ringelröteln, des Hydrops fetalis, aplastischer Anämien und Polyarthritiden. Ein produktiver B19V-Replikationszyklus, der schließlich zur Generierung neuer Viruspartikel führt, findet nach heutigem Kenntnisstand *in vivo* ausschließlich in erythroiden Progenitorzellen (EPCs) im Knochenmark oder in fetalen Leberzellen statt (122; 182).

Trotz des engen Zell- und Gewebetropismus zeigten Untersuchungen der letzten Jahre, dass B19V ein kardiotropes Virus ist. Die Zielzellen im Herzen sind Endothelzellen der kleinen intramyokardialen Arteriolen und postkapillaren Venen der Endstrombahn (131). Untersuchungen zur möglichen ätiopathogenetischen Rolle von B19V im Herzen reichen von einer asymptomatischen, langjährigen Latenz der B19V-DNA in den Endothelzellen des Herzen (152; 153) bis hin zu einer Assoziation von B19V mit Herzerkrankungen wie akuten und chronischen Myokarditiden und inflammatorischer dilatativer Kardiomyopathie (DCMi) mit endothelialer Dysfunktion (138; 151; 183; 184). Zudem wurde in kürzlich erschienenen Untersuchungen die Ansicht vertreten, dass die ätiopathogenetische Rolle von B19V in entzündlichen Herzmuskelerkrankungen primär von der Anzahl der Genomkopien im Myokardium abhängig ist, und dass eine B19V-Latenz im Myokard mit nachweisbar geringen Genomkopien (< 500 Genomkopien pro  $\mu\text{g}$  DNA) keine Relevanz für die Entstehung nicht-inflammatorischer dilatativer Kardiomyopathien hat (130, 185).

Da die Mechanismen der endothelialen B19V-Infektion bisher weitestgehend unbekannt sind und zudem nicht geklärt ist, ob die B19V-Latenz in den Endothelzellen des Herzen überwunden werden kann, wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt: Zum einen wurde erstmals der Rezeptor-vermittelte B19V-Aufnahmemechanismus in Endothelzellen untersucht. Hierzu wurde die endotheliale Rezeptorexpression verschiedener Gewebe charakterisiert, das B19V Bindungs- und Internalisierungsverhalten von Endothelzellen analysiert und die Rolle des  $\beta_1$ -Integrins als Ko-Rezeptor in der B19V-Infektion untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine mögliche Adenovirus-induzierte Reaktivierung von B19V untersucht. Grundlage hierfür bot der Nachweis der B19V-DNA in Kombination mit anderen Viren wie Herpes- bzw. Adenoviren im Herzen (144) und der Nachweis einer Stimulierung der p6-Promotoraktivität von B19V durch adenovirale Funktionen (186). Für die Untersuchung einer möglichen Helferfunktion von Adenovirus bei der Etablierung der B19V-Infektion in Endothelzellen, wurde die B19V-Proteinexpression bei einer adenoviralen Ko-Infektion analysiert und die transaktivierende Wirkung von Adenovirus und einzelner

isolierter adenoviraler Funktionen auf den isolierten p6-Promotor untersucht. Zudem erfolgte eine Analyse der B19V-Replikation bei einer Ko-Infektion mit Adenovirus.

## **5.1 Rezeptor-vermittelte B19V-Bindung und -Internalisierung in Endothelzellen**

B19V zeichnet sich durch einen stark ausgeprägten Zell- und Gewebetropismus für erythroide Vorläuferzellen des Knochenmarks und fetaler Leberzellen aus (113; 182), welcher durch verschiedene Faktoren bedingt sein kann. So konnte gezeigt werden, dass es in nicht-permissiven Zellen durch die Polyadenylierung an der proximalen Polyadenylierungsstelle der mRNAs zu einem vorzeitigen Abbruch der Synthese der prä-mRNA kommt, wodurch die Inhibierung der Kapsidproteinsynthese und eine gesteigerte NS1-Generierung bedingt werden (120). Aufgrund der apoptotischen und zytotoxischen Eigenschaften von NS1 führt dieser frühzeitige Abbruch der Translation zum Zelltod (21, 121). Zudem zeigten Ergebnisse diverser Studien, dass in nicht-permissiven Zellen neben der Translation auch die B19V-Replikation beeinträchtigt ist. Entweder tritt eine vollständige Blockade in der Überführung der einzelsträngigen DNA in die doppelsträngige, replikative Form des B19V-Genoms auf, oder die Doppelstrangsynthese beschränkt sich ausschließlich auf eine kleine Subpopulation der Zellen (122-124). Des Weiteren scheint die Replikation des B19V-Genoms für die ausreichende Synthese der Kapsid-mRNAs, und der damit einhergehenden Synthese von Neugenerierten Viruspartikeln notwendig zu sein (100). Neben diesen intrazellulären Prozessen kann der stark ausgeprägte Zelltropismus von B19V allerdings bereits in der frühen Phase der Infektion durch eine eingeschränkte Expression der für B19V-beschriebenen Rezeptoren P-Antigen (32),  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin (42) und KU80 (63) und einer daraus resultierenden Inhibierung der Virusaufnahme bedingt sein.

Das Blutgruppen P-Antigen ist als Hauptrezeptor für die Bindung von B19V an die Zelloberfläche zuständig und wird neben Erythrozyten und deren Vorläuferzellen auch auf der Oberfläche einer Reihe anderer Zelltypen wie Megakaryozyten, Thrombozyten, Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert (47, 48). Neben dem P-Antigen wurden das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und das KU80-Autoantigen auf Knochenmarkszellen und der adhärennten humanen erythroiden Leukämiezelllinie K562 bzw. der humanen erythroiden Zelllinie Ku812Ep6 als Ko-Rezeptoren für B19V beschrieben (49, 70). Das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin ist ein heterodimerer, transmembranöser Glycoproteinrezeptor, welcher durch die Bindung von Fibrinogen mitunter für die Zelladhäsion und Migration von Endothelzellen zuständig ist (60-62).

Vorangegangene Studien an erythroide Vorläuferzellen haben gezeigt, dass für seine Ko-Rezeptorfunktion das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin in einem aktivierten Zustand vorliegen muss und innerhalb eines Integrinnetzwerkes aus  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ - Integrin reguliert wird (42, 48). Das KU80 Autoantigen bildet mit KU70 ein heterodimeres, primär im Zellkern-lokalisiertes Protein, bei dem es sich in erster Linie um ein DNA-Reperaturprotein handelt (71, 72), welches auch in weiteren nukleären Prozessen wie z.B. der DNA-Replikation, der Transkription (64), der Regulation der RNA Polymerase II-Aktivität (66) und der Chromatinkondensation während der G2/M Phase (67) eine wichtige Rolle einnimmt. Neben dem Zellkern konnte es in den vergangenen Jahren auch im Zytoplasma (70), in der Zellmembran diverser Tumorzellen (71-74; 76), und in der Zellmembran von erythroiden Vorläuferzellen des Knochenmarks detektiert werden (63), wo es an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt ist (77; 73; 78) und als Adhäsionsrezeptor für Fibronektin und Typ IV-Kollagen (74; 77) fungiert.

### **5.1.1 Analyse der B19V-Bindung und -Internalisierung in Endothelzellen**

Durch Untersuchungen der letzten Jahre ist bereits bekannt, dass Endothelzellen prinzipiell mit B19V infizierbar sind. Hierbei ließen sich in humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) bzw. humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-C1) die VP1-mRNA bzw. NS1 von B19V nachweisen, allerdings fielen aus noch ungeklärten Gründen die Expressionslevel der B19V-Proteine im Vergleich zu den erythroiden Vorläuferzellen deutlich geringer aus (173; 29). Um die Ursache für die beobachtete niedrige B19V-Proteinexpression klären zu können, welche möglicherweise auf die Rezeptorausstattung der Zellen zurückzuführen sein könnte, erfolgte in dieser Arbeit erstmals eine detaillierte Charakterisierung der B19V-Rezeptorexpression auf Endothelzellen verschiedener Gewebe. Zudem wurden das Bindungs- und Internalisierungsverhalten der Endothelzellen für B19V analysiert, um untersuchen zu können, ob die geringe Proteinexpression durch die Inhibierung der Virusaufnahme bereits in der frühen Phase der endothelialen Infektion bedingt ist.

Auf allen untersuchten Zellen, den endothelialen Primärzellen der Koronararterie (HCAEC), der Haut (HDMEC), der Aorta (HAoEC), der Pulmonalarterie (HPAEC) und der Nabelschnur (HUVEC), sowie der endothelialen Hybridzelllinie EA.hy926, welche durch die Fusion humaner Nabelschnurzellen (HUVEC) und der epithelialen Lungenkarzinomzellen A549 gewonnen wurde (171), konnte das für die B19V-Bindung benötigte P-Antigen extrazellulär nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich Schwankungen von 6 % bei den HAoEC, über

ungefähr 50 % bei den HPAEC, HUVEC und EA.hy926-Zellen bis hin zu 74 % bei der in dieser Arbeit als Referenz dienende und für B19V semi-permissive erythroide Zelllinie UT7/Epo-S1 (siehe S. 65). Das Bindungsverhalten der verschiedenen Endothelzellen korrelierte nicht mit der ermittelten extrazellulären Expression des P-Antigens. Die B19V-Bindungsrate reichte im Vergleich zu den UT7/Epo-S1-Zellen (auf 100 % gesetzt) von etwa 30 % bei den EA.hy926-Zellen, über 65 % bei den HCAEC bis hin zu etwa 115 % bei den HDMEC, HAoEC und HUVEC (siehe S. 70). Im Gegensatz zur B19V-Bindung zeigte sich allerdings im Vergleich zu den UT7/Epo-S1-Zellen eine starke Inhibierung in der B19V-Internalisierung von Endothelzellen. So lag die Internalisierungsrate bei allen untersuchten Endothelzellen bei maximal 5 % der aufgenommenen B19V-Partikel der UT7/Epo-S1-Zellen und wies keine Korrelation zu der Anzahl an gebundenen B19V-Partikel auf. Durch den anschließenden Nachweis der mRNA-Expression der B19V-Kapsidproteine VP1/2 konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den vermeintlich nachgewiesenen internalisierten B19V-Partikeln der Endothelzellen fälschlicherweise um noch außen an der Zellmembran gebundene, nicht-internalisierte B19V-Partikel handelte. Wie zu erwarten zeigte sich aufgrund der geringen B19V-Internalisierungsrate der Endothelzellen eine etwa 10.000-fach niedrigere VP1/2-Expressionsrate, als in den UT7/Epo-S1-Zellen (siehe S. 71). Die Untersuchung der endothelialen Expression der B19V Ko-Rezeptoren zeigte, dass das  $\beta_1$ -Integrin mit einer Expressionsrate von mindestens 92 % auf allen untersuchten Zellen an der Zelloberfläche stark vertreten war. Dahingegen fiel die Zellmembran-assoziierte Expression von KU80 bei allen Endothelzellen mit einer maximalen Expressionsrate von 1,5 % nur sehr gering aus. Nur 5 % der UT7/Epo-S1 Zellen exprimierten KU80 an ihrer Zelloberfläche. Diese geringe Expressionsrate bestätigen die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie, in der ausschließlich 1,9 % der UT7/Epo-S1-Zellen auf KU80 positiv getestet wurden (187).

Mit diesen Ergebnissen konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Block in der Virusaufnahme ein bedeutender Resistenzmechanismus von Endothelzellen in der frühen B19V-Infektion darstellt. Dieser Resistenzmechanismus wird nicht durch die B19V-Bindung, sondern durch die B19V-Internalisierung bedingt. Die Ko-Rezeptoren KU80 und  $\beta_1$ -Integrin sind für den Prozess der B19V-Internalisierung zuständig und stellen infolgedessen die entscheidenden Faktoren für die beobachtete Inhibierung der B19V-Aufnahme dar. Aufgrund seiner nachweislich nur sehr geringen extrazellulären Expression kann davon ausgegangen werden, dass KU80 keine Rezeptorfunktion bei der endothelialen B19V-Infektion einnimmt.

Die Rolle von KU80 als Ko-Rezeptor für die B19V-Internalisierung wurde an der humanen erythroiden Zelllinie KU812Ep6 und an Knochenmarkzellen beschrieben. Durch eine

Antikörper-vermittelte Blockierung der an der Zelloberfläche exprimierten KU80-Moleküle bzw. durch den Einsatz von KU80-spezifischer shRNAs konnte die B19V-Internalisierung in diesen Zellen inhibiert werden (63). Allerdings konnte in einer späteren Studie an CD36<sup>+</sup> erythroiden Vorläuferzellen, welche *in vitro* aus hämatopoetischen Stammzellen generiert wurden, die für KU80 beschriebene B19V Ko-Rezeptorfunktion nicht bestätigt werden (187). Diese erythroiden Vorläuferzellen stellten sich trotz fehlender KU80-Oberflächenexpression für B19V als hoch-permissiv heraus. Die Ergebnisse dieser Studien könnten ein Hinweis darauf sein, dass die KU80-Rezeptorfunktion für eine B19V-Infektion möglicherweise Zelltyp-spezifisch ist. Die in dieser Arbeit auf allen untersuchten Endothelzellen nur marginal detektierte KU80-Expression lässt darauf schließen, dass KU80 als Ko-Rezeptor für die B19V-Infektion von Endothelzellen keine Rolle spielt. Um dies näher untersuchen zu können wäre es interessant die membranständige KU80-Expression in den Endothelzellen zu steigern und anschließend die endotheliale B19V-Internalisierungsrate zu untersuchen. Es muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass die nur marginale KU80-Oberflächenexpression der Endothelzellen die Ursache für die beobachtete starke Inhibierung der B19V-Internalisierung darstellt.

### **5.1.2 Einfluss der Polarität von Endothelzellen auf die B19V-Internalisierung**

Endothelzellen kleiden die Innenseite von Blut- und Lymphgefäßen aus und sind aufgrund ihrer physiologischen Funktion in der Bildung einer regulierbaren Barriere zwischen dem Gefäß- und dem Extravasalraum bipolare Zellen, die jeweils eine zum Gefäßinnenraum und eine zum Gewebe gerichtete Seite aufweisen. Aufgrund der Bipolarität der Endothelzellen musste in Betracht gezogen werden, dass die Integrine möglicherweise nur auf einer Seite der Endothelzellen lokalisiert sein könnten. So wurde beispielsweise für die Expression des Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), welcher als Ko-Rezeptor von Gruppe-B-Cocksackieviren und Adenoviren A und C-F für die Virusbindung an die Zielzellen verwendet wird, gezeigt, dass dieser in polaren Epithelzellen ausschließlich an den Zell-Zell-Kontaktstellen (tight-junctions) lokalisiert ist (188). Eine überwiegend basal-lokalisierte Expression der Integrine auf Endothelzellen könnte so eine mögliche Ursache der in dieser Arbeit gezeigten starken Inhibierung der B19V-Aufnahme in Endothelzellen darstellen. Durch die Applikation der B19V-Partikel über die basal-liegende Zelloberfläche konnte im Vergleich zur apikalen Seite keine Steigerung der B19V-Internalisierung erzielt werden. Die

B19V-Internalisierungsrate fiel sogar signifikant geringer aus (siehe S. 73). Somit kann mit den vorliegenden Ergebnissen ausgeschlossen werden, die beobachtete Inhibierung der B19V-Aufnahme in Endothelzellen auf eine mögliche Rezeptorunzugänglichkeit zurückzuführen ist.

### 5.1.3 Einfluss der $\beta_1$ -Integrin-Aktivierung auf die B19V-Internalisierung

Frühere Studien zur Funktion des  $\alpha_5\beta_1$ -Integrins als B19V Ko-Rezeptor zeigten, dass das  $\beta_1$ -Integrin in einem aktivierten Zustand vorliegen muss, um die B19V-Internalisierung unterstützen zu können (42; 48; 58). Mit Hilfe der bivalenten Ionen  $Mn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  lassen sich der Aktivitätszustand des  $\beta_1$ -Integrins und die damit einhergehende Bindungsaffinität regulieren (46; 47). Durch die zusätzliche Bindung von aktivierenden Antikörpern lässt sich dieser Zustand stabilisieren (47; 172).

Um auszuschließen, dass die in dieser Arbeit beobachtete Inhibierung der B19V-Internalisierung auf eine für die B19V-Aufnahme ungünstige Konformation des  $\beta_1$ -Integrins zurückzuführen ist, wurde durch die Behandlung der Endothelzellen mit bivalenten Ionen versucht das  $\beta_1$ -Integrin in seiner Rezeptorfunktion zu aktivieren und diesen Konformationszustand mit Antikörpern zu stabilisieren. Durch die Aktivierung des  $\beta_1$ -Integrins ließ sich keine Steigerung der endothelialen B19V-Internalisierung erzielen, so dass es keine Hinweise dafür gibt, dass die inhibierte B19V-Internalisierung in Endothelzellen auf eine ungünstige  $\beta_1$ -Integrin-Konformation zurückzuführen ist. Ergänzend wäre es von Interesse eine mögliche Aktivierung von  $\beta_1$ -Integrin mit Hilfe von Rap1 zu induzieren, welches als zentraler Regulator der  $\beta_1$ -Integrin Ko-Rezeptorfunktion identifiziert wurde und durch ein cAMP-Analogen aktiviert werden kann (58).

### 5.1.4 Alternative B19V-Aufnahmemechanismen in Endothelzellen

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigen, dass die Rezeptor-vermittelte Infektion reifer Endothelzellen mit B19V *in vitro* in nur sehr geringem Maße möglich ist. Worauf dies zurückzuführen ist, konnte in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Mögliche Erklärungen könnte die nur marginale Expression des KU80-Rezeptors an der Oberfläche der Endothelzellen oder ein für die B19V-Aufnahme ungünstiger Konformationszustand des  $\beta_1$ -Integrins sein. Es kann auch nicht entgültig ausgeschlossen werden, dass ein weiterer noch unbekannter B19V-Rezeptor für die Inhibierung der B19V-Internalisierung in Endothelzellen eine entscheidende Rolle spielen könnte. Zuletzt könnte die eingeschränkte endotheliale

B19V-Aufnahme eine Folge der *in vitro*-Kultivierung der Endothelzellen und auf das mögliche Fehlen physiologischer Faktoren zurückzuführen sein.

Des Weiteren muss in Betracht gezogen werden, dass die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von B19V in Endothelzellen nur eine untergeordnete Rolle spielen könnte und alternative Aufnahmemechanismen von großer Bedeutung sein könnten. Eine mögliche Alternative zur Rezeptor-vermittelten Aufnahme stellt die Internalisierung über B19V-spezifische Antikörper dar. Der Mechanismus der Antikörper-vermittelten Verstärkung der Virusinfektion (ADE; Antibody Dependent Enhancement) wurde erstmals für das Flavivirus beschrieben (189; 190). Hierbei wird die Virusaufnahme bis hin zur Replikation durch die Wechselwirkung des Fc-Teils der Virus-spezifischen Antikörper der IgG-Klasse mit Fc- und/oder Komplement-Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten bzw. Makrophagen und Granulozyten verstärkt. Wie bereits für zahlreiche andere Viren, u.a. Influenza Virus (191; 192), HIV Typ-1 (193-195) und dem Virus der Aleutenkrankheit der Nerze (ADV) (196), welches wie B19V ebenfalls der Familie der Parvoviridae angehört, konnte ADE ebenfalls für B19V in der Monozyten-Zelllinie U937 mit aufgereinigten IgG-Fraktionen aus B19V-Antikörper-positiven Patienten nachgewiesen werden (197). Fc-Rezeptoren werden auf Endothelzellen verschiedener Gewebe exprimiert (198-202). Demnach besteht die Möglichkeit, dass der Hauptmechanismus der B19V-Aufnahme in Endothelzellen nicht auf der B19V-Rezeptor-vermittelten Ebene basiert, sondern im Verlauf einer B19V-Infektion nach Bildung B19V-spezifischer Antikörper, unspezifisch über die Fc-Domäne der Antikörper erfolgt.

Eine weitere Alternative der endothelialen B19V-Infektion stellt die Möglichkeit dar, dass die aus dem Knochenmark stammenden und im Blut zirkulierenden angiogenen Zellen (CAC), welche als Vorläuferzellen der Endothelzellen gelten, bereits mit B19V infiziert werden und dann zu reifen Endothelzellen differenzieren. So konnte *in vitro* in den CACs nach Infektion mit B19V sowohl B19V-DNA als auch die Expression der B19V-Proteine NS1 und VP1/2 nachgewiesen werden (noch unpublizierte Daten der AG Dr. C. Schmidt-Lucke, Charité, Berlin)

## 5.2 Reaktivierung von B19V durch Adenovirus

Reife Endothelzellen sind für B19V nicht-permissiv und die Genexpressionslevel in Endothelzellen sind *in vitro* sehr gering (173). Obwohl kürzlich gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von rekombinanten B19V-NS1 zu einer endothelialen Dysfunktion führen kann, ist nicht bekannt, welche Rolle die Expression parvoviraler Proteine bei einer

latentem B19V-Infektion im Herzen in der Entwicklung chronischer Herzerkrankungen spielt (29). Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte noch unbekannte Faktoren zur Reaktivierung des im Herzen latent vorliegenden B19V hin zu einer produktiven B19V-Infektion führen könnten. Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie weisen häufig Ko-Infektionen von B19V mit Herpes- oder Adenoviren auf (138).

Für verschiedene Viren ist bereits bekannt, dass ein produktiver Infektionszyklus von einer Ko-Infektion mit einem Helfervirus abhängig ist. So ist das AAV, welches ebenfalls ein Vertreter der Virusfamilie *Parvoviridae* ist und für einen produktiven Infektionszyklus auf die Helferfunktionen von Adeno- oder Herpesvirus angewiesen ist, ein Beispiel für ein Helfer-abhängiges Virus (221; 222). Die adenoviralen Funktionen E1A, E1B, E2A, E4orf6, und VA RNA unterstützen sowohl die AAV-Transkription als auch –Replikation und Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass diese adenoviralen Funktionen ebenfalls die p6-Promotoraktivität von B19V induzieren können (103; 186).

### **5.2.1 Einfluss der Adenovirus Ko-Infektion auf die B19V-Proteinexpression in Endothelzellen**

Vorangegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass reife Endothelzellen für B19V nicht-permissiv sind, und dass die Expressionslevel der NS1- und insbesondere die der VP1/2-mRNAs in Endothelzellen im Vergleich zu humanen erythroiden Vorläuferzellen *in vivo* oder semi-permissiven Zellen *in vitro* sehr gering sind (173). Die geringe Expression der B19V-Kapsidproteine in nicht-permissiven Zellen ist durch eine nur sehr geringe Aktivität des p6-Promotors und durch eine Inhibierung der Synthese der VP1/2-Transkripte aufgrund eines vorzeitigen Abbruchs der Transkription an den proximalen Polyadenylierungsstellen bedingt (120).

Zur Untersuchung des Einflusses einer adenoviralen Ko-Infektion auf die B19V-Proteinexpression wurde die Endothelzelllinie EA.hy926 mit B19V infiziert bzw. mit B19V und Adenovirus ko-infiziert. Ausschließlich bei einer adenoviralen Ko-Infektion war eine Expression der B19V-Kapsidproteine zu detektieren. Jedoch beschränkte sich die Expression der B19V-Kapsidproteine nur auf eine kleine Subpopulation der Zellen (siehe S. 77). Die Transfektion der doppelsträngigen, transkriptionskompetenten pB19-M20-DNA führte zu den gleichen Ergebnissen. Nur bei einer Infektion mit Adenovirus war eine Detektion der parvoviralen Kapsidproteine in einer kleinen Subpopulation der Zellen möglich (siehe S. 79). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ausgeschlossen werden, dass die Ursache für die

beschränkte B19V VP1/2-Expression weder in der Inhibierung der B19V-Aufnahme, noch in der Inhibierung des intrazellulären Freisetzens der B19V-Partikel bzw. der B19V-DNA lag. Zudem konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Ergebnisse auf eine Inhibierung in der Überführung des einzelsträngigen B19V-Genoms in eine transkriptionskompetente doppelsträngige Form zurückzuführen sind.

Im Expressionsmuster von B19V-VP1/2 und dem adenoviralen E1A wurden in den untersuchten EA.hy926-Zellen sowohl in den Ko-Infektionsversuchen als auch bei Transfektion des pB19V-M20-Plasmids und Infektion mit Adenovirus zwei unterschiedliche Phänotypen beobachtet. Phänotyp 1 zeichnete sich durch eine Ko-Lokalisation von VP1/2 und E1A aus und bei Phänotyp 2 konnte ausschließlich VP1/2 detektiert werden (siehe S. 77 und S. 79). Das Auftreten dieser beiden unterschiedlichen Phänotypen könnte verschiedene Ursachen haben. Die gleichzeitige Expression von E1A und VP1/2 läßt sich durch die beschriebenen Eigenschaften des E1A als Transaktivatorprotein erklären, welches den p6-Promotor transaktiviert und so die VP1/2-Expression induziert (186). Die Ursachen für den Phänotyp 2 hingegen konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden. Mehrere Mechanismen könnten hierbei eine Rolle spielen. Die Genexpression des adenoviralen E1A unterliegt in Folge einer Infektion diversen autoregulatorischen Mechanismen. Die entgegengesetzten Kontrollebenen bestehend aus autoregulatorischer Inhibierung und transaktivierender Transkription werden durch die E1A-Proteine E1A-13s und E1A-12s vermittelt. Das E1A-12s wirkt mit der CR1 und der CR2 inhibierend auf den E1A-Promotor, während das E1A-13s mit der zusätzlichen CR3 nicht nur inhibierend, sondern auch transaktivierend den Promotor beeinflusst (203; 204). Die Expression der B19V-Kapsidproteine VP1/2 könnte von einem bestimmten Expressionsverhältnis von E1A-13s und E1A-12s abhängig sein. Demnach könnte die Expression von E1A im Laufe einer Infektion aufgrund seiner autoregulatorischen Inhibierung unterbunden werden, was zu dem beobachteten VP1/2-positiven und E1A-negativen Phänotyp führen könnte. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass das E1A wie bereits beschrieben als Transaktivator für die anderen adenoviralen Promotoren dient (176), speziell für den des E4orf6, welches dann den B19V p6-Promotor aktivieren könnte, während das E1A bereits eine nicht mehr detektierbare Expressionsstärke erreicht hat. Eine solche Expressionkaskade der frühen adenoviralen Funktionen wurde bei deren Helferfunktion für die Proteinexpression von AAV beschrieben (205). Es wäre jedoch auch möglich, dass E1A zelluläre Proteine, beispielsweise Transkriptionsfaktoren, induziert, welche für die Regulation der B19V-Proteinexpression essentiell sein könnten. Eine weitere denkbare Ursache könnten auch parakrine Faktoren sein, die durch E1A und/oder E4orf6 induziert werden könnten und

durch Sekretion benachbarte B19V-infizierte Zellen zur B19V-Proteinexpression stimulieren könnten, ohne dass diese mit Adenovirus ko-infiziert sein müssten. Solche parakrinen Effekte wurden allerdings für Adenovirusinfektionen bisher noch nicht gezeigt. Um die Ursache für das beobachtete E1A/VP1/2-Expressionsmuster aufklären zu können sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die in dieser Arbeit bisher erzielten Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Endothelzellen im Vergleich zu B19V-permissiven Zellen bestimmte zelluläre Faktoren fehlen, welche für die transkriptionelle und/oder posttranskriptionelle Regulation der B19V-Proteinexpression notwendig sind, und welche durch eine adenovirale Ko-Infektion nur zum Teil komplementiert werden können.

Um den Mechanismus der Adenovirus-induzierten B19V-Proteinexpression besser verstehen zu können, wurde untersucht, ob die adenovirale Helferfunktion in der Induktion der Zweitstrangsynthese und somit in der Überführung des einzelsträngigen B19V-Genoms in die transkriptionskompetente, doppelsträngige Form besteht. Hierzu wurde der isolierte B19V p6-Promotor im Kontext eines einzelsträngigen (monomerischen) und doppelsträngigen (dimerischen) rekombinanten AAV-Vektors (rAAV) vor eine Luciferase-Reportergen-Kassette geschaltet. Das einzelsträngige Genom der monomerischen AAV-Vektoren ist transkriptionsinaktiv und muss für die Transkription in einen Doppelstrang überführt werden. Bei dimerischen AAV-Vektoren handelt es sich um sogenannte selbstkomplementäre (sc) Vektoren, bei denen die Genexpression aufgrund des doppelsträngigen, transkriptionskompetenten Genoms direkt nach der Transduktion erfolgen kann. Im Vergleich zu monomerischen AAVs zeichnen sie sich durch eine schnellere Expressionskinetik und höhere Expressionsraten aus (175).

Die Ergebnisse zeigten mit einer 362- bzw. 476-fachen Adenovirus-induzierten Steigerung der Expressionsrate beim monomerischen bzw. dimerischen rAAV vergleichbare Transaktivierungsraten in den EA.hy926-Zellen (siehe S. 85). Daraus lässt sich schließen, dass eine mögliche Adenovirus-induzierte Zweitstrangsynthese des B19V-Genoms bei der Stimulierung der B19V-Proteinexpression eine untergeordnete Rolle spielt. Wäre die adenovirale Helferfunktion auf eine Induktion der Zweitstrangsynthese zurückzuführen, so wäre die Transaktivierungsrate des dimerischen rAAVs im Vergleich zum monomerischen wesentlich geringer ausgefallen. In den HUVECs ist die Transaktivierungsrate für die monomerischen AAVs mit einer 39-fachen Steigerung der Luciferaseexpression im Vergleich zu den dimerischen AAVs (262-fach) gering ausgefallen. Da die basale Expressionsrate ohne eine adenovirale Ko-Infektion gleich stark wie die der mock-infizierten Zellen ausgefallen ist,

könnte möglicherweise die tatsächliche Transaktivierungsrate höher liegen. Interessanterweise führte eine Adenovirus-Infektion in den semi-permissiven Zellen UT7/Epo-S1 im Gegensatz zu den Endothelzellen zu keiner Transaktivierung des p6-Promotors. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in Endothelzellen durch eine Adenovirus-Infektion bestimmte zelluläre Faktoren moduliert werden, welche die B19V-Proteinexpression unter physiologischen Bedingungen auf erythroide Vorläuferzellen begrenzt.

### **5.2.2 Einfluss der adenoviralen E1A-Proteine auf die B19V-Proteinexpression**

Nachdem eine eindeutige Adenovirus-vermittelte B19V-Kapsidexpression nachgewiesen wurde, war es von großem Interesse zu untersuchen, auf welche adenoviralen Funktionen und auf welchen Mechanismus diese Stimulierung zurückzuführen war. Ein naheliegender Mechanismus für die Adenovirus-bedingte Stimulierung B19V-Proteinexpression stellt die Transaktivierung des p6-Promotors dar. Die transkriptionelle Transaktivierung des isolierten p6-Promotors durch einzelne adenovirale Funktionen in nicht-permissiven Zellen wurde bereits in der humanen nasopharyngealen Zelllinie KB und in HEK 293-Zellen beschrieben (186). In dieser Studie wurde das adenovirale E1A für die Transaktivierung des p6-Promotors nicht nur als notwendig, sondern auch als weitestgehend ausreichend beschrieben. Nach Transfektion von pB19-M20 in HEK 293-Zellen, welche das E1A konstitutiv exprimieren, ließen sich die B19V-Proteine NS1 und VP1/2 nachweisen (siehe S. 82). Vergleichsweise waren in den endothelialen EA.hy926-Zellen keine B19V-Proteine nachweisbar, was eine E1A-vermittelte Transaktivierung des p6-Promotors nahelegte und so die Ergebnisse der Studie bestätigten.

Für die Analyse der transaktivierenden E1A-Proteine und die Identifizierung der für die Transaktivierung essentiellen konservierten E1A-Proteinregionen, wurden in EA.hy926-Zellen Ko-Transfektionsexperimente mit dem isolierten, vor einem Luciferasereporter-geschaltetem p6-Promotor und den E1A-Konstrukten E1A-13s, -12s und -11s durchgeführt. E1A-13s enthielt alle bekannten konservierten Regionen (CR1-4). E1A-12s wies eine Deletion in der CR3 auf und E1A-11s in der CR1. Die Ergebnisse zeigten, dass die CR3 des E1A-Proteins die essentielle Komponente für die Transaktivierung des p6-Promotors darstellt, da sowohl mit E1A-13s als auch mit E1A-11s eine Stimulierung der Promotoraktivität zu beobachten war. (siehe S. 95). Durch frühere Untersuchungen ist bekannt, dass E1A über die

CR3 mit MED23 interagiert, einer Untereinheit des Mediator Komplexes, welcher u.a. für die Wechselwirkung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II mit transaktivierenden Transkriptionsfaktoren benötigt wird (206; 207). Durch die Interaktion von E1A mit MED23 wird somit die Bildung des Präinitiationskomplexes stimuliert, welcher sich aus dem Promotor, den Transkriptionsfaktoren und der DNA-abhängigen Polymerase II zusammensetzt (208).

Im Gegensatz zu CR3 zeigte CR1 keine transaktivierende Wirkung auf den p6-Promotor (siehe S. 95). CR1 kann mit CR2 in Interaktion treten und die Dissoziation des E2F/Rb-Komplexes bewirken (209; 210). Das Retinoblastom-Protein Rb ist ein wichtiger Faktor für die Zellzyklusregulation, u. a. für den G<sub>1</sub>/S-Übergang, und wird durch die Interaktion mit den E2F-Transkriptionsfaktoren inhibiert (211). Die E2F-Transkriptionsfaktoren sind für die Aktivierung zellulärer, proliferationsrelevanter Gene verantwortlich (212). Durch die E1A-vermittelte Dissoziation des inhibitorischen E2F/Rb-Komplexes wird transkriptionsaktives E2F freigesetzt, welches zur Aktivierung verschiedener zellulärer S-Phase Gene führt (210; 213). Um eine direkte Aussage über die Rolle der Adenovirus-vermittelten S-Phase-Induktion für die Transaktivierung des p6-Promotors treffen zu können, müsste man die Untersuchungen um eine CR2-Deletionsmutante erweitern. Da die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch keine Transaktivierung des p6-Promotors mit dem E1A-12s zeigten, welches zwar CR1 und CR2, aber keine CR3 aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass die S-Phase-Induktion bei der Adenovirus-vermittelten Transaktivierung des p6-Promotors keine wesentliche Rolle spielt.

### **5.2.3 Analyse zur Rolle der pHelper-Funktionen in der Transaktivierung des p6-Promotors**

Zusätzlich zur E1A-vermittelten Transaktivierung des p6-Promotors konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben E1A auch die Funktionen des pHelper-Plasmids E2A, E4orf6 und VA RNA transaktivierend auf den p6-Promotor wirken. Der isolierte p6-Promotor zeigte mit den adenoviralen Funktionen E2A, E4orf6 und VA RNA im Vergleich zu E1A eine etwa gleich starke Transaktivierungsrate (siehe S. 89/91). Im Kontext des gesamten B19V-Genoms zeigte sich interessanterweise, dass die adenoviralen Funktionen des pHelper-Plasmids einen deutlich stärkeren Effekt auf die Transaktivierung des p6-Promotors ausübten als E1A allein (siehe S. 97). Im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem isolierten p6-Promotor könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die adenovirale Transaktivierung nicht nur auf der Ebene der

Aktivierung des p6-Promotors stattfindet. Die adenovirale Stimulierung der B19V-Expression könnte zusätzlich post-transkriptionelle Mechanismen wie die Prozessierung der Transkripte oder die Regulation der Translation umfassen. Zusätzlich zu der Transaktivierung des p6-Promotors durch die pHelper-Funktionen zeigte sich in den Endothelzellen ein stark synergistischer Effekt von E1A mit E2A, E4orf6 und VA RNA auf die Transaktivierung des isolierten und des p6-Promotors im Kontext des Gesamtgenoms (siehe S. 89/91 und S. 96). Zum Teil ist dieser synergistische Effekt auf die transaktivierende Wirkung von E1A auf die adenoviralen Promotoren der pHelper-Funktionen zurückzuführen (159).

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass der synergistische Effekt auf die Transaktivierungsrate des p6-Promotors in den primären Endothelzellen der Koronararterie im Vergleich zu den EA.hy926-Zellen um etwa 25-fach höher ausfiel (siehe S. 91). Dies könnte möglicherweise auf Zelltyp-spezifische zelluläre Faktoren oder auf eine erhöhte Expressionsrate von zellulären Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sein.

Mit Hilfe von Expressionsplasmiden zu den einzelnen Funktionen des pHelper-Plasmids E2A, E4 und VA RNA und dem isolierten p6-Promotor konnte gezeigt werden, dass innerhalb der pHelper-Funktionen E4orf6 die entscheidende Rolle bei der Transaktivierung des p6-Promotors zukommt (siehe S. 92). Auch wenn mit E4orf6 nicht die gleiche Transaktivierungsrate im Vergleich zum kompletten pHelper-Plasmid erzielt wurde, so konnte weder mit dem solitären E2A bzw. VA RNA noch mit der Kombination von E2A und VA RNA, eine signifikante Transaktivierung des p6-Promotors beobachtet werden. Die abgeschwächtere Transaktivierung des p6-Promotors durch das solitäre E4orf6 im Vergleich zum pHelper-Plasmid könnte auf den starken CMV-Promotor des E4orf6-Expressionsplasmids zurückzuführen sein. Möglicherweise ist die optimale Stimulierung des p6-Promotors abhängig von der Expressionsstärke des E4orf6-Proteins.

Durch vorangegangene Studien ist bekannt, dass das E4orf6-Protein an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt ist. Durch die Komplexbildung mit dem E1B-55kD-Protein fördert es den Transport der späten adenoviralen mRNAs aus dem Zellkern ins Zytoplasma (161; 174). Dieser Komplex stimuliert auch die Akkumulation der mRNAs und Proteine des pHelper-abhängigen Parvovirus AAV-2 (160). Außerdem kann der E4orf6/E1B-55kD-Komplex mit dem zellulären Cullin5-ElonginB-ElonginC/E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex die Ubiquitinierung und Degradation des Tumor-Suppressor-Proteins p53 und des MRE11-RAD50-NBS1-Komplexes (MRN-Komplex) induzieren. So wird einem Zellzyklusarrest und einer frühen Apoptoseinduktion entgegengewirkt und die DNA-Doppelstrangreparatur

unterbunden (214; 215). In einer kürzlich erschienenen Studie konnte in humanen Nierenzellen gezeigt werden, dass E4orf6 über die Komplexbildung mit dem zellulären Cullin5-ElonginB-ElonginC/E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex die B19V-DNA-Replikation induzieren kann und so zu einer Stimulierung der VP1/2-Expression führt (223). Mit Hilfe der monomeren und dimeren rAAV-Vektoren konnte allerdings in dieser Arbeit die Stimulierung der B19V-Proteinexpression über eine Adenovirus-induzierte Zweitstrangsynthese des B19V-Genoms ausgeschlossen werden (siehe S. 85). Zusätzlich ließen sich durch die Ko-Transfektion von E1B und E4orf6 nur sehr geringe bis gar keine Effekte von E1B auf die Transaktivierung des isolierten p6-Promotors beobachten (siehe S. 89/91 und S. 96). Demnach ist in Endothelzellen die Komplexbildung von E1B und E4orf6 für eine Adenovirus-vermittelte Stimulierung der B19V-Genexpression nicht essentiell. Das lässt auf eine noch nicht beschriebene Funktion von E4orf6, insbesondere im Zusammenwirken mit E1A, in Endothelzellen schließen.

#### **5.2.4 Analyse cis-regulatorischer Domänen des p6-Promotors**

Mit dem Ziel den Einfluss möglicher cis-regulatorischer Domänen in den p6-Promotor-flankierenden Bereichen auf die Adenovirus-vermittelte Transaktivierung analysieren zu können, wurden diverse p6-Promotor-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte generiert (siehe S. 86). Sie wurden hinsichtlich ihrer Basalaktivitäten und der Stimulierung durch Adenovirus bzw. den adenoviralen Funktionen E1A, E1B, und denen des pHelper-Plasmids E2A, E4 und VA RNA, untersucht. Durch den Vergleich der Basalaktivitäten der p6-Promotor-Konstrukte konnte im 5'-flankierenden Bereich des p6-Promotors zwischen Nukleotidposition 185 nt und 231 nt eine potentielle Repressor-Domäne und im 3'-flankierenden Bereich zwischen Nukleotidposition 615 nt und 674 nt eine potentielle Enhancer-Domäne identifiziert werden (siehe S. 88). Eine adenovirale Infektion führte grundsätzlich bei allen Konstrukten zu einer Transaktivierung des p6-Promotors. Der p6-Promotor ohne flankierende Sequenzabschnitte zeigte mit einer 26-fachen Steigerung der Promotoraktivität die stärkste Adenovirus-vermittelte Transaktivierung. Die Adenovirus-vermittelte Transaktivierung fiel bei den restlichen p6-Promotor-Konstrukten Aktivitätssteigerungen von 5,9- bis 8,4-fach in etwa vergleichbar aus. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Adenovirus-vermittelte Transaktivierung des p6-Promotors durch umliegende cis-aktive Sequenzen beeinflusst wird. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die im 5'-Bereich identifizierte Repressor-Domäne nicht nur im Bereich von 185 nt bis 231 nt liegt, sondern sich noch weiter in den

Bereich von 231 nt bis 381 nt erstreckt bzw. dort eine zweite Repressor-Domäne liegt (siehe Konstrukt p6-1-Luc, S. 88). Diese Ergebnisse konnten bei der detaillierten Analyse der Interaktion der adenoviralen Funktionen E1A, E1B und denen des pHelper-Plasmids E2A, E4 und VA RNA mit dem isolierten p6-Promotor bestätigt werden (siehe S. 91). Insbesondere in den primären Endothelzellen der Koronararterie (HCAEC) war der reprimierende Effekt des cis-aktiven Elements im 5'-Bereich vor dem p6-Promotor stark ausgeprägt, ein Effekt, der wahrscheinlich auf die zellspezifische Ausstattung mit Co-Repressoren zurückzuführen ist.

Bei der Analyse der Interaktion der adenoviralen Funktionen E1A, E1B und denen des pHelper-Plasmids E2A, E4 und VA RNA mit dem isolierten p6-Promotor zeigte sich, dass E1B keinen Einfluss auf die Transaktivierung des p6-Promotors hat. Durch E1A und die Proteine des pHelper-Plasmids ließ sich, mit Ausnahme des Konstruktes p6-3-Luc, eine vergleichbar hohe Transaktivierung der Promotorkonstrukte erzielen (siehe S. 91). Der p6-Promotor im Konstrukt p6-3-Luc, welches die komplette potentielle Repressor-Domäne enthielt, aber dem die potentielle Enhancersequenz fehlte, ließ sich durch E1A weder in den EA.hy926-Zellen noch in den HCAEC transaktivieren. Dies kann allerdings nicht auf die fehlende Enhancer-Domäne zurückgeführt werden, da vergleichsweise die Konstrukte p6-Luc und p6-1-Luc, denen die Enhancer-Domäne ebenfalls fehlte, durch E1A eine erhöhte Expressionstärke zeigten. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich im Sequenzbereich von 185 nt bis 231 nt eine cis-aktive Domäne befindet, welche die Transaktivierung des p6-Promotors durch E1A verhindert. Durch die Bindung von Co-Repressoren an die Repressor-Domäne könnte die Bindung von E1A und Transkriptionsfaktoren inhibiert werden, und so die E1A-vermittelte Transaktivierung des p6-Promotors verhindern werden.

Eine bemerkenswerte Beobachtung war die bis zu 25-fach stärkere Transaktivierung der Konstrukte p6-Luc, p6-2-Luc und p6-4-Luc in den primären Endothelzellen der Koronararterie (HCAEC) im Vergleich zu der endothelialen Zelllinie EA.hy926 (siehe S. 91/89). Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Ausstattung der Zellen hinsichtlich ihrer Transkriptionsfaktoren oder Ko-Aktivatorproteine zurückzuführen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse mit den diversen p6-Promotorkonstrukten, dass sich in der 5'-flankierenden Region des p6-Promotors eine potentielle Repressor- und in der 3'-flankierenden Region eine potentielle Enhancer-Domäne befinden. Des Weiteren konnte eindeutig gezeigt werden, dass der isolierte p6-Promotor durch Adenovirus transaktiviert werden kann, und dass die cis-regulatorischen Domänen in den p6-Promotor-flankierenden Regionen die Adenovirus-vermittelte Transaktivierung beeinflussen.

### **5.2.5 Einfluss von NS1 auf die B19V-Promotoraktivität**

Das NS1-Protein stellt bei der B19V-Replikation einen essentiellen Faktor dar. Durch seine ATPase-, Helikase- und Endonukleaseaktivität ist es in der Lage, den während der B19V-Replikation entstehenden Doppelstrang an der trs innerhalb des ori zu spalten (26; 27; 103). Die NS1-Bindungsstelle befindet sich in der trs und besteht aus vier GC-reichen Sequenzen (103). Durch die Wechselwirkung mit den zellulären Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 ist NS1 zudem in der Lage den p6-Promotor zu transaktivieren (23). Die transaktivierende Eigenschaft von NS1 konnte u.a. in einer Studie mit HeLa-Zellen gezeigt werden, in denen das NS1 stabil integriert worden war, und dessen Expression durch einen induzierbaren Promotor kontrolliert werden konnte (216).

Im Gegensatz zu früheren Studien in nicht-permissiven Zellen (216; 217), zeigte sich in dieser Arbeit weder in der permanenten Endothelzelllinie EA.hy926 (siehe S. 89) noch in den endothelialen Primärzellen der Koronararterie (siehe S. 91) eine NS1-induzierte Transaktivierung des p6-Promotors. Es kann ausgeschlossen werden, dass diese Ergebnisse auf einen Defekt im pKex-NS1-Konstrukt zurückzuführen sind (228). Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Ergebnisse wäre, dass die NS1-stimulierte B19V-Replikation eine andere Konzentrationabhängigkeit von NS1 voraussetzt als die beschriebene NS1-vermittelte Transaktivierung des p6-Promotors. Denkbar wäre auch, dass in Endothelzellen nur eine geringe Expression der zellulären Transkriptionsfaktoren wie ATF und c-Rel/NF- $\kappa$ B erfolgt, welche bei der NS1-vermittelten Replikations-unabhängigen Transaktivierung des p6-Promotors eine Rolle spielen (216).

### **5.2.6 Synthese von B19V DNA-Replikationsintermediaten nach Ko-Infektion mit Adenovirus in Endothelzellen**

Die Synthese der VP1/2-Transkripte ist zum einen von der Synthese der prä-mRNA und zum anderen von der Replikation des B19V-Genoms abhängig. In nicht-permissiven Zellen kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der prä-mRNA-Synthese aufgrund einer Polyadenylierung an der proximalen Polyadenylierungsstelle (120) und die Replikation des B19V-Genoms ist vermutlich aufgrund des Fehlens spezifischer zellulärer Faktoren, welche in Anwesenheit von Erythropoetin (Epo) in EPCs oder B19V semi-permissiven Zellen gebildet werden, blockiert (103). Eine geringe Replikationsrate kann bereits zu einer starken Erhöhung der am distalen Ende des B19V-Genoms polyadenylierten VP1/2-Transkripte führen (100).

In einer kürzlich erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass in den für B19V nicht-permissiven HEK 293-Zellen mit Hilfe der adenoviralen Funktionen E1A, E1B, E2A, E4 und VA RNA eine Replikation von B19V erfolgen kann (103). Nachdem sich in dieser Arbeit die beschriebene Adenovirus-unterstützte Replikation von B19V in HEK 293-Zellen nachvollziehen ließ (siehe S. 99/100), wurde die B19V-Replikation in der endothelialen Zelllinie EA.hy926 untersucht. Interessanterweise ließ sich bereits ohne Adenovirus die monomerische replikative Form des B19V-Genoms nachweisen. Durch die adenovirale Helferfunktion ließ sich nicht nur ein geringfügiger Anstieg der monomerischen replikativen Form beobachten, sondern es konnte zusätzlich eine schwache Bande auf Höhe der dimerischen replikativen Form des B19V-Genoms nachgewiesen werden. Bereits durch den geringfügigen Anstieg des monomerischen und das Auftreten der geringen Mengen des dimerischen replikativen B19V-Genoms könnten die Synthese der VP1/2-Transkripte begünstigt und so die B19V-Permissivität von Endothelzellen bewirkt werden. In einer kürzlich erschienenen Publikation, welche auf den hier dargelegten Ergebnissen von B19V-Replikationsintermediaten in Endothelzellen aufbauten, konnte in HEK 293-Zellen gezeigt werden, dass die adenoviralen Funktionen E1A, E1B und E4orf6 für die B19V DNA-Replikation ausreichend sind, und dass die Induktion der B19V-Replikation zu einer Steigerung der VP1/2-Expression führt (223).

In einer vorangegangenen Studie konnte in HEK 293-Zellen mit Hilfe des pHelper-Plasmids die gleiche Anzahl neu-generierter B19V-Partikel nachgewiesen werden wie nach B19V-Infektion der semi-permissiven UT7/Epo-S1-Zellen (103). Trotz der in dieser Arbeit nachgewiesenen starken Adenovirus-vermittelten Transaktivierung des B19V p6-Promotors und der damit einhergehenden Stimulierung der B19V-Proteinsynthese, sowie der Adenovirus-induzierten B19V-Genomreplikation, konnte die Generierung neu-synthetisierter B19V-Partikel in den Endothelzellen nicht nachgewiesen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Endothelzellen *in vivo* unter bestimmten Umständen eine B19V-Replikation und die Synthese neuer B19V-Partikel unterstützen. So gibt es Hinweise auf einen produktiven B19V-Infektionszyklus *in vivo* in Endothelzellen der Placenta. In einer Fallstudie, bei einer transplazentaren B19V-Übertragung und dem anschließenden intrauterinen Tod des Fetus, konnten sowohl die B19V-DNA als auch die B19V-Proteine NS1 und VP1/2 detektiert werden (218).

### **5.2.7 Physiologische Relevanz der adenoviralen Transaktivierung von B19V**

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass durch eine adenovirale Ko-Infektion die B19V-Genexpression in Endothelzellen stark stimuliert und die B19V-Genomreplikation induziert werden kann. Die Induktion der B19V-Genexpression durch die Helferfunktion des Adenovirus oder anderer exogener Faktoren könnte eine wichtige Rolle bei der Aufklärung der B19V-Pathogenese in Assoziation mit der inflammatorischen Kardiomyopathie und der einhergehenden endothelialen Dysfunktion spielen. Die Adenovirus-vermittelte Stimulierung der B19V-Proteinexpression könnte letztlich über die NS1-vermittelte Induktion der Apoptose (28; 226; 227) und der damit einhergehenden Schädigung des Endothels zur endothelialen Dysfunktion im Herzen führen.

Auch wenn die physiologische Relevanz dieser Adenovirus-vermittelten Transaktivierung von B19V in Endothelzellen noch geklärt werden muss, so zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit doch deutlich, dass die B19V-Genexpression und-Replikation durch exogene Faktoren in Endothelzellen induziert werden kann. Dabei muss es sich nicht zwangsläufig um virale Helferfunktionen handeln, sondern auch nicht-virale Faktoren wie z.B. Zytokine, welche eine große Bedeutung bei inter- und intrazellulären Signalaustauschen einnehmen, könnten hierbei eine Rolle spielen.

## **6 Zusammenfassung**

Das Humane Parvovirus B19 (B19V) ist der Erreger der Ringelröteln (*Erythema infectiosum*) und kann die Krankheitsbilder des Hydrops fetalis und der aplastischen Anämie sowie Polyarthritiden verursachen. B19V besitzt einen stark ausgeprägten Zell- und Gewebetropismus, so dass der produktive Infektionszyklus ausschließlich auf erythroide Vorläuferzellen im Knochenmark und in der fetalen Leber beschränkt ist. In den letzten Jahren konnte die B19V-DNA jedoch in einer Reihe von Untersuchungen auch in anderen Organen und Zelltypen wie Synovialfibroblasten, Tonsillen und der Haut, sowie den Endothelzellen der intramyokardialen Arteriolen und postkapillären Venolen im Herzen nachgewiesen werden. Neben der B19V-induzierten akuten Myokarditis ließ sich eine Assoziation der kardialen B19V-Infektion mit dem Krankheitsbild der inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie (DCMi) mit endothelialer Dysfunktion feststellen. In den B19V positiven Proben konnten häufig zusätzlich Nukleinsäuren doppelsträngiger DNA-Viren aus den Familien der Herpes- und Adenoviren detektiert werden. Allerdings konnte in Endothelzellen bisher keine Replikation des B19V-Genoms nachgewiesen werden, so dass von einer latenten B19V Infektion ausgegangen werden muss. Bisher ist noch ungeklärt über welche Aufnahmemechanismen das Virus in diese nicht-permissiven Zellen gelangt, und ob es möglicherweise zu einer Reaktivierung der latenten Infektion, beispielsweise durch virale Ko- bzw. Super-Infektionen kommen kann.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit waren daher die detaillierte Analyse Rezeptor-vermittelter B19V-Aufnahmemechanismen in endothelialen Zellen und eine mögliche Reaktivierung von B19V in Endothelzellen durch Adenoviren oder isolierte frühe adenovirale Faktoren.

Zur Analyse der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von B19V in Endothelzellen wurde erstmalig das Expressionsprofil der B19V-spezifischen Rezeptorproteine P-Antigen,  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine und KU80-Autoantigen auf Endothelzellen charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass P-Antigen und  $\beta_1$ -Integrine auf der Oberfläche aller untersuchten Endothelzellen in ähnlichen Mengen wie auf B19V semi-permissiven UT7/Epo-S1 Zellen nachweisbar waren. KU80 war ähnlich wie in den UT7/EpoS1 jedoch hauptsächlich nukleär und nur in marginalen Mengen auf der Zelloberfläche nachzuweisen. In den nachfolgenden Untersuchungen zur B19V-Aufnahme zeigte sich jedoch, dass die verschiedenen endothelialen Zellen im Vergleich zu den UT7/Epo-S1 Zellen trotz vergleichbarem Besitz der beschriebenen B19V Ko-Rezeptoren eine stark verminderte B19V-Internalisierungsrate aufweisen. Da für die B19V Internalisierung möglicherweise der Aktivierungszustand der  $\beta_1$ -Integrine eine entscheidende

Rolle spielt, wurden diese mit Hilfe von bivalenten Ionen und stabilisierenden Antikörpern aktiviert. Dies führte zu keiner gesteigerten endothelialen B19V-Internalisierung. In weiteren Untersuchungen wurden in den polaren Endothelzellen eventuelle Unterschiede im Internalisierungsprozess nach apikaler oder basaler Applikation der viralen Partikel untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lieferten allerdings keine Hinweise, dass die verminderte B19V-Internalisierung in Endothelzellen auf eine differentielle Expression der Rezeptoren auf den unterschiedlichen Oberflächen der Zellen zurückzuführen war.

Zur Untersuchung einer möglichen Reaktivierung von B19V durch Adenovirus wurde zunächst die B19V-Proteinexpression bei einer adenoviralen Ko-Infektion analysiert. Diese führte in einer kleinen Subpopulation der Endothelzellen zu einer starken Stimulierung der Expression der Kapsidproteine VP1/2 und des Nichtstrukturproteins NS1 von B19V. Zur Analyse der beteiligten Mechanismen wurden rekombinante monomerische und dimerische adeno-assoziierte Virusvektoren (AAV-Vektoren) generiert, welche unter Kontrolle des isolierten B19V p6-Promotors ein Luciferase-Reportergen enthielten. Der Vergleich dieser AAV-Vektoren nach Ko-Infektion von Adenovirus zeigte, dass die Transaktivierung des B19V-Genoms hauptsächlich auf Transkriptionsebene und nicht durch eine Adenovirus-induzierte Zweitstrangsynthese des einzelsträngigen B19V-Genoms erfolgte. Durch die Generierung einer Reihe von p6-Promotor-Luciferase-Reportergen-Konstrukte mit unterschiedlichen Anteilen der cis-aktiven p6 Sequenzen im Plasmidkontext konnte gezeigt werden, welche Bereiche des p6 Promotors für seine transkriptionelle Stimulation erforderlich sind. Überraschenderweise spielte das Nicht-Strukturprotein NS1 von B19V bei der Transaktivierung in Endothelzellen nur eine untergeordnete Rolle.

E1A und E4orf6 wurden mit starken synergistischen Effekten auf den p6-Promotor als die entscheidenden adenoviralen Funktionen für die B19V Transaktivierung identifiziert. Für die Effekte von E1A war dabei die konservierte Region 3 des Proteins essentiell.

Die Bildung von monomerischen B19V-Replikationsintermediaten konnte in den Endothelzellen bereits in Abwesenheit adenoviraler Helferfunktionen nachgewiesen werden. Durch eine Ko-Infektion mit Adenovirus kam es jedoch zur verstärkten Bildung dimerischer B19V Replikationsintermediate.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur endothelialen Rezeptor-vermittelten B19V-Aufnahme deuten auf einen alternativen, von den B19V-Rezeptoren unabhängigen Aufnahmemechanismus wie z.B. die B19V-Internalisierung über B19V-spezifische Antikörper (ADE) oder die Infektion von endothelialen Vorläuferzellen *in vivo* hin. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass Adenovirus sowohl die B19V

Genexpression als auch die Bildung höhermolekularer B19V Replikationsintermediate in endothelialen Zellen induzieren kann.

## 7 Summary

Human Parvovirus B19 (B19V) is the causative agent of erythema infectiosum, hydrops fetalis, aplastic crises and polyarthritides. B19V displays a very narrow cell and tissue tropism with productive infection thought to be restricted exclusively to erythroid progenitor cells in the bone marrow and fetal liver. However, over the last years increasing evidence for the presence of B19V DNA in other cell types and tissues such as synovial fibroblasts, tonsils and skin as well as endothelial cells of the intramyocardial arterioles and postcapillary venules in the heart has been gathered. An association of cardiac B19V infection with inflammatory dilatative cardiomyopathy (DCMi) and coexisting endothelial dysfunction was found. Frequently, the genome of other DNA viruses such as herpes- or adenovirus was also detected in the B19V-DNA positive specimens. So far however, no evidence for replication of the B19V-DNA in non-erythroid cells exists, strongly suggesting a rather latent state of B19V in these cells. Also unknown are the entry mechanisms of B19V in these non-permissive cells and whether possible mechanisms of B19V reactivation, for example by co-infection with other viruses as in the case of the helper-dependent adeno-associated viruses, which belongs also to the *Parvoviridae* family, exist.

The aim of the present study was the elucidation of both the receptor-mediated B19V mechanism of internalization in endothelial cells and putative mechanisms of B19V reactivation by adenovirus.

In the analysis of the receptor-mediated internalization of B19V in endothelial cells, the expression profile of the B19V specific receptor proteins P-Antigen,  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin and KU80-autoantigen was characterized for the first time in these cells. It could be demonstrated that P-Antigen and  $\beta_1$ -Integrin were expressed on the surface of all endothelial cells investigated. In contrast, both in semi-permissive UT7/Epo-S1 and in endothelial cells KU80 was not detected on the cell surface or only in marginal amounts, strongly arguing against a possible role of KU80 as a B19V co-receptor. Analysis of B19V adsorption and internalization in endothelial cells showed a strong limitation caused by the internalization step, despite comparable B19V binding rates of the endothelial cells compared to the B19V semi-permissive UT7/Epo-S1 cells. In order to increase the B19V internalization in endothelial cells it was attempted to activate the potentially inactivated  $\beta_1$ -integrins via divalent ions and stabilizing antibodies. However, the activation of  $\beta_1$ -integrins did not lead to an increased B19V internalization. By comparing the uptake rate between an apical or a basal application of the virus particles to polarized endothelial cells, it could also be excluded that the limited internalization was due to the polarity of the cells. In summary, B19V uptake is strongly

limited at the level of virus internalization, which however cannot be assigned to a reduced surface expression of the known B19V (co-) receptors.

The second major focus of the study was the analysis of a possible reactivation of latent B19V by adenovirus infection or expression of individual adenoviral functions. It could be shown that co-infection of adenovirus with B19V leads to a strong stimulation of the expression of the B19V structural proteins VP1/2 and the non-structural protein NS1 in a small subpopulation of endothelial cells. To investigate the mechanisms involved, recombinant monomeric or dimeric adeno-associated virus vectors (AAV vectors) were generated, which contained a luciferase reporter gene under control of the isolated B19V p6 promoter. Comparison of the adenovirus-mediated up-regulation of luciferase-expression in the two vector systems demonstrated that the transactivation of the B19V genome is mainly effected at the level of transcription and not by an adenovirus-mediated second-strand synthesis of the single-stranded B19V genome. Through various p6 promoter luciferase reporter gene plasmid constructs differing in the included promoter elements, upregulation at the level of transcription was further confirmed and the cis-regulatory regions involved were identified. Unexpectedly, the B19V NS1 protein played only a minor role in the transactivation of the p6 promoter. The analysis of solitary adenovirus proteins showed E1A and E4orf6 to be the central transactivating proteins, which have a synergistic effect on the transactivation of the p6 promoter. The conserved region 3 of the E1A protein turned out to be essential for the transactivating function of E1A. Finally, monomeric B19V replication-intermediates could be detected in endothelial cells already in the absence of additional viruses, whereas the appearance of dimeric replication intermediates was dependent on adenovirus co-infection. The results of the present work regarding the receptor-mediated internalization of B19V in endothelial cells suggest an alternative, B19V receptor-independent mechanism of internalization *in vivo* such as internalization by B19V specific antibodies (ADE) or the B19V infection of endothelial progenitor cells. Furthermore it could be shown for the first time that the low rate of B19V genome expression observed in endothelial cells can be increased markedly by adenovirus co-infection and that specific B19V genome replication intermediates can be induced by adenovirus.

## 8 Literatur

1. Cossart YE. A new particulate antigen present in serum. *Dev. Biol. Stand* 1975;30:444-448.
2. Shneerson JM, Mortimer PP, Vandervelde EM. Febrile illness due to a parvovirus. *Br Med J* 1980 Juni;280(6231):1580.
3. Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davis LR, White JM, Stroud CE, Murtaza L. Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* 1981 März;1(8221):664-665.
4. Anderson MJ, Jones SE, Fisher-Hoch SP, Lewis E, Hall SM, Bartlett CL, Cohen BJ, Mortimer PP, Pereira MS. Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet* 1983 Juni;1(8338):1378.
5. Summers J, Jones SE, Anderson MJ. Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus. *J. Gen. Virol* 1983 Nov;64 (Pt 11):2527-2532.
6. Berns KI, Giraud C. Biology of adeno-associated virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1996;218:1-23.
7. Büchen-Osmond C. Further progress in ICTVdB, a universal virus database. *Arch. Virol* 1997;142(8):1734-1739.
8. Hokynar K, Söderlund-Venermo M, Pesonen M, Ranki A, Kiviluoto O, Partio EK, Hedman K. A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology* 2002 Okt;302(2):224-228.
9. Agbandje M, Kajigaya S, McKenna R, Young NS, Rossmann MG. The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology* 1994 Aug;203(1):106-115.
10. Ozawa K, Young N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J. Virol* 1987 Aug;61(8):2627-2630.
11. Schwarz TF, Serke S, Von Brunn A, Hottenträger B, Huhn D, Deinhardt F, Roggendorf M. Heat stability of parvovirus B19: kinetics of inactivation. *Zentralbl. Bakteriol* 1992 Juli;277(2):219-223.
12. Caillet-Fauquet P, Di Giambattista M, Draps M, Sandras F, Branckaert T, de Launoit Y, Laub R. Continuous-flow UVC irradiation: a new, effective, protein activity-preserving system for inactivating bacteria and viruses, including erythrovirus B19. *J. Virol. Methods* 2004 Juni;118(2):131-139.
13. Pruss A, Kao M, Gohs U, Koscielny J, von Versen R, Pauli G. Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals* 2002 Juni;30(2):125-133.
14. Kaufmann B, Baxa U, Chipman PR, Rossmann MG, Modrow S, Seckler R. Parvovirus

- B19 does not bind to membrane-associated globoside in vitro. *Virology* 2005 Feb;332(1):189-198.
15. Astell CR, Blundell MC. Sequence of the right hand terminal palindrome of the human B19 parvovirus genome has the potential to form a 'stem plus arms' structure. *Nucleic Acids Res* 1989 Juli;17(14):5857.
  16. Deiss V, Tratschin JD, Weitz M, Siegl G. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology* 1990 März;175(1):247-254.
  17. Ozawa K, Ayub J, Hao YS, Kurtzman G, Shimada T, Young N. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J. Virol* 1987 Aug;61(8):2395-2406.
  18. Yoto Y, Qiu J, Pintel DJ. Identification and characterization of two internal cleavage and polyadenylation sites of parvovirus B19 RNA. *J. Virol* 2006 Feb;80(3):1604-1609.
  19. Rosenfeld SJ, Young NS, Alling D, Ayub J, Saxinger C. Subunit interaction in B19 parvovirus empty capsids. *Arch. Virol* 1994;136(1-2):9-18.
  20. Zhi N, Mills IP, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown KE. Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J. Virol* 2006 Juni;80(12):5941-5950.
  21. Ozawa K, Ayub J, Kajigaya S, Shimada T, Young N. The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J. Virol* 1988 Aug;62(8):2884-2889.
  22. Momoeda M, Wong S, Kawase M, Young NS, Kajigaya S. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J. Virol* 1994 Dez;68(12):8443-8446.
  23. Raab U, Bauer B, Gigler A, Beckenlehner K, Wolf H, Modrow S. Cellular transcription factors that interact with p6 promoter elements of parvovirus B19. *J. Gen. Virol* 2001 Juni;82(Pt 6):1473-1480.
  24. Tsay GJ, Zouali M. Unscrambling the role of human parvovirus B19 signaling in systemic autoimmunity. *Biochem. Pharmacol* 2006 Nov;72(11):1453-1459.
  25. Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, Saitoh T, Kaku M, Sasaki T. Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J. Virol* 2002 Juni;76(11):5395-5403.
  26. Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, Niller H, Doyle S, Modrow S. NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology* 2002 Feb;293(1):86-93.
  27. Cotmore SF, Tattersall P. High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin. *J. Virol* 1998 Nov;72(11):8477-8484.

28. Sol N, Le Junter J, Vassias I, Freyssinier JM, Thomas A, Prigent AF, Rudkin BB, Fichelson S, Morinet F. Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J. Virol* 1999 Okt;73(10):8762-8770.
29. Duechting A, Tschöpe C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R, Bock C. Human Parvovirus B19 NS1 Protein Modulates Inflammatory Signaling by Activation of STAT3/PIAS3 in Human Endothelial Cells. *J Virol* 2008 Aug;82(16):7942-7952.
30. Chen Z, Guan W, Cheng F, Chen AY, Qiu J. Molecular characterization of human parvovirus B19 genotypes 2 and 3. *Virology* 2009 Nov;394(2):276-285.
31. Shade RO, Blundell MC, Cotmore SF, Tattersall P, Astell CR. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J. Virol* 1986 Juni;58(3):921-936.
32. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993 Okt;262(5130):114-117.
33. Saikawa T, Anderson S, Momoeda M, Kajigaya S, Young NS. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. *J. Virol* 1993 Juni;67(6):3004-3009.
34. Rosenfeld SJ, Yoshimoto K, Kajigaya S, Anderson S, Young NS, Field A, Warrenner P, Bansal G, Collett MS. Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J. Clin. Invest* 1992 Juni;89(6):2023-2029.
35. Ros C, Gerber M, Kempf C. Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *J. Virol* 2006 Dez;80(24):12017-12024.
36. Lupescu A, Bock C, Lang PA, Aberle S, Kaiser H, Kandolf R, Lang F. Phospholipase A2 activity-dependent stimulation of Ca<sup>2+</sup> entry by human parvovirus B19 capsid protein VP1. *J. Virol* 2006 Nov;80(22):11370-11380.
37. Zádori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Gariépy S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR, Tijssen P. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev. Cell* 2001 Aug;1(2):291-302.
38. Cohen BJ, Brown KE. Laboratory infection with human parvovirus B19. *J. Infect* 1992 Jan;24(1):113-114.
39. Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P, Young NS. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N. Engl. J. Med* 1994 Apr;330(17):1192-1196.
40. Fellous M, Cartron JP, Wiels J, Tursz T. A monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma associated antigen has an anti-Pk red blood cell specificity. *Br. J. Haematol* 1985 Juli;60(3):559-565.

41. von dem Borne AE, Bos MJ, Joustra-Maas N, Tromp JF, van't Veer MB, van Wijngaarden-du Bois R, Tetteroo PA. A murine monoclonal IgM antibody specific for blood group P antigen (globoside). *Br. J. Haematol* 1986 Mai;63(1):35-46.
42. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood* 2003 Dez;102(12):3927-3933.
43. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992 Apr;69(1):11-25.
44. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 1995;11:549-599.
45. Sastry SK, Horwitz AF. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr. Opin. Cell Biol* 1993 Okt;5(5):819-831.
46. Gailit J, Ruoslahti E. Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J. Biol. Chem* 1988 Sep;263(26):12927-12932.
47. Mould AP, Garratt AN, Askari JA, Akiyama SK, Humphries MJ. Regulation of integrin alpha 5 beta 1 function by anti-integrin antibodies and divalent cations. *Biochem. Soc. Trans* 1995 Aug;23(3):395S.
48. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Chen L, Srivastava A. Role of integrin cross-regulation in parvovirus B19 targeting. *Hum. Gene Ther* 2006 Sep;17(9):909-920.
49. Bos JL, de Bruyn K, Enserink J, Kuiperij B, Rangarajan S, Rehmann H, Riedl J, de Rooij J, van Mansfeld F, Zwartkuis F. The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem. Soc. Trans* 2003 Feb;31(Pt 1):83-86.
50. Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, Kinashi T. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell Biol* 2003 Apr;161(2):417-427.
51. Bos JL. Linking Rap to cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol* 2005 Apr;17(2):123-128.
52. Maridonneau-Parini I, de Gunzburg J. Association of rap1 and rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils. Translocation to the plasma membrane during cell activation. *J. Biol. Chem* 1992 März;267(9):6396-6402.
53. M'Rabet L, Coffier P, Zwartkuis F, Franke B, Segal AW, Koenderman L, Bos JL. Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils. *Blood* 1998 Sep;92(6):2133-2140.
54. Bertoni A, Tadokoro S, Eto K, Pampori N, Parise LV, White GC, Shattil SJ. Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin alpha IIb beta 3, and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem* 2002 Juli;277(28):25715-25721.
55. Caron E. Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. *J. Cell.*

- Sci 2003 Feb;116(Pt 3):435-440.
56. Bivona TG, Wiener HH, Ahearn IM, Silletti J, Chiu VK, Philips MR. Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. *J. Cell Biol* 2004 Feb;164(3):461-470.
  57. Dustin ML, Bivona TG, Philips MR. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nat. Immunol* 2004 Apr;5(4):363-372.
  58. Weigel-Van Aken KAK. Pharmacological activation of guanine nucleotide exchange factors for the small GTPase Rap1 recruits high-affinity beta1 integrins as coreceptors for parvovirus B19: improved ex vivo gene transfer to human erythroid progenitor cells. *Hum. Gene Ther* 2009 Dez;20(12):1665-1678.
  59. Suehiro K, Gailit J, Plow EF. Fibrinogen is a ligand for integrin alpha5beta1 on endothelial cells. *J. Biol. Chem* 1997 Feb;272(8):5360-5366.
  60. Dejana E. Endothelium, vessel injury and thrombosis. *Haematologica* 1987 Feb;72(1):89-94.
  61. Dejana E, Languino LR, Polentarutti N, Balconi G, Ryckewaert JJ, Larrieu MJ, Donati MB, Mantovani A, Marguerie G. Interaction between fibrinogen and cultured endothelial cells. Induction of migration and specific binding. *J. Clin. Invest* 1985 Jan;75(1):11-18.
  62. Takai A, Sasaki K, Nagai H, Mieskes G, Isobe M, Isono K, Yasumoto T. Inhibition of specific binding of okadaic acid to protein phosphatase 2A by microcystin-LR, calyculin-A and tautomycin: method of analysis of interactions of tight-binding ligands with target protein. *Biochem. J* 1995 März;306 ( Pt 3):657-665.
  63. Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Kodera T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* 2005 Nov;106(10):3449-3456.
  64. Koike M. Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J. Radiat. Res* 2002 Sep;43(3):223-236.
  65. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 2001 Aug;412(6847):607-614.
  66. Dvir A, Peterson SR, Knuth MW, Lu H, Dynan WS. Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1992 Dez;89(24):11920-11924.
  67. Muñoz P, Zdzienicka MZ, Blanchard JM, Piette J. Hypersensitivity of Ku-deficient cells toward the DNA topoisomerase II inhibitor ICRF-193 suggests a novel role for Ku antigen during the G2 and M phases of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol* 1998 Okt;18(10):5797-5808.
  68. Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, Taneja P, Huang NW, Simoncsits A, Susic S, Rahman K, Marusic L, Chen J. Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified

- as the Ku autoantigen. *EMBO J* 1994 Okt;13(20):4991-5001.
69. Cao QP, Pitt S, Leszyk J, Baril EF. DNA-dependent ATPase from HeLa cells is related to human Ku autoantigen. *Biochemistry* 1994 Juli;33(28):8548-8557.
  70. Bakalkin G, Yakovleva T, Hurd YL, Nussenzweig A, Li GC, Terenius L. Autoantigen Ku in the brain. Developmentally regulated expression and subcellular localization. *Neuroreport* 1998 Juni;9(9):2147-2151.
  71. Prabhakar BS, Allaway GP, Srinivasappa J, Notkins AL. Cell surface expression of the 70-kD component of Ku, a DNA-binding nuclear autoantigen. *J. Clin. Invest* 1990 Okt;86(4):1301-1305.
  72. Dalziel RG, Mendelson SC, Quinn JP. The nuclear autoimmune antigen Ku is also present on the cell surface. *Autoimmunity* 1992;13(4):265-267.
  73. Tai Y, Podar K, Kraeft S, Wang F, Young G, Lin B, Gupta D, Chen LB, Anderson KC. Translocation of Ku86/Ku70 to the multiple myeloma cell membrane: functional implications. *Exp. Hematol* 2002 März;30(3):212-220.
  74. Monferran S, Muller C, Mourey L, Frit P, Salles B. The Membrane-associated form of the DNA repair protein Ku is involved in cell adhesion to fibronectin. *J. Mol. Biol* 2004 März;337(3):503-511.
  75. Grawunder U, Finnie N, Jackson SP, Riwar B, Jessberger R. Expression of DNA-dependent protein kinase holoenzyme upon induction of lymphocyte differentiation and V(D)J recombination. *Eur. J. Biochem* 1996 Nov;241(3):931-940.
  76. Fewell JW, Kuff EL. Intracellular redistribution of Ku immunoreactivity in response to cell-cell contact and growth modulating components in the medium. *J. Cell. Sci* 1996 Juli;109 ( Pt 7):1937-1946.
  77. Teoh G, Urashima M, Greenfield EA, Nguyen KA, Lee JF, Chauhan D, Ogata A, Treon SP, Anderson KC. The 86-kD subunit of Ku autoantigen mediates homotypic and heterotypic adhesion of multiple myeloma cells. *J. Clin. Invest* 1998 März;101(6):1379-1388.
  78. Lynch EM, Moreland RB, Ginis I, Perrine SP, Faller DV. Hypoxia-activated ligand HAL-1/13 is lupus autoantigen Ku80 and mediates lymphoid cell adhesion in vitro. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 2001 Apr;280(4):C897-911.
  79. Vihinen-Ranta M, Suikkanen S, Parrish CR. Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J. Virol* 2004 Juli;78(13):6709-6714.
  80. Cotmore SF, Tattersall P. Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv. Virus Res* 2007;70:183-232.
  81. Harbison CE, Chiorini JA, Parrish CR. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol* 2008 Mai;16(5):208-214.
  82. Basak S, Turner H. Infectious entry pathway for canine parvovirus. *Virology* 1992

- Feb;186(2):368-376.
83. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol* 2000 März;74(6):2777-2785.
  84. Parker JS, Parrish CR. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J. Virol* 2000 Feb;74(4):1919-1930.
  85. Suikkanen S, Antila M, Jaatinen A, Vihinen-Ranta M, Vuento M. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* 2003 Nov;316(2):267-280.
  86. Farr GA, Zhang L, Tattersall P. Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2005 Nov;102(47):17148-17153.
  87. von Landenberg P, Lehmann HW, Modrow S. Human parvovirus B19 infection and antiphospholipid antibodies. *Autoimmun Rev* 2007 Apr;6(5):278-285.
  88. Douvoyiannis M, Litman N, Goldman DL. Neurologic manifestations associated with parvovirus B19 infection. *Clin. Infect. Dis* 2009 Juni;48(12):1713-1723.
  89. Filippone C, Zhi N, Wong S, Lu J, Kajigaya S, Gallinella G, Kakkola L, Söderlund-Venermo M, Young NS, Brown KE. VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. *Virology* 2008 Mai;374(2):444-452.
  90. Pillet S, Annan Z, Fichelson S, Morinet F. Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2). *Virology* 2003 Feb;306(1):25-32.
  91. Straus SE, Sebring ED, Rose JA. Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1976 März;73(3):742-746.
  92. Hauswirth WW, Berns KI. Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* 1977 Mai;78(2):488-499.
  93. Lusby E, Fife KH, Berns KI. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol* 1980 Mai;34(2):402-409.
  94. Brister JR, Muzyczka N. Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J. Virol* 2000 Sep;74(17):7762-7771.
  95. Frickhofen N, Young NS. Polymerase chain reaction for detection of parvovirus B19 in immunodeficient patients with anemia. *Behring Inst. Mitt* 1990 Aug;(85):46-54.
  96. Rioloobos L, Reguera J, Mateu MG, Almendral JM. Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid. *J. Mol. Biol* 2006 März;357(3):1026-1038.

97. Nash K, Chen W, McDonald WF, Zhou X, Muzyczka N. Purification of host cell enzymes involved in adeno-associated virus DNA replication. *J. Virol* 2007 Juni;81(11):5777-5787.
98. Nash K, Chen W, Muzyczka N. Complete in vitro reconstitution of adeno-associated virus DNA replication requires the minichromosome maintenance complex proteins. *J. Virol* 2008 Feb;82(3):1458-1464.
99. Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum. Gene Ther* 2002 Nov;13(16):1935-1943.
100. Guan W, Cheng F, Yoto Y, Kleiboeker S, Wong S, Zhi N, Pintel DJ, Qiu J. Block to the production of full-length B19 virus transcripts by internal polyadenylation is overcome by replication of the viral genome. *J. Virol* 2008 Okt;82(20):9951-9963.
101. Smith DH, Ward P, Linden RM. Comparative characterization of rep proteins from the helper-dependent adeno-associated virus type 2 and the autonomous goose parvovirus. *J. Virol* 1999 Apr;73(4):2930-2937.
102. Musatov S, Roberts J, Pfaff D, Kaplitt M. A cis-Acting Element That Directs Circular Adeno-Associated Virus Replication and Packaging. *J. Virol*. 2002 Dez;76(24):12792-12802.
103. Guan W, Wong S, Zhi N, Qiu J. The genome of human parvovirus b19 can replicate in nonpermissive cells with the help of adenovirus genes and produces infectious virus. *J. Virol* 2009 Sep;83(18):9541-9553.
104. Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, Garbarg-Chenon A. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J. Virol* 2002 Sep;76(18):9124-9134.
105. Norja P, Hokynar K, Aaltonen L, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hübinger AM, Schneider B, Fischer H, Tolba R, Vapalahti O, Vaheri A, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2006 Mai;103(19):7450-7453.
106. Kühl U, Lassner D, Pauschinger M, Gross UM, Seeberg B, Noutsias M, Poller W, Schultheiss H. Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. *J. Med. Virol* 2008 Juli;80(7):1243-1251.
107. Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain J. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol* 2004 Nov;78(22):12169-12178.
108. Sanabani S, Neto WK, Pereira J, Sabino EC. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *J. Clin. Microbiol* 2006 Feb;44(2):604-606.
109. Tsujimura M, Matsushita K, Shiraki H, Sato H, Okochi K, Maeda Y. Human parvovirus B19 infection in blood donors. *Vox Sang* 1995;69(3):206-212.

110. Lambert SB, Kelly HA, Andrews RM, Catton MC, Lynch PA, Leydon JA, Gercovich DK, Hogg GG, Morgan ML, Lester RA. Enhanced measles surveillance during an interepidemic period in Victoria. *Med. J. Aust* 2000 Feb;172(3):114-118.
111. Chorba T, Coccia P, Holman RC, Tattersall P, Anderson LJ, Sudman J, Young NS, Kurczynski E, Saarinen UM, Moir R. The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J. Infect. Dis* 1986 Sep;154(3):383-393.
112. Rice PS, Cohen BJ. A school outbreak of parvovirus B19 infection investigated using salivary antibody assays. *Epidemiol. Infect* 1996 Jun;116(3):331-338.
113. Ozawa K, Kurtzman G, Young N. Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science* 1986 Aug;233(4766):883-886.
114. Srivastava A, Lu L. Replication of B19 parvovirus in highly enriched hematopoietic progenitor cells from normal human bone marrow. *J. Virol* 1988 Aug;62(8):3059-3063.
115. Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M, Siegl G. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J. Med. Virol* 1997 Nov;53(3):229-232.
116. Lundqvist A, Tolfvenstam T, Bostic J, Söderlund M, Broliden K. Clinical and laboratory findings in immunocompetent patients with persistent parvovirus B19 DNA in bone marrow. *Scand. J. Infect. Dis* 1999;31(1):11-16.
117. Nikkari S, Roivainen A, Hannonen P, Möttönen T, Luukkainen R, Yli-Jama T, Toivanen P. Persistence of parvovirus B19 in synovial fluid and bone marrow. *Ann. Rheum. Dis* 1995 Jul;54(7):597-600.
118. Cassinotti P, Siegl G. Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 2000 Nov;19(11):886-887.
119. Lefrère J, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, Lefrère F, Girot R, Allain J, Laperche S. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood* 2005 Okt;106(8):2890-2895.
120. Liu JM, Green SW, Shimada T, Young NS. A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J. Virol* 1992 Aug;66(8):4686-4692.
121. Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. Human Parvovirus B19 Nonstructural (NS1) Protein Induces Apoptosis in Erythroid Lineage Cells. *J Virol* 1998 Apr;72(4):3018-3028.
122. Ozawa K, Kurtzman G, Young N. Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science* 1986 Aug;233(4766):883-886.
123. Srivastava A, Bruno E, Briddell R, Cooper R, Srivastava C, van Besien K, Hoffman R. Parvovirus B19-induced perturbation of human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 1990 Nov;76(10):1997-2004.

124. Gallinella G, Manaresi E, Zuffi E, Venturoli S, Bonsi L, Bagnara GP, Musiani M, Zerbini M. Different patterns of restriction to B19 parvovirus replication in human blast cell lines. *Virology* 2000 Dez;278(2):361-367.
125. Woolf AD, Champion GV, Chishick A, Wise S, Cohen BJ, Klouda PT, Caul O, Dieppe PA. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch. Intern. Med* 1989 Mai;149(5):1153-1156.
126. Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM, Pattison JR, Tyrrell DA. Experimental parvoviral infection in humans. *J. Infect. Dis* 1985 Aug;152(2):257-265.
127. Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA, Eastmond CJ. Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet* 1985 Feb;1(8426):422-425.
128. White DG, Woolf AD, Mortimer PP, Cohen BJ, Blake DR, Bacon PA. Human parvovirus arthropathy. *Lancet* 1985 Feb;1(8426):419-421.
129. Joseph PR. Fifth disease: the frequency of joint involvement in adults. *N Y State J Med* 1986 Nov;86(11):560-563.
130. Bock C, Klingel K, Kandolf R. Human parvovirus B19-associated myocarditis. *N. Engl. J. Med* 2010 Apr;362(13):1248-1249.
131. Klingel K, Sauter M, Bock CT, Szalay G, Schnorr J, Kandolf R. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med. Microbiol. Immunol* 2004 Mai;193(2-3):101-107.
132. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J* 2008 Jan;29(2):270-276.
133. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Aurora P, Christie JD, Kirk R, Dobbels F, Rahmel AO, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010. *J. Heart Lung Transplant* 2010 Okt;29(10):1089-1103.
134. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsfas I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996 März;93(5):841-842.
135. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss H. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005 Feb;111(7):887-893.
136. Kandolf R, Bültmann B, Klingel K, Bock C. [Molecular mechanisms and consequences of cardiac viral infections]. *Pathologe* 2008 Nov;29 Suppl 2:112-117.

137. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur. Heart J* 2008 Sep;29(17):2073-2082.
138. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss H. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005 Feb;111(7):887-893.
139. Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss H. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005 Sep;112(13):1965-1970.
140. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss H, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J. Am. Coll. Cardiol* 2003 Aug;42(3):466-472.
141. Matsumori A, Shimada T, Chapman NM, Tracy SM, Mason JW. Myocarditis and heart failure associated with hepatitis C virus infection. *J. Card. Fail* 2006 Mai;12(4):293-298.
142. Sudano I, Spieker LE, Noll G, Corti R, Weber R, Lüscher TF. Cardiovascular disease in HIV infection. *Am. Heart J* 2006 Juni;151(6):1147-1155.
143. Andréoletti L, Lévêque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P. Viral causes of human myocarditis. *Arch Cardiovasc Dis* 2009 Juli;102(6-7):559-568.
144. Andréoletti L, Ventéo L, Douche-Aourik F, Canas F, Lorin de la Grandmaison G, Jacques J, Moret H, Jovenin N, Mosnier J, Matta M, Duband S, Pluot M, Pozzetto B, Bourlet T. Active Coxsackieviral B infection is associated with disruption of dystrophin in endomyocardial tissue of patients who died suddenly of acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol* 2007 Dez;50(23):2207-2214.
145. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss H. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005 Feb;111(7):887-893.
146. Schönian U, Crombach M, Maser S, Maisch B. Cytomegalovirus-associated heart muscle disease. *Eur. Heart J* 1995 Dez;16 Suppl O:46-49.
147. Bültmann BD, Sotlar K, Klingel K. Parvovirus B19. *N. Engl. J. Med* 2004 Mai;350(19):2006-2007; author reply 2006-2007.
148. Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 2002 Mai;296(5573):1653-1655.
149. Keller TT, Mairuhu ATA, de Kruif MD, Klein SK, Gerdes VEA, ten Cate H, Brandjes DPM, Levi M, van Gorp ECM. Infections and endothelial cells. *Cardiovasc. Res* 2003 Okt;60(1):40-48.
150. Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CPL, Seeberg B,

- Krautwurm L, Poller W, Schultheiss H, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003 Aug;108(8):945-950.
151. Tschöpe C, Bock C, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck P, Pauschinger M, Poller W, Kühl U, Kandolf R, Schultheiss H. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* 2005 Feb;111(7):879-886.
152. Kuethe F, Lindner J, Matschke K, Wenzel JJ, Norja P, Ploetze K, Schaal S, Kamvissi V, Bornstein SR, Schwanebeck U, Modrow S. Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis. *Clin. Infect. Dis* 2009 Dez;49(11):1660-1666.
153. Schenk T, Enders M, Pollak S, Hahn R, Huzly D. High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol* 2009 Jan;47(1):106-110.
154. Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus. *J. Infect. Dis* 2007 Mai;195(9):1345-1352.
155. Eis-Hübinger AM, Reber U, Abdul-Nour T, Glatzel U, Lauschke H, Pütz U. Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. *J. Med. Virol* 2001 Okt;65(2):395-401.
156. Söderlund-Venermo M, Hokynar K, Nieminen J, Rautakorpi H, Hedman K. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. *Pathol. Biol* 2002 Juni;50(5):307-316.
157. Berk AJ, Lee F, Harrison T, Williams J, Sharp PA. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 1979 Aug;17(4):935-944.
158. Chang LS, Shi Y, Shenk T. Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J. Virol* 1989 Aug;63(8):3479-3488.
159. Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1992;158:97-129.
160. Samulski RJ, Shenk T. Adenovirus E1B 55-Mr polypeptide facilitates timely cytoplasmic accumulation of adeno-associated virus mRNAs. *J. Virol* 1988 Jan;62(1):206-210.
161. Leppard KN, Shenk T. The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO J* 1989 Aug;8(8):2329-2336.
162. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol* 1996 Mai;70(5):3227-3234.
163. Grifman M, Chen NN, Gao GP, Cathomen T, Wilson JM, Weitzman MD. Overexpression of cyclin A inhibits augmentation of recombinant adeno-associated virus

- transduction by the adenovirus E4orf6 protein. *J. Virol* 1999 Dez;73(12):10010-10019.
164. Carter BJ, Antoni BA, Klessig DF. Adenovirus containing a deletion of the early region 2A gene allows growth of adeno-associated virus with decreased efficiency. *Virology* 1992 Nov;191(1):473-476.
165. Chang LS, Shenk T. The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J. Virol* 1990 Mai;64(5):2103-2109.
166. Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol* 1967 Juni;26(2):365-369.
167. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 Dez;230(4732):1350-1354.
168. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 1986;51 Pt 1:263-273.
169. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993 Okt;262(5130):114-117.
170. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J. Virol* 2001 Mai;75(9):4110-4116.
171. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1983 Juni;80(12):3734-3737.
172. Du X, Gu M, Weisel JW, Nagaswami C, Bennett JS, Bowditch R, Ginsberg MH. Long range propagation of conformational changes in integrin alpha IIb beta 3. *J. Biol. Chem* 1993 Nov;268(31):23087-23092.
173. Zakrzewska K, Cortivo R, Tonello C, Panfilo S, Abatangelo G, Giuggioli D, Ferri C, Corcioli F, Azzi A. Human parvovirus B19 experimental infection in human fibroblasts and endothelial cells cultures. *Virus Research* 2005 Dez;114(1-2):1-5.
174. Babiss LE, Ginsberg HS, Darnell JE. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell. Biol* 1985 Okt;5(10):2552-2558.
175. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 2001 Aug;8(16):1248-1254.
176. Berk AJ, Lee F, Harrison T, Williams J, Sharp PA. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 1979 Aug;17(4):935-944.

177. Chow LT, Broker TR, Lewis JB. Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. *J. Mol. Biol* 1979 Okt;134(2):265-303.
178. Stephens C, Harlow E. Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kd and 35 kd proteins. *EMBO J* 1987 Juli;6(7):2027-2035.
179. Avvakumov N, Wheeler R, D'Halluin JC, Mymryk JS. Comparative sequence analysis of the largest E1A proteins of human and simian adenoviruses. *J. Virol* 2002 Aug;76(16):7968-7975.
180. Avvakumov N, Kajon A, Hoeben R, Mymryk J. Comprehensive sequence analysis of the E1A proteins of human and simian adenoviruses. *Virology* 2004 Nov;329(2):477-492.
181. Flinterman MB, Mymryk JS, Klanrit P, Yousef AF, Lowe SW, Caldas C, Gäken J, Farzaneh F, Tavassoli M. p400 function is required for the adenovirus E1A-mediated suppression of EGFR and tumour cell killing. *Oncogene* 2007 Okt;26(48):6863-6874.
182. Srivastava A, Lu L. Replication of B19 parvovirus in highly enriched hematopoietic progenitor cells from normal human bone marrow. *J. Virol* 1988 Aug;62(8):3059-3063.
183. Bock CT. Parvovirus B19: a new emerging pathogenic agent of inflammatory cardiomyopathy. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* 2006;(55):83-97.
184. Bültmann BD, Klingel K, Sotlar K, Bock CT, Baba HA, Sauter M, Kandolf R. Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease. *Hum. Pathol* 2003 Jan;34(1):92-95.
185. Lotze U, Egerer R, Glück B, Zell R, Sigusch H, Erhardt C, Heim A, Kandolf R, Bock T, Wutzler P, Figulla H. Low level myocardial parvovirus B19 persistence is a frequent finding in patients with heart disease but unrelated to ongoing myocardial injury. *J. Med. Virol* 2010 Aug;82(8):1449-1457.
186. Ponnazhagan S, Woody MJ, Wang XS, Zhou SZ, Srivastava A. Transcriptional transactivation of parvovirus B19 promoters in nonpermissive human cells by adenovirus type 2. *J. Virol* 1995 Dez;69(12):8096-8101.
187. Wong S, Zhi N, Filippone C, Keyvanfar K, Kajigaya S, Brown KE, Young NS. Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are highly permissive to human parvovirus B19 replication. *J. Virol* 2008 März;82(5):2470-2476.
188. Selinka H, Wolde A, Sauter M, Kandolf R, Klingel K. Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Med. Microbiol. Immunol* 2004 Mai;193(2-3):127-131.
189. HAWKES RA. ENHANCEMENT OF THE INFECTIVITY OF ARBOVIRUSES BY SPECIFIC ANTISERA PRODUCED IN DOMESTIC FOWLS. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1964 Aug;42:465-482.
190. Hawkes RA, Lafferty KJ. The enhancement of virus infectivity by antibody. *Virology* 1967 Okt;33(2):250-261.

191. Ochiai H, Kurokawa M, Hayashi K, Niwayama S. Antibody-mediated growth of influenza A NWS virus in macrophagelike cell line P388D1. *J. Virol* 1988 Jan;62(1):20-26.
192. Ochiai H, Kurokawa M, Matsui S, Yamamoto T, Kuroki Y, Kishimoto C, Shiraki K. Infection enhancement of influenza A NWS virus in primary murine macrophages by anti-hemagglutinin monoclonal antibody. *J. Med. Virol* 1992 März;36(3):217-221.
193. Homsy J, Meyer M, Tateno M, Clarkson S, Levy JA. The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells. *Science* 1989 Juni;244(4910):1357-1360.
194. Robinson WE, Montefiori DC, Mitchell WM. Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Lancet* 1988 Apr;1(8589):790-794.
195. Takeda A, Tuazon CU, Ennis FA. Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry. *Science* 1988 Okt;242(4878):580-583.
196. Kanno H, Wolfenbarger JB, Bloom ME. Aleutian mink disease parvovirus infection of mink macrophages and human macrophage cell line U937: demonstration of antibody-dependent enhancement of infection. *J. Virol* 1993 Dez;67(12):7017-7024.
197. Munakata Y, Kato I, Saito T, Kodera T, Ishii KK, Sasaki T. Human parvovirus B19 infection of monocytic cell line U937 and antibody-dependent enhancement. *Virology* 2006 Feb;345(1):251-257.
198. Bjerke JR, Livden JK, Matre R. Fc gamma-receptors and HLA-DR antigens on endothelial cells in psoriatic skin lesions. *Acta Derm. Venereol* 1988;68(4):306-311.
199. Muro H, Shirasawa H, Maeda M, Nakamura S. Fc receptors of liver sinusoidal endothelium in normal rats and humans. A histologic study with soluble immune complexes. *Gastroenterology* 1987 Nov;93(5):1078-1085.
200. Aarli A, Matre R, Thunold S. IgG Fc receptors on epithelial cells of distal tubuli and on endothelial cells in human kidney. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol* 1991;95(1):64-69.
201. Jensen TS, Matre R. Fc gamma-receptor activity in the developing human placenta. *APMIS* 1995 Juni;103(6):433-438.
202. Danilova TA. [Fc receptors of endothelial cells of cardiac valves: comparison of IgG Fc binding activity of these receptors and of Fc receptors of group A streptococci]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol* 2003 Apr;(2):46-51.
203. Larsen PL, Tibbetts C. Adenovirus E1A gene autorepression: revertants of an E1A promoter mutation encode altered E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1987 Dez;84(23):8185-8189.
204. Smith DH, Kegler DM, Ziff EB. Vector expression of adenovirus type 5 E1a proteins: evidence for E1a autoregulation. *Mol. Cell. Biol* 1985 Okt;5(10):2684-2696.

205. Richardson WD, Westphal H. A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno-associated virus. *Cell* 1981 Nov;27(1 Pt 2):133-141.
206. Boyer TG, Martin ME, Lees E, Ricciardi RP, Berk AJ. Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* 1999 Mai;399(6733):276-279.
207. Wang G, Balamotis MA, Stevens JL, Yamaguchi Y, Handa H, Berk AJ. Mediator requirement for both recruitment and postrecruitment steps in transcription initiation. *Mol. Cell* 2005 März;17(5):683-694.
208. Cantin GT, Stevens JL, Berk AJ. Activation domain-mediator interactions promote transcription preinitiation complex assembly on promoter DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2003 Okt;100(21):12003-12008.
209. Raychaudhuri P, Bagchi S, Devoto SH, Kraus VB, Moran E, Nevins JR. Domains of the adenovirus E1A protein required for oncogenic activity are also required for dissociation of E2F transcription factor complexes. *Genes Dev* 1991 Juli;5(7):1200-1211.
210. Ikeda MA, Nevins JR. Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell. Biol* 1993 Nov;13(11):7029-7035.
211. Adams PD, Kaelin WG. Negative control elements of the cell cycle in human tumors. *Curr. Opin. Cell Biol* 1998 Dez;10(6):791-797.
212. Slansky JE, Farnham PJ. Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1996;208:1-30.
213. Berk AJ. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* 2005 Nov;24(52):7673-7685.
214. Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D, Kaelin WG, Conaway RC, Conaway JW, Branton PE. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* 2001 Dez;15(23):3104-3117.
215. Liu Y, Shevchenko A, Shevchenko A, Berk AJ. Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *J. Virol* 2005 Nov;79(22):14004-14016.
216. Gareus R, Gigler A, Hemauer A, Leruez-Ville M, Morinet F, Wolf H, Modrow S. Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J. Virol* 1998 Jan;72(1):609-616.
217. Doerig C, Hirt B, Antonietti JP, Beard P. Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J. Virol* 1990 Jan;64(1):387-396.
218. Pasquinelli G, Bonvicini F, Foroni L, Salfi N, Gallinella G. Placental endothelial cells can be productively infected by Parvovirus B19. *J. Clin. Virol* 2009 Jan;44(1):33-38.
219. Calvo O, Manley JL. Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes Dev* 2003 Juni;17(11):1321-1327.

220. Fong N, Bentley DL. Capping, splicing, and 3' processing are independently stimulated by RNA polymerase II: different functions for different segments of the CTD. *Genes Dev* 2001 Juli;15(14):1783-1795.
221. Bauer HJ and Monreal G. Herpesviruses provide helper functions for avian adeno-associated parvovirus. *Gen. Virol.* 1986 Jan;67(Pt1):181-185.
222. Becerra S, Rose JP, Hardy M, Baroudy BM, Anderson CW. Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985 Dec;82(23):7919-7923.
223. Winter K, von Kietzell K, Heilbronn R, Pozzuto T, Fechner H, Weger S. Roles of E4orf6 and VA I RNA in Adenovirus-mediated stimulation of Human Parvovirus B19 DNA replication and functional gene expression. *J Virol* 2012 May;86(9):5099-109.
224. Janik JE, Huston MM, Cho K, Rose JA. Efficient synthesis of adenoassociated virus structural proteins requires both adenovirus DNA binding protein and VA I RNA. *Virology* 1989 Feb;168(2):320-9.
225. Fechner H, Wang X, Srour M, Siemetzki U, Seltmann H, Sutter AP, Scherübl H, Zouboulis CC, Schwaab R, Hillen W, Schultheiss HP, Poller W. A novel tetracycline-controlled transactivator-transrepressor system enables external control of oncolytic adenovirus replication. *Gene Ther.* 2003 Sep;10(19):1680-90.
226. Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, Saitoh T, Kaku M, Sasaki T. Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J Virol* 2002; 76:5395–5403.
227. Lupescu A, Geiger C, Zahir N, Aberle S, Lang PA, Kramer S, Wesselborg S, Kandolf R, Föller M, Lang F, Bock CT. Inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Activity by Parvovirus B19 Protein NS1. *Cell Physiol Biochem* 2009;23(1-3):211-20.
228. Pozzuto T, von Kietzell K, Bock T, Schmidt-Lucke C, Poller W, Zobel T, Lassner D, Zeichhardt H, Weger S, Fechner H. Transactivation of human parvovirus B19 gene expression in endothelial cells by adenoviral helper functions. *Virology* 2011 March; 411(1):50-64.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

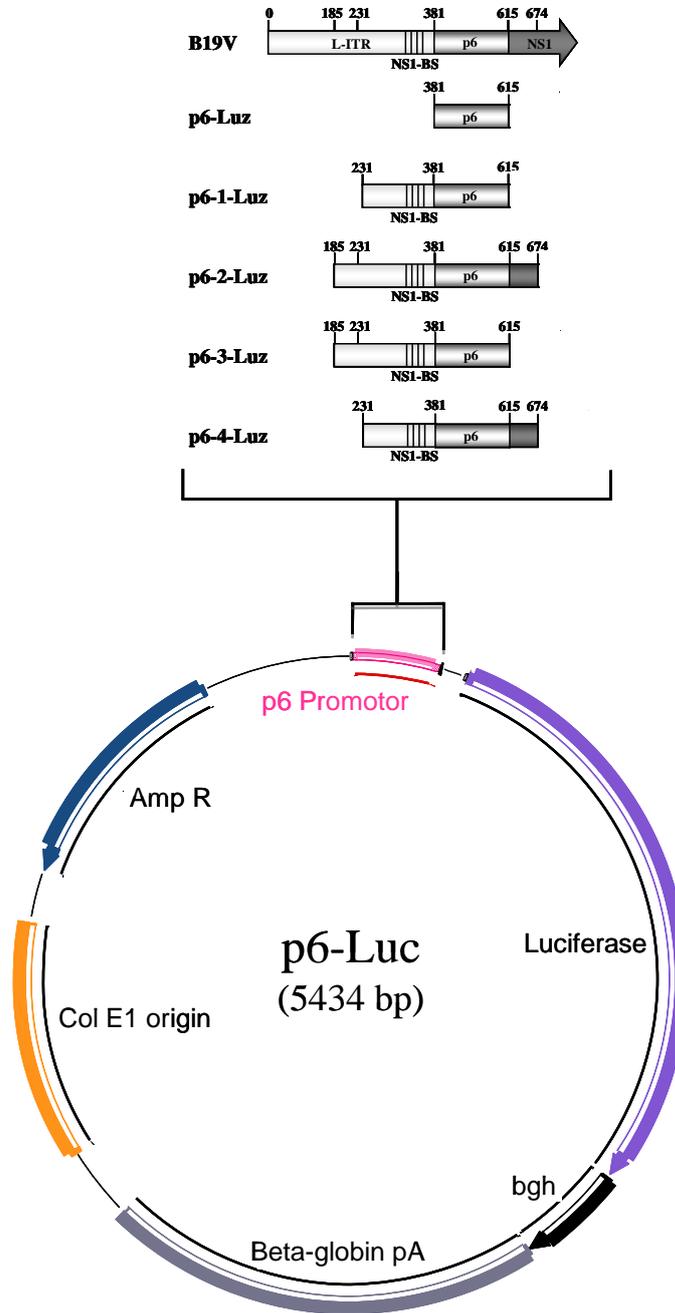
Abb.	Abbildung
ADE	Antibody Dependent Enhancement (Antikörper-vermittelte Verstärkung der Virusinfektion)
Ad2	Adenovirus Serotyp 2
Ad5	Adenovirus Serotyp 5
A. dest.	Aqua destillata
ADV	Virus der Aleutenkrankheit der Nerze (Aleutian disease virus of mink)
B19V	Parvovirus B19
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
ca.	circa
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DCMi	inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinacid
ds	doppelsträngig (double stranded)
EPC	erythroide Vorläuferzelle (erythroid progenitor cell)
et al.	et alii
etc.	et cetera
HAoEC	humane Endothelzellen der Aorta
HCAEC	humane koronare Endothelzellen
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (Human Immunodeficiency Virus)
HPAEC	humane Endothelzellen der Pulmonararterie
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnur
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
ITR	Inverted Terminal Repeat
kD	Kilodalton

---

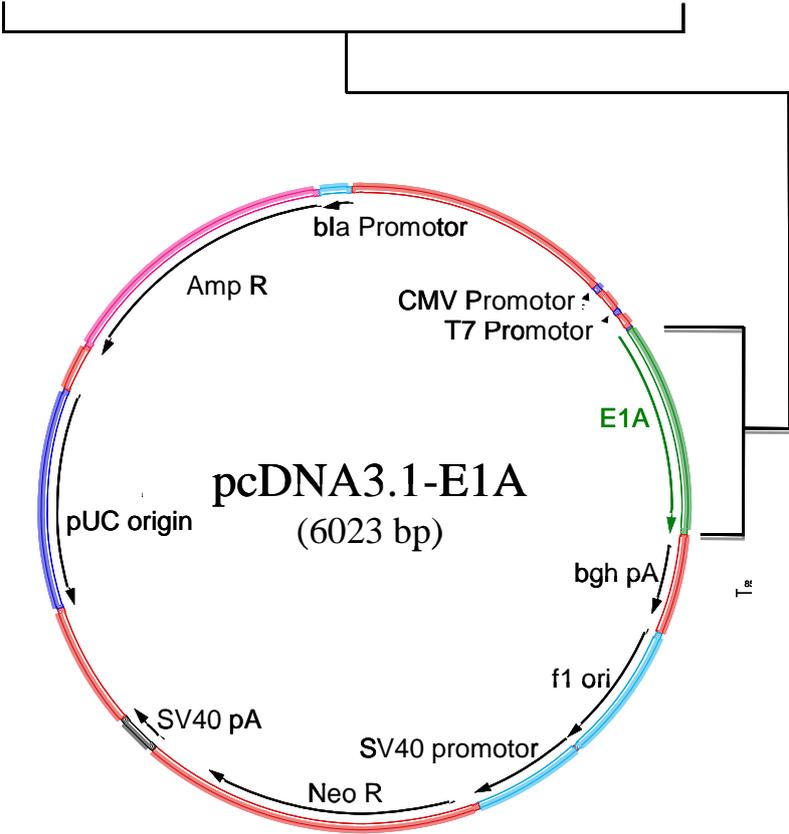
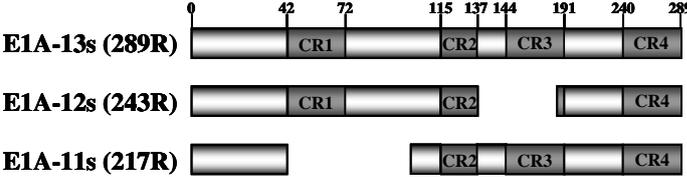
lat.	Latein
MCM-Komplex	minichromosome maintenance complex
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleinacid
NLS	nuclear localisation signal (Kerntransportsignal)
nm	Nanometer
ORF	offener Leserahmen
PCNA	Proliferating cell nuclear-antigen
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase 2
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
p.i.	post infection
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
rAAV	rekombinanter Adeno-assoziiertes-Virusvektor
RCF	Replikationsfaktor C
RNA	ribonukleinacid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.	siehe
shRNA	short hairpin RNA
ss	einzelsträngig (single stranded)
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
trs	terminal resolution site
u. a.	unter anderem
UV-C	Ultraviolett-C
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

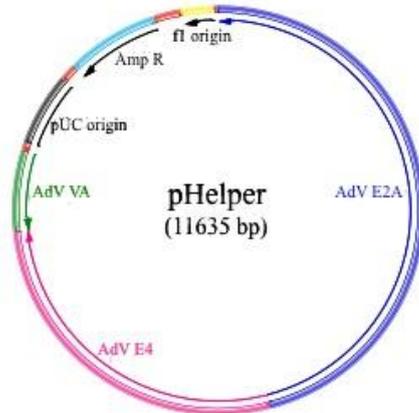
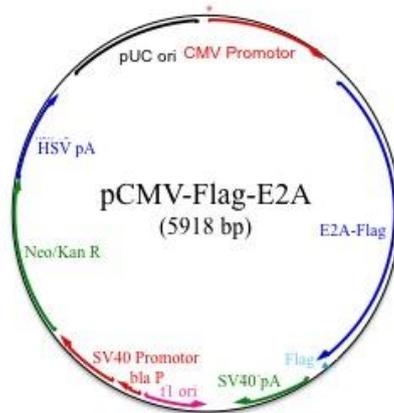
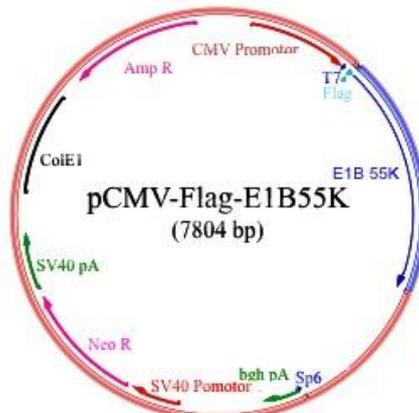
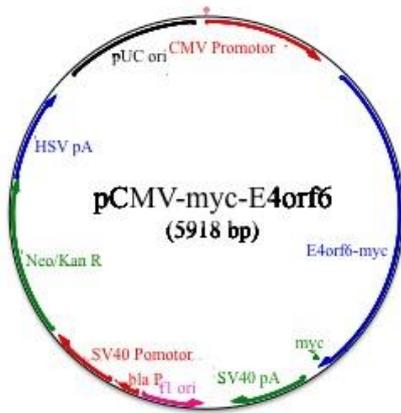
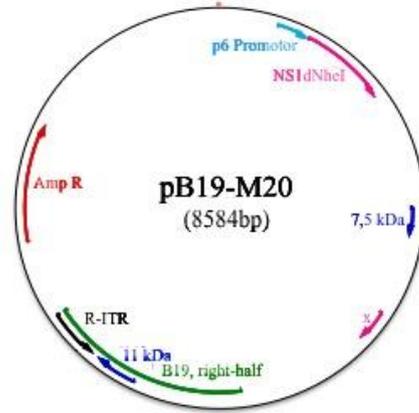
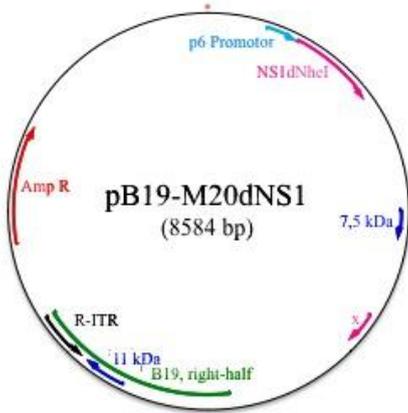
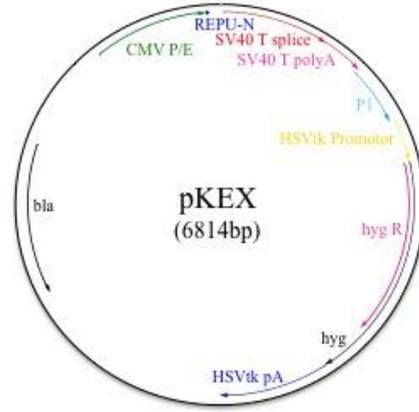
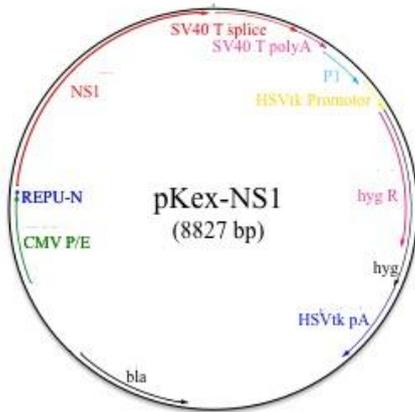
10 Anhang

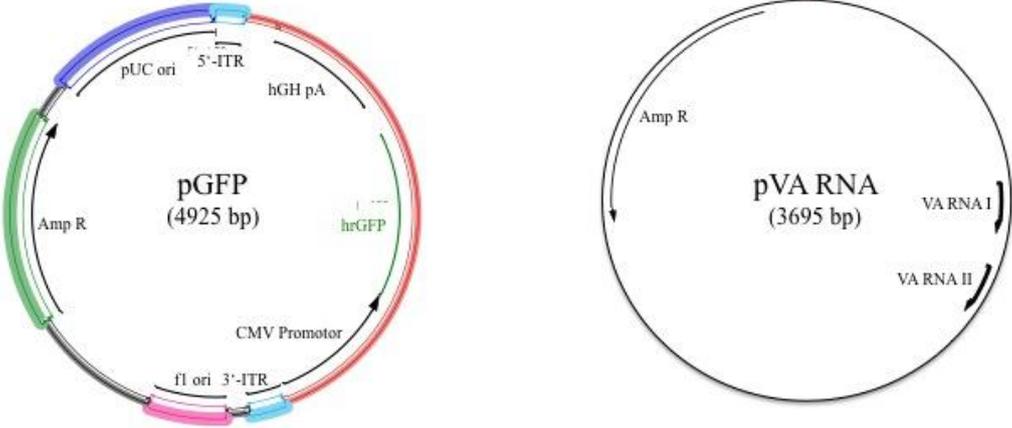
p6-Luciferase-Reportergen-Konstrukte



### E1A-Konstrukte







## **11 Danksagung**

Zunächst möchte ich PD Dr. Stefan Weger für die gutachterliche Tätigkeit, sowie seinem Interesse an meiner Arbeit und seiner Unterstützung danken.

Bei Prof. Dr. Rupert Mutzel möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Im Besonderen danke ich Dr. Henry Fechner dafür, dass er mir dieses Projekt anvertraut hat, und für seine uneingeschränkte Unterstützung und fachliche Beratung bei der Umsetzung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Zeichhardt möchte ich mich für die Bereitstellung der Laborräume zur Durchführung der Infektionsversuche zu Beginn dieser Arbeit bedanken. Dirk Lassner und den Mitarbeitern des IKDTs danke ich für die anfängliche Einführung und Unterstützung bei allen technischen Belangen des B19V-Nachweises.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der AG Fechner, der AG Poller und der AG Heilbronn möchte ich für das nette Arbeitsklima danken. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei Xiaomin Wang, die mir in allen praktischen Belangen des Laboralltags stets zur Seite stand. Zudem möchte ich mich bei Xiaomin Wang, Stefanie Kurz, Anne Bode, Kristina von Kietzell und Thomas Zobel für das freundschaftliche Arbeitsverhältnis und die schöne gemeinsame Zeit bedanken.

Für die Korrektur dieser Arbeit möchte ich besonders Dr. Henry Fechner, sowie Leona Gilke, Christian Engel und Kristina von Kietzell danken.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für deren Unterstützung und Glauben an mich bedanken. Insbesondere danke ich meinem Freund Thomas Brötzmann, der mir gerade in der letzten, zähen Phase stets geduldig und verständnisvoll zur Seite stand. Meinem Sohn Vincent bin ich für die Ablenkung und die schöne und unbeschwerte Zeit in den Schreibpausen sehr dankbar.

## 12 Publikationsliste

Winter K, von Kietzell K, Heilbronn R, **Pozzuto T**, Fechner H, Weger S.: Roles of E4orf6 and VA I RNA in adenovirus-mediated stimulation of human parvovirus B19 DNA replication and structural gene expression. *J Virol*. 2012 May;86(9):5099-109.

**Pozzuto,T.**, von Kietzell, K.\*, Bock, T., Schmidt-Lucke, C., Zobel, T., Lassner, D., Zeichhardt, H., Weger, S., Fechner, H.: Transactivation of Human Parvovirus B19 Gene Expression in Endothelial Cells by Adenoviral Helper Functions. *Virology*. 2011 Mar 1;411(1):50-64.

\* gleichberechtigter Erstautor

Eckstein, A., Größl, T., Geisler, A., Wang, X., Pinkert, S., **Pozzuto, T.**, Schwer, C., Kurreck, J., Weger, S., Vetter, R., Poller, W., Fechner, H.: Inhibition of adenovirus infections by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions. *Antiviral Research*. 2010 Oct;88(1):86-94.

**Pozzuto, T.**, Mueller, B., Meehan, B., Ringler, S., McIntosh, K., Ellis, J., Mankertz, A., Krakowka, S.: In utero transmission of porcine torque teno viruses. *Veterinary Microbiology*. 2009 June;137(3-4):375–379

**Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Berlin, Juli 2012

---

Tanja Pozzuto