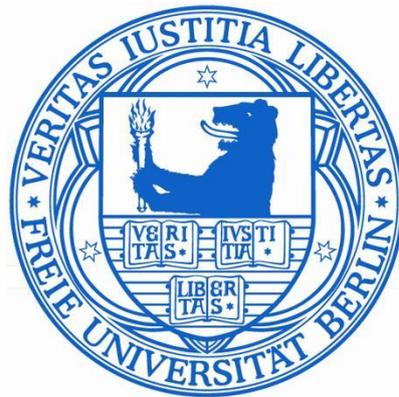


Untersuchungen zu den Aufnahmemechanismen und dem Infektionsverlauf von Parvovirus B19 in endothelialen Zellen



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin Kristina von Kietzell

Berlin, März 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Februar 2014 (inklusive Mutterschutz und Elternzeit von Dezember 2011 bis Januar 2013) unter der Leitung von PD Dr. Stefan Weger am Institut für Virologie, Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin, angefertigt.

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Stefan Weger
Zentrum 5, Institut für Virologie
Charité Universitätsmedizin Berlin
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

Datum der Disputation: 20.06.2014

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Berlin, den

(Kristina von Kietzell)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die „Untersuchungen der Aufnahmemechanismen und des Infektionsverlaufes von Parvovirus B19 in endothelialen Zellen“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Berlin, den

(Kristina von Kietzell)

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Stefan Weger recht herzlich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie die fortwährend freundliche und kompetente Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Regine Heilbronn danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die vielen guten Ratschläge im Rahmen des Arbeitsgruppenseminars.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die Fachbereichsbetreuung, die es mir ermöglichte, diese Doktorarbeit in der Virologie durchzuführen

Bei Dr. Henry Fechner bedanke ich mich für die vielen interessanten und motivierenden Gespräche während der gesamten Doktorarbeit.

Meiner Kollegin Tanja Pozzuto möchte ich ganz besonders danken. Sie hat mich während meiner Arbeit nicht nur durch ihre berufliche Kompetenz und Erfahrung unterstützt, sondern ist im Laufe der Zeit zu einer guten Freundin geworden.

Ich möchte mich bei dem gesamten Team im Labor für die Unterstützung und die vielen Ratschläge sowie den zahlreichen interessanten und nützlichen Gesprächen recht herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Eva Hammer, die mich in der Zeit meiner Schwangerschaft bei meinen Experimenten unterstützt hat.

Meiner Familie danke ich für die jahrelange Unterstützung während und nach meinem Studium. Ihr seid sowohl in guten als auch in schlechten Zeiten für mich da gewesen und habt immer an mich geglaubt. Ohne Euch wäre ich jetzt nicht da wo ich heute bin.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Mann Tobias und meinem Sohn Philipp bedanken. Ihr seid die zwei wichtigsten Menschen in meinem Leben. Ich liebe euch über alles.

1.	EINLEITUNG	8
1.1.	Parvovirus B19 (B19V)	8
1.1.1.	Taxonomie	8
1.1.2.	Morphologie und Genomstruktur	10
1.1.3.	Virusproteine	13
1.1.3.1.	<i>Nichtstrukturproteine</i>	13
1.1.3.2.	<i>Strukturproteine</i>	14
1.1.4.	Klassischer Aufnahmemechanismus	15
1.1.5.	Replikation	17
1.1.6.	Zelltropismus und Permissivität	17
1.1.7.	Epidemiologie und Übertragung	18
1.1.8.	Pathogenese	19
1.1.9.	Krankheitsbilder	20
1.1.10.	Diagnostik, Therapie und Prophylaxe	22
1.1.11.	Parvovirus B19-assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie	23
1.2.	Alternative Aufnahmemechanismen	25
1.3.	Zielsetzung	28
2.	MATERIAL	30
2.1.	Chemikalien	30
2.2.	Enzyme und dazugehörige Puffer	32
2.3.	Medien, Puffer, Lösungen	32
2.3.1.	Medien für Zellkultur	32
2.3.2.	Puffer	33
2.3.3.	Lösungen	36
2.4.	Größenmarker	37
2.5.	Zelllinien	38
2.6.	Viren und Plasmide	38
2.7.	Proben von Probanden für IgG-Aufreinigung	39
2.8.	Antikörper	40
2.8.1.	Monoklonale Antikörper gegen humane Oberflächenmarker	40
2.8.2.	Monoklonale Primärantikörper	40
2.8.3.	Polyklonale Sekundärantikörper	40
2.9.	PCR-Material	40
2.10.	Kommerzielle Kits	41
2.11.	Geräte	42
2.12.	Verbrauchsmaterialien	44
2.13.	Software	45
3.	METHODEN	46
3.1.	Zellbiologische Methoden	46
3.1.1.	Kultivierung von Zellen	46
3.1.2.	Zellzahlbestimmung	47
3.1.3.	Einfrier- und Auftauverfahren von Zellen	47
3.1.4.	Durchflusssytometrie	47

3.2. Immunchemische Methoden	49
3.2.1. B19-IgG-ELISA	49
3.3. Virologische Methoden	49
3.3.1. Aufreinigung des B19V-Stocks aus Patientenplasma	49
3.3.2. Titerbestimmung	50
3.3.3. Infektion von UT7-EpoS1, U937, EA.hy926 und verschiedenen primären Endothelzellen (HCAEC, HAoEC, HPAEC, HDMEC) mit B19V	50
3.3.4. Infektion von UT7-EpoS1, U937, EA.hy926 und verschiedenen primären Endothelzellen (HCAEC, HAoEC, HPAEC, HDMEC) mit B19V und α -B19V-Antikörpern	51
3.4. Proteinbiochemische Methoden	52
3.4.1. IgG-Aufreinigung aus Seren mittels HPLC	52
3.4.2. Messung der Proteinkonzentration der aufgereinigten IgG-Fraktionen.....	52
3.4.3. Zellkernfraktionierung	53
3.4.4. Fab-Fragment-Präparation	54
3.4.5. Proteinextraktion von infizierten Zellen	55
3.4.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
3.4.7. Western-Blot-Analyse	57
3.5. Molekularbiologische Methoden.....	58
3.5.1. DNA-Isolation aus Säugerzellen	58
3.5.2. DNA-Konzentrationsbestimmung.....	59
3.5.3. Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RTq-PCR)	59
3.5.4. RNA-Isolation aus Säugerzellen	62
3.5.5. RNA-Konzentrationsbestimmung.....	63
3.5.6. DNase-Verdau	63
3.5.7. Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion.....	64
3.5.8. Quantitative Real-Time-PCR (RNA-Proben)	65
3.5.9. Southern-Blot-Analyse	66
3.5.9.1. <i>HIRT-DNA-Extraktion</i>	66
3.5.9.2. <i>Kapillar-Blot</i>	67
3.5.9.3. <i>Biotin-(11-dUTP)-Markierung von DNA-Sonden</i>	67
3.5.9.4. <i>Hybridisierung von Southern-Blots</i>	68
3.5.9.5. <i>Detektion Biotin-11-dUTP markierter DNA-Sonden mit Streptavidin- HRP und ECL</i>	68
4. ERGEBNISSE	69
4.1. Klassische Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Parvovirus B19 in Endothelzellen.	69
4.2. Untersuchung der B19V-Aufnahme in verschiedenen Zellsystemen in Gegenwart von gereinigten B19V-Antikörper-positiven IgG-Fraktionen.....	71
4.2.1. B19V-Aufnahme in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von α - B19V-Antikörpern	75
4.2.2. B19V-Adhäsions- und Internalisierungseigenschaften von Endothelzellen nach Infektion in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern.....	77
4.2.3. Aufklärung des genauen Mechanismus der Antikörper-vermittelten B19V- Aufnahme	81

4.2.4.	Fc-Rezeptorexpression auf der Oberfläche von unterschiedlichen Zelllinien	82
4.2.5.	Auswirkung der Blockierung der Fc-Rezeptoren auf die Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme.....	84
4.3.	Weiterer Infektionsverlauf nach Antikörper-vermittelter B19V-Aufnahme in Endothelzellen.....	95
4.3.1.	Transport von B19V-Partikeln in den Nukleus verschiedener Zelllinien	96
4.3.2.	Transkription viraler Gene nach Antikörper-vermittelter B19V-Aufnahme in Endothelzellen.....	99
4.3.3.	Replikation des viralen Genoms nach Antikörper-vermittelter B19V-Infektion in Endothelzellen.....	100
5.	DISKUSSION	105
5.1.	Analyse der B19V-Aufnahme über einen alternativen Antikörper-vermittelten Mechanismus in Endothelzellen.....	106
5.2.	Infektionsverlauf von B19V nach Internalisierung über den alternativen Antikörper-vermittelten Mechanismus.....	111
5.3.	Physiologische Relevanz der über Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahme in endothelialen Zellen	113
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
7.	SUMMARY.....	118
8.	LITERATURVERZEICHNIS	120
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	137
10.	PUBLIKATIONSLISTE	140
11.	LEBENS LAUF	141

1. Einleitung

1.1. Parvovirus B19 (B19V)

Parvovirus B19 (B19V) wurde erstmals 1974 bei der Evaluierung von Tests zum Nachweis von Hepatitis B in Blutkonserven von der australischen Virologin Yvonne Cossart entdeckt [1]. Die Einordnung des Virus in die Gruppe der Parvoviren erfolgte aufgrund seines Erscheinungsbildes im Elektronenmikroskop. Diese Zuordnung bestätigte sich durch die Analyse der extrahierten Virus-DNA. Dabei handelte es sich um eine 5,6 kb lange, einzelsträngige DNA-Sequenz [2]. Erst 1980 ergaben sich Hinweise auf pathogene Eigenschaften des Virus, da man bei zwei Patienten mit einer fieberhaften Erkrankung den Erreger nachweisen konnte [3]. 1983 wurde dann eine direkte Verbindung zwischen der Parvovirus B19-Infektion und dem Krankheitsbild *Erythema infectiosum* hergestellt [4]. Diese Kinderkrankheit ist auch unter der Bezeichnung Ringelröteln oder „*Fifth Disease*“ bekannt und geht mit einem Hautausschlag einher, der sich zunächst auf den Wangen und im weiteren Verlauf auch auf den Innenseiten von Armen und Beinen ausbreitet.

1.1.1. Taxonomie

Parvoviren (parvus = klein) gehören zu den kleinsten bekannten unbehüllten DNA-Viren [5]. Die Familie der *Parvoviridae* gliedert sich in zwei Unterfamilien, die *Parvovirinae* und die *Densovirinae*. Die Unterfamilie *Parvovirinae* setzt sich aus fünf Genera zusammen. Die Dependoviren, zu denen die Adeno-assoziierten Viren (AAV) und viele tierpathogene Viren gehören, können nur dann einen produktiven Infektionszyklus im Wirt einleiten, wenn dieser zusätzlich mit einem Helfervirus (z.B. Herpes- oder Adenoviren) koinfiziert wird. Ist kein Helfervirus vorhanden, etablieren die Adeno-assoziierten Viren eine latente Infektion durch Integration in das Wirtszellgenom [6]. Zur Gattung Parvovirus gehören tierpathogene Erreger, wie z.B. das feline Panleukopenievirus (FPV), das porcine Parvovirus oder das Minute Virus of Mice (MVM), die mitunter bei Nutz- und Haustieren schwere Erkrankungen hervorrufen können. Diese Viren sind im Gegensatz zu AAV nicht in der Lage, in das Wirtsgenom zu integrieren. Zudem benötigen sie keine Helferviren für die Replikation.

Tab. 1.1.: Taxonomische Einordnung der *Parvoviridae* (9th Reports of the *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV); Elsevier 2012)

Unterfamilie	Gattung	Mensch	Tier
Parvovirinae	Parvovirus		Hühner-Parvovirus, Felines Panleukopenie Virus, H-1 Parvovirus, HB Parvovirus, Kilham Rattenvirus, Lapines Parvovirus, LuIII Virus, <i>Minute virus of mice</i> , <i>Mouse parvovirus 1</i> , Porcines Parvovirus, RT Parvovirus, Tumor Virus X
	Bocavirus	Humanes Bocavirus	<i>Canine minute virus</i> , Bovines Bocavirus
	Amdovirus		<i>Aleutian Mink Disease virus</i>
	Erythrovirus	Parvovirus B19 (3 Genotypen)	<i>Pig-tailed macaque parvovirus</i> , <i>Rhesus macaque parvovirus</i> , Affen-Parvovirus, <i>Manchurian chipmunk parvovirus</i>
	?	PARV4 (2 Genotypen), PARV5	?
	Dependovirus	Adeno- assoziierte Viren (AAV1-13)	Vogel Adeno-assoziiertes Virus, Bovines Adeno-assoziiertes Virus, Canines Adeno-assoziiertes Virus, Enten-Parvovirus, Equines Adeno-assoziiertes Virus, Gänse-Parvovirus, Ovines Adeno-assoziiertes Virus
Densovirinae	Densovirus		<i>Galleria mellonella densovirus</i> , <i>Junonia coenia densovirus</i>
	Iteravirus		<i>Bombyx mori</i> Densovirus
	Brevidensovirus		<i>Aedes aegypti</i> Densovirus, <i>Aedes albopictus</i> Densovirus
	Pefudensovirus		<i>Periplaneta fuliginosa</i> densovirus

Als humanpathogene Parvoviren wurden kürzlich die Viren PARV4/5 [7] und Bocavirus [8] identifiziert. Das Internationale Komitee für Virus-Taxonomie (ICTV) ordnete das Bocavirus in eine neue gleichnamige Gattung ein. Bei den Viren PARV4/5 ist noch keine genaue Zuordnung erfolgt.

Das humanpathogene Parvovirus ist das Parvovirus B19 (B19V). Es ist sehr wirtsspezifisch und repliziert nur in erythroiden Vorläuferzellen (EPC). Aus diesem Grund wurde es der eigenständigen Gattung Erythrovirus zugeordnet [9]. Diese Gattung umfasst nur autonome Parvoviren, die kein Helfervirus benötigen und einen ausgeprägten Tropismus für Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen besitzen. Neben B19V als humanpathogenen Vertreter gibt es mehrere tierpathogene Erreger, die vor allem verschiedene Affenarten infizieren.

Zur Gattung der Amdoviren gehört das tierpathogene *Aleutian Mink Disease Virus*, welches in Nerzen eine schwere Glomerulonephritis hervorruft.

Die zweite Unterfamilie der *Parvoviridae*, die *Densovirinae*, ist in vier Genera unterteilt und umfasst die Parvoviren der Invertebraten, darunter viele Insekten.

1.1.2. Morphologie und Genomstruktur

Parvovirus B19-Virionen besitzen ein nicht-umhülltes, ikosaedrisches Kapsid, welches aus 60 einzelnen Kapsomeren zusammengesetzt ist [1]. Diese Kapsomere werden von den zwei Strukturproteinen, VP1 und VP2, gebildet. VP2 hat dabei einen Anteil von 95% an der Kapsidmasse, die restlichen 5% entfallen auf das VP1 [10].

Die Viruskapside haben einen Durchmesser von 18 bis 28 nm mit einem Molekulargewicht von 5500 kDa. Das im Kapsid verpackte einzelsträngige DNA-Genom besitzt eine Länge von 5,6 kb. Durch die geringe Größe der Virionen und das Fehlen einer Lipidhülle ist B19V gegenüber chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen, wie Hitze oder chemischen Detergenzien, extrem resistent [11]. Zur Inaktivierung der Viren kann γ - und UV-C-Strahlung eingesetzt werden [12, 13].

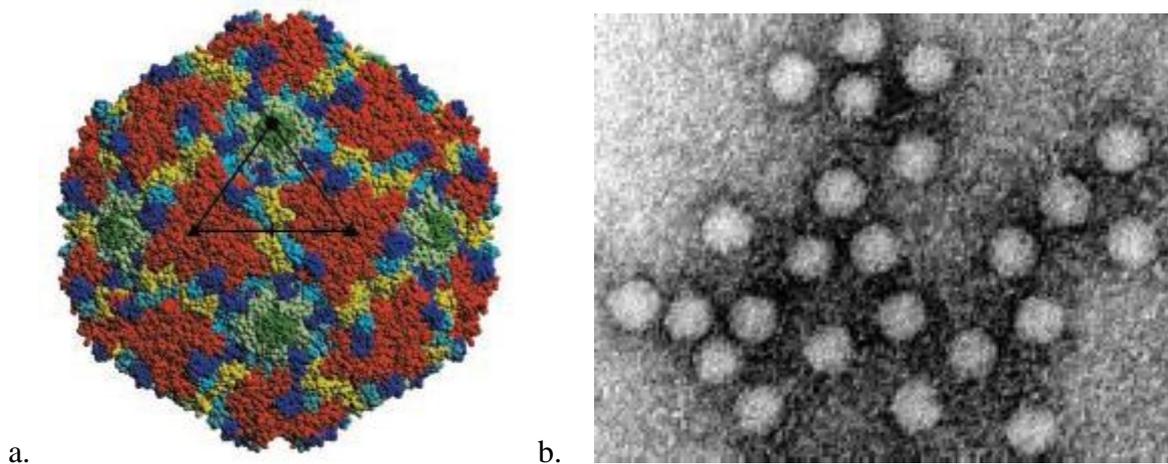


Abb. 1.1 Morphologie von Parvovirus B19. Röntgenkristallographische Aufnahme eines B19V-Kapsids (a.) [14] und elektronenmikroskopische Aufnahme von B19-Virionen (b.) (<http://www.rheuma-online.de>)

Parvovirus B19 besitzt ein einzelsträngiges, lineares DNA-Genom mit einer Länge von 5,6 kb. Das Genom kann sowohl in Plus- als auch in Minus-Strang-Orientierung vorliegen [15]. DNA-Stränge beider Polaritäten werden mit vergleichbarer Häufigkeit in Kapside verpackt. An den 5' und 3'-Enden befinden sich palindromische Sequenzabschnitte, die eine Länge von 383 Basen besitzen und als *inverted terminal repeats* (ITR) bezeichnet werden. Beide ITRs können sich jeweils durch interne Basenpaarungen zurückfalten und dabei eine T-förmige Sekundärstruktur ausbilden. Der durch die Rückfaltung entstandene doppelsträngige Bereich am 3'-OH-Ende dient bei der Replikation des Virusgenoms als Primer [16].

Das Genom besitzt vier offene Leserahmen (ORF). Der linke Bereich des Genoms (3'-OH-Ende beim Negativstrang) kodiert für das Nichtstrukturprotein NS1 sowie ein 7,5-kDa-Protein und der rechte für die Strukturproteine VP1, VP2 und das auch als NS2 bezeichnete 11-kDa-Protein [17]. Das Parvovirus B19-Genom verfügt über einen aktiven Promotor, der aufgrund seiner Position in der linken Hälfte des Genoms als p6-Promotor bezeichnet wird. Er reguliert die Synthese von mindestens 12 überlappenden mRNA-Spezies [17]. Da nur ein Promotor im Genom vorhanden ist, wird die erhöhte Produktion der Strukturproteine im Vergleich zum Nichtstrukturprotein NS1 nicht durch die Stärke des Promotors, sondern durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. So terminieren die ungespleißten Transkripte für das NS1 und die einfach gespleißten Transkripte für das 7,5-kDa-Protein an zwei proximalen Polyadenylierungsstellen (pAp1 und pAp2) in der Mitte des Genoms (Abb.1.2) [18, 19]. Diese weisen eher ungewöhnliche Polyadenylierungssequenzen (ATTAAA und AATAAC) auf. 90% der internen

Polyadenylierungen finden dabei an der pAp1-Stelle an B19V Genomposition 2819, die restlichen 10% an der pAp2-Stelle an Position 3115 statt [20]. Bei den Transkripten, die an der distalen Polyadenylierungsstelle ein Poly(A)-Ende besitzen, wird das erste Intron (3`-Ende des Negativstranges) herausgespleißt (D1 zu A1-1 oder D1 zu A1-2). Das Transkript, welches für das Kapsidprotein VP1 kodiert, unterliegt keinen weiteren Spleißvorgängen. Die mRNAs, die für das Kapsidprotein VP2 und für das 11-kDa-Protein kodieren, werden hingegen ein weiteres Mal zwischen D2 und A2-1 (VP2) sowie zwischen D2 und A2-2 (11-kDa) gespleißt [17].

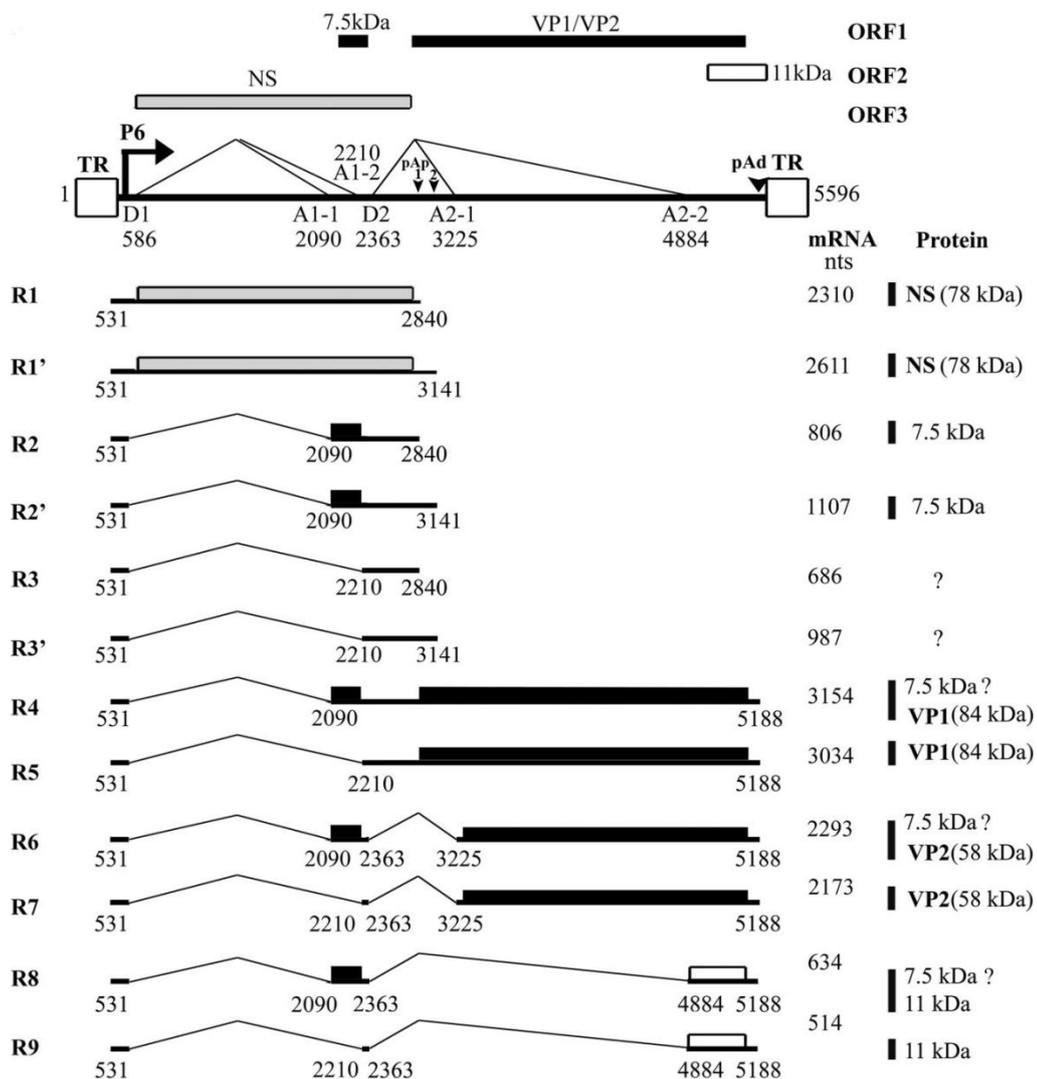


Abb. 1.2 Genomorganisation, Transkription und Translation von Parvovirus B19, Genotyp 1. Dargestellt ist das B19V-Genom des J35-Isolats mit dem p6-Promotor, den Intron Donor- (D1 und D2) und Akzeptorstellen (A1-1, A1-2, A2-1, und A2-2), den internen Polyadenylierungsstellen pAp1 und pAp2, den distalen Polyadenylierungsstellen pAd und den ITRs. Die vier offenen Leserahmen sind oben dargestellt. [17]

1.1.3. Virusproteine

1.1.1.1. Nichtstrukturproteine

Das wichtigste regulatorische Protein von Parvovirus B19 (B19V) ist das Nichtstrukturprotein NS1. Es wird von einer ungespleißten mRNA translatiert, post-translational phosphoryliert und hat ein Molekulargewicht von 77 kDa [19, 21]. Es wird wie andere parvovirale Nichtstrukturproteine in der Frühphase der Infektion synthetisiert, ist praktisch ausschließlich im Zellkern lokalisiert und erfüllt dort eine Reihe von Funktionen [10]. So konnte gezeigt werden, dass das NS1-Protein von zahlreichen tierpathogenen Parvoviren die Transkription viraler Gene, die Genom-Replikation, die Verpackung in Kapside und den Austritt der Virionen aus der Zelle reguliert [22]. Man vermutet, dass auch das NS1 von B19V für eine Vielzahl dieser Prozesse verantwortlich ist.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das NS1 durch die Wechselwirkung mit den zellulären Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 in der Lage ist, den p6 Promotor zu aktivieren [23]. Zudem beeinflusst NS1 zelluläre Promotoren, die immunologisch wichtige Zytokine wie IL-6 und TNF- α kontrollieren [24, 25]. NS1 besitzt desweiteren eine Helikaseaktivität und eine Funktion als Endonuklease wird momentan aufgrund von Sequenzhomologien ebenfalls vermutet [26, 27]. Untersuchungen zu anderer Parvoviren lassen vermuten, dass das B19V-NS1 zusätzlich eine ATPase-Aktivität sowie eine DNA-Bindfunktion besitzt [28, 29].

Die zelltoxische Aktivität des Proteins hängt wahrscheinlich mit der Induktion von Caspasen über den TNF- α -Fas-abhängigen Apoptoseweg zusammen [25, 30]. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass das B19V-NS1-Protein über eine Aktivierung von STAT3/PIAS3 den inflammatorischen Signaltransduktionsweg modulieren kann, was wahrscheinlich persistierende B19V-Infektionen begünstigt [31].

Zusätzlich zum NS1-Protein werden noch mindestens zwei weitere Nichtstrukturproteine synthetisiert. Bei diesen handelt es sich um das 11-kDa-Protein, welches auch als NS2 bezeichnet wird und um das 7,5-kDa-Protein. Die genaue Funktion des NS2-Proteins (11-kDa) ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass es für eine effektive Virusproduktion und den Virustransport aus dem Zellkern infizierter Zellen benötigt wird [32]. Fan et al. konnte 2001 eine Interaktion des 11-kDa-Proteins mit dem Wachstumsfaktor-Rezeptorbindungsprotein 2 (Grb2-Protein) nachweisen [33]. Dadurch

werden vermutlich zahlreiche zelluläre Signalwege beeinflusst. Zudem kann NS2 eine Caspase-10-abhängige Apoptose induzieren [34]. Zur Funktion des 7,5-kDa-Proteins liegen bisher keine Untersuchungen vor.

1.1.1.2. Strukturproteine

Die beiden Strukturproteine VP1 und VP2 werden durch überlappende Leserahmen kodiert und sind daher im carboxyterminalen Bereich identisch [10, 21]. Das VP1-Protein mit einem Molekulargewicht von 84 kDa unterscheidet sich vom VP2 (58 kDa) durch 227 zusätzliche Aminosäuren am aminoterminalen Ende. Dieser zusätzliche Bereich wird als VP1 *unique region* (VP1u) bezeichnet. Bei den VP2-Transkripten wird gegenüber den VP1-Transkripten ein zusätzliches Intron herausgespleißt, welches auch das Startcodon des VP1-Proteins enthält. Somit beginnt die Synthese des VP2-Proteins an einem stromabwärts gelegenen AUG-Triplet, welches sich jedoch im gleichen Leseraster befindet [35]. Beide Proteine sind als Kapsomere in den Virionen vertreten. Die VP1u ist an der Oberfläche des Kapsids exponiert und weist eine Vielzahl von Aminosäuresequenzvariationen in verschiedenen Virusisolaten auf. In dieser Region, aber auch im VP2-Anteil, befinden sich die antigenen Determinanten für die adaptive Immunantwort [36-38].

Als wichtigste Funktion vermittelt das VP2-Protein die Bindung von Parvovirus B19 an den zellulären Rezeptor Blutgruppenantigen P [39, 40]. Zudem konnte am carboxyterminalen Ende des Proteins ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) identifiziert werden, welches für den Transport des Virus in den Nukleus der Wirtszelle entscheidend ist [41].

VP1-Proteine hingegen scheinen die Antigenität von VP2-Proteinen zu beeinflussen. Bei Anwesenheit der VP1-Proteine sind die Epitope auf dem VP2-Protein für Antikörper zugänglicher [42].

Die VP1u besitzt zudem eine Phospholipase-A2-Domäne [43, 44], die für die Freisetzung der Viruspartikel aus den Endosomen wichtig ist.

Desweiteren wurde ein kleiner offener Leserahmen in der VP1-Region entdeckt, der für das sogenannte Protein X oder auch 9,5-kDa-Protein codiert. Welche Rolle dieses Protein im Infektionszyklus von Parvovirus B19 spielt, ist jedoch noch ungeklärt [45].

1.1.4. Klassischer Aufnahmemechanismus

Der Infektionszyklus von Parvovirus B19 beginnt, wie bei allen Viren, mit der Anheftung der Viruspartikel an Oberflächenrezeptoren auf der Zielzelle. Dabei unterscheidet man zwischen den primären Rezeptoren, die für die Virusbindung (*Attachment*) und die Anreicherung der Viren an der Zelloberfläche verantwortlich sind, und den Ko-Rezeptoren, die sich aktiv an der Virusaufnahme beteiligen. Der wichtigste und bekannteste zelluläre *Attachment*-Faktor für B19V ist das Blutgruppen P-Antigen [46]. Es handelt sich hierbei um das Glykosphingolipid Globosid, welches in großen Mengen auf der Oberfläche von Erythrozyten und deren Vorläufern zu finden ist. Es besteht aus einem Zuckeranteil und einem Lipidanteil, der kovalent mit einem Sphingosinrest verknüpft ist. Es konnte gezeigt werden, dass Menschen mit einem Gendefekt in der P-Antigen-Expression eine natürliche B19V-Resistenz besitzen und somit auch keine Antikörper gegen das Virus produzieren [39, 40]. Das P-Antigen wird jedoch zusätzlich auf einer Vielzahl anderer Zellen, wie Megakaryozyten, Thrombozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, exprimiert. In diesen Zellen repliziert B19V nicht. Somit ist der enge Zelltropismus von B19V nicht ausschließlich mit der Verteilung dieses *Attachment*-Faktors zu erklären [47, 48].

Neben dem P-Antigen wurden noch zwei Ko-Rezeptoren, das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin und das Autoantigen Ku80, identifiziert [49-51].

Beim $\alpha_5\beta_1$ -Integrin handelt es sich um ein Zelladhäsionsmolekül, das sich als Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzt. Es wird auf zahlreichen Zellen exprimiert, dazu zählen auch die Endothelzellen, wo es als Rezeptor für Fibrinogen fungiert [52] und dadurch die Zelladhäsion und Migration induziert [53-55]. Für seine Funktion als Ko-Rezeptor bei der B19V-Internalisierung konnte gezeigt werden, dass das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin in einem aktivierten Zustand vorliegen muss [51]. Der Aktivierungszustand des Integrins wird durch eine Konformationsänderung vermittelt. Auch der Ladungszustand des Proteins beeinflusst dessen Aktivität. Zudem können verschiedene Integrine nach der Ligandenbindung miteinander aggregieren und so Signalkomplexe ausbilden. Es konnte dargestellt werden, dass die B19V-Aufnahme in erythroiden Vorläuferzellen durch einen Komplex aus β_1 -, β_2 - und β_3 -Integrinen reguliert wird [56]. Dieser Komplex wird wiederum durch Rap1, eine GTPase der Ras-Superfamilie, aktiviert [57-59]. Somit wurde Rap1 als zentraler Regulator für die $\alpha_5\beta_1$ -Integrin Ko-Rezeptorfunktion bei der B19V-Aufnahme identifiziert [60].

Das Autoantigen Ku80 ist zusammen mit Ku70 ein Bestandteil des heterodimeren Ku-Komplexes.

Es ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, wurde jedoch bei verschiedenen Tumorzellen [61] zusätzlich im Zytoplasma [62] und auf der Zellmembran [63-66] nachgewiesen. Auch auf der Zelloberfläche von erythroiden Vorläuferzellen konnte Ku detektiert werden [49]. Es ist an einer Vielzahl von nukleären Prozessen beteiligt, z.B. an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen [67, 68], der DNA-Transkription und Replikation [67], der Regulation der RNA-Polymerase-II-Aktivität [69] und der Chromatinkondensation während der G2/M-Phase [70]. Zudem besitzt es eine ATP-abhängige Helikase-[71] und eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität [72]. Es ist jedoch auch bekannt, dass Ku an Zell-Zellinteraktionen beteiligt ist [66, 73, 74] und dass das isolierte Ku80 als Adhäsionsmolekül für Fibronectin und Kollagen Typ IV fungiert [64, 74]. Munakata et al. konnte eine mögliche Funktion von Ku80 bei der B19V-Aufnahme nachweisen [49]. Sie zeigten, dass HeLa-Zellen, die für B19V nicht permissiv sind, aber das P-Antigen und $\alpha_5\beta_1$ -Integrin auf der Oberfläche exprimieren, durch die Expression von rekombinanten Ku80 für eine B19V-Infektion empfänglich wurden. Desweiteren wurde die B19V-Aufnahme in B19V-permissiven Ku812Epo6-Zellen durch Repression von Ku80 inhibiert [49].

Aufgrund des starken Zelltropismus für erythroide Vorläuferzellen und des daraus resultierenden Mangels an geeigneten Zellkultursystemen konnte der genaue Mechanismus der B19V-Aufnahme bisher nicht vollständig geklärt werden. Die gut beschriebenen Internalisierungsprozesse von verschiedenen tierpathogenen Parvoviren (canines Parvovirus, *Minute virus of mice*, porcines Parvovirus) geben jedoch indirekt Hinweise auf den Mechanismus der B19V-Infektion [75-77]. Diese Viren werden über eine Klathrin- und Dynamin-vermittelte Endozytose aufgenommen [78-80], B19V gelangt ebenfalls über Endozytose in die Zelle. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von erythroiden Vorläuferzellen konnten in Endosomen eingeschlossene B19V-Partikel nachgewiesen werden [81]. In den tierpathogenen Parvoviren konnte gezeigt werden, dass der niedrige pH-Wert in den Endosomen eine Konformationsänderung der Kapsidproteine bewirkt, was zu einer Freilegung der VP1 *unique region* führt. Deren Phospholipase A2-Domäne katalysiert die Hydrolyse von Phospholipiden und spaltet somit die Membran der Endosomen auf. Die Viruspartikel werden ins Zytoplasma entlassen [44, 82, 83]. B19V besitzt ebenfalls eine PLA2-Domäne in der *unique region* des VP1, die für die Freisetzung der Viren ins Zytoplasma und den weiteren Transport in den Nukleus der Zielzelle erforderlich ist [84].

In den tierpathogenen Parvoviren wird der Transport der Partikel in den Kern über die Bindung der Kerntransportsignal (NLS)-Sequenzen an das zelluläre Protein Importin vermittelt [77]. Für den zytoplasmatischen Transport von B19V ist das zelluläre Rap1 über die Regulation der β_1 -Integrine entscheidend [60]. Zudem konnte auch bei B19V am C-Terminus des VP2-Proteins eine NLS-Sequenz identifiziert werden [41].

1.1.5. Replikation

Da B19V für keine eigene DNA-Polymerase kodiert, kann es, wie die meisten Parvoviren, nur in proliferierenden bzw. sich in der S-Phase befindenden Zellen replizieren. Insbesondere für die helferabhängigen Adeno-assoziierten Viren wurden zahlreiche zelluläre Faktoren, wie der Replikationsfaktor C (RCF), der Prozessivitätsfaktor PCNA (Proliferating cell nuclear-antigen), die Polymerase δ und der MCM-Komplex (minichromosome maintenance complex), beschrieben, die für die Replikation essentiell sind [85-87]. Auch die Transkription der parvoviralen Gene unterliegt der zellulären Transkriptionsmaschinerie. Es wurde beobachtet, dass das NS1-Protein von B19V frühzeitig in der Zelle synthetisiert wird und durch die Bindung an den viralen p6-Promotor die Replikation und Expression der VP-Proteine initiiert [88, 89]. Nach der Replikation wird die ssDNA (single strand DNA) in die neugebildeten Kapside verpackt und durch die Lyse der Wirtszelle freigesetzt.

1.1.6. Zelltropismus und Permissivität

Ein Hauptgrund für den engen B19V-Zelltropismus ist die Ausstattung der Zelloberfläche mit den drei oben beschriebenen Rezeptoren. Jedoch ist das nicht die alleinige Ursache, da B19V viele verschiedene Zelltypen (Megakaryozyten, Thrombozyten, Erythrozyten) infizieren kann, es aber ausschließlich in erythroiden Vorläuferzellen und fetalen Hepatozyten zu einer deutlichen Genom-Replikation kommt [90, 91]. Man konnte nachweisen, dass die zellspezifische Replikation von B19V eng mit dem Erythropoietin (EPO)/EPO-Rezeptor-Signaltransduktionsweg verbunden ist [92]. Sowohl die EPO-Konzentration als auch das Vorhandensein des EPO-Rezeptors ist für die Aufrechterhaltung der B19V-Replikation entscheidend [93, 94].

Ein weiterer wichtiger Grund für die Permissivität von B19V ist die unterschiedliche Synthese der viralen Proteine. Während in permissiven Zellen die Expression der Kapsidproteine und die anschließende Bildung von Viruspartikeln im Vordergrund steht, was eine produktive, lytische Infektion zur Folge hat [18], findet in nicht-permissiven Zellen eine bevorzugte Bildung der NS1-kodierenden Transkripte statt. Durch die verstärkte Produktion des zytotoxischen NS1-Proteins kommt es zu einem Absterben der Zelle ohne Virusvermehrung. Dieser Prozess wird durch verschiedene Faktoren, wie das alternative Spleißen, die Verwendung der proximalen Polyadenylierungsstellen [17, 20], die Blockierung der Anheftung der VP-Transkripte an die Ribosomen [95] sowie die Funktion des 11-kDa-Proteins [32], beeinflusst.

Die B19V-Infektion kann nicht nur lytisch, sondern auch latent verlaufen. Während der latenten Phase integrieren viele DNA-Viren in das Wirtsgenom oder bilden episomale Minichromosomen aus. Diese Stilllegungsfunktion ist oft mit einer CpG-Methylierung der viralen DNA verbunden [96]. Auch bei B19V gibt es erste Hinweise auf epigenetische Modifikationen, welche die Expression der viralen Gene und somit den Verlauf der Viruspersistenz beeinflussen [97].

1.1.7. Epidemiologie und Übertragung

Parvovirus B19 ist weltweit verbreitet. Bislang wurden drei verschiedene B19V-Genotypen identifiziert. Der Genotyp 1 besitzt eine 89%ige Homologie zu Genotyp 2 und unterscheidet sich zu 12% von Genotyp 3. Die Seroprävalenz des B19V-Genotyps 2 ist bei älteren Personen (≥ 60 Jahre) höher, während der Genotyp 1 bei jüngeren Menschen (≤ 45 Jahre) vorherrschend ist [98, 99]. Dabei sind die drei Genotypen regional unterschiedlich verteilt. Während der Genotyp 1 verstärkt in Mittel- und Südeuropa, Asien und Amerika auftritt und für den Hauptteil aller Infektionen verantwortlich ist, findet man den Genotyp 2 und 3 nur vereinzelt [100]. Da man Typ 2 im Norden von Europa nur in Gewebeproben von älteren Patienten gefunden hat, geht man davon aus, dass es sich hierbei um die ursprünglichste Form des Virus handelt [101]. Genotyp 3 wurde in Patienten aus Frankreich und Brasilien sowie in Blutproben aus Ghana nachgewiesen. Man nimmt an, dass dieser Genotyp endemisch auftritt [100, 102, 103]. In den letzten Jahren ist der Genotyp 3 jedoch auch in Nordamerika aufgetaucht [104], während in Südafrika vom Erscheinen aller drei Genotypen berichtet wurde [105].

In der akuten Phase der B19V-Infektion findet man große Mengen an Viruspartikeln mit 10^{11} bis 10^{14} Genomäquivalenten pro ml Blut. Das Virus befindet sich in dieser Phase auch vermehrt im Speichel und kann durch Tröpfcheninfektion übertragen werden. Weitere Übertragungswege sind kontaminiertes Blut oder Blutprodukte [106-108]. Mit der Bildung spezifischer Antikörper sinkt auch die Viruslast in Blut und Speichel. Jedoch kommt es in 20% der Fälle zur Ausbildung einer chronisch-persistierenden Infektion. Bei Patienten mit einer chronischen Infektion können über einen sehr langen Zeitraum Virusmengen von 10^3 bis 10^7 Genomäquivalenten pro ml Blut nachgewiesen werden.

Kommt es zu einer Infektion während der Schwangerschaft, so kann das Virus diaplazentar auf den Fetus übertragen werden und schwere Schäden verursachen.

1.1.8. Pathogenese

Das Virus wird über die Schleimhäute des Mund- und Rachenraumes aufgenommen. Welche Zellen direkt daran beteiligt sind, ist bisher noch nicht bekannt. Auf welchem Weg das Virus anschließend im Körper zu den Zielzellen, 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, gelangt, ist ebenfalls ungeklärt [91, 109]. Nachdem sich das Virus in den Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen vermehrt hat, befinden sich bis zu 10^{13} Viruspartikel pro ml im peripheren Blut. Diese virämische Phase wird durch die Bildung von neutralisierenden Antikörpern sowie durch die virusbedingte Eliminierung der Zielzellen eingedämmt. Kurzzeitig kann sich bei den Patienten eine Anämie einstellen. Liegen genetische Störungen in der Blutbildung vor, kann es zu einer aplastischen Krise kommen (Abb.1.3).

Das Exanthem tritt gewöhnlich mit Bildung der spezifischen Antikörper auf. Eine genaue Ursache für den Hautausschlag ist bisher nicht bekannt. Man vermutet jedoch, dass die Bildung von Immunkomplexen daran beteiligt ist. Aber auch die Infektion von Endothelzellen ist eine mögliche Hypothese.

Bei immunsuppremierten Patienten konnten chronisch-persistierende Infektionsverläufe im Knochenmark beobachtet werden. Diese können von Symptomen begleitet sein oder asymptomatisch verlaufen [110-112]. Noch Jahre nach der Primärinfektion ist ein Virustiternachweis im Blut möglich [113, 114]. Der genaue Mechanismus einer solchen chronisch-persistierenden Infektion ist bisher nicht bekannt.

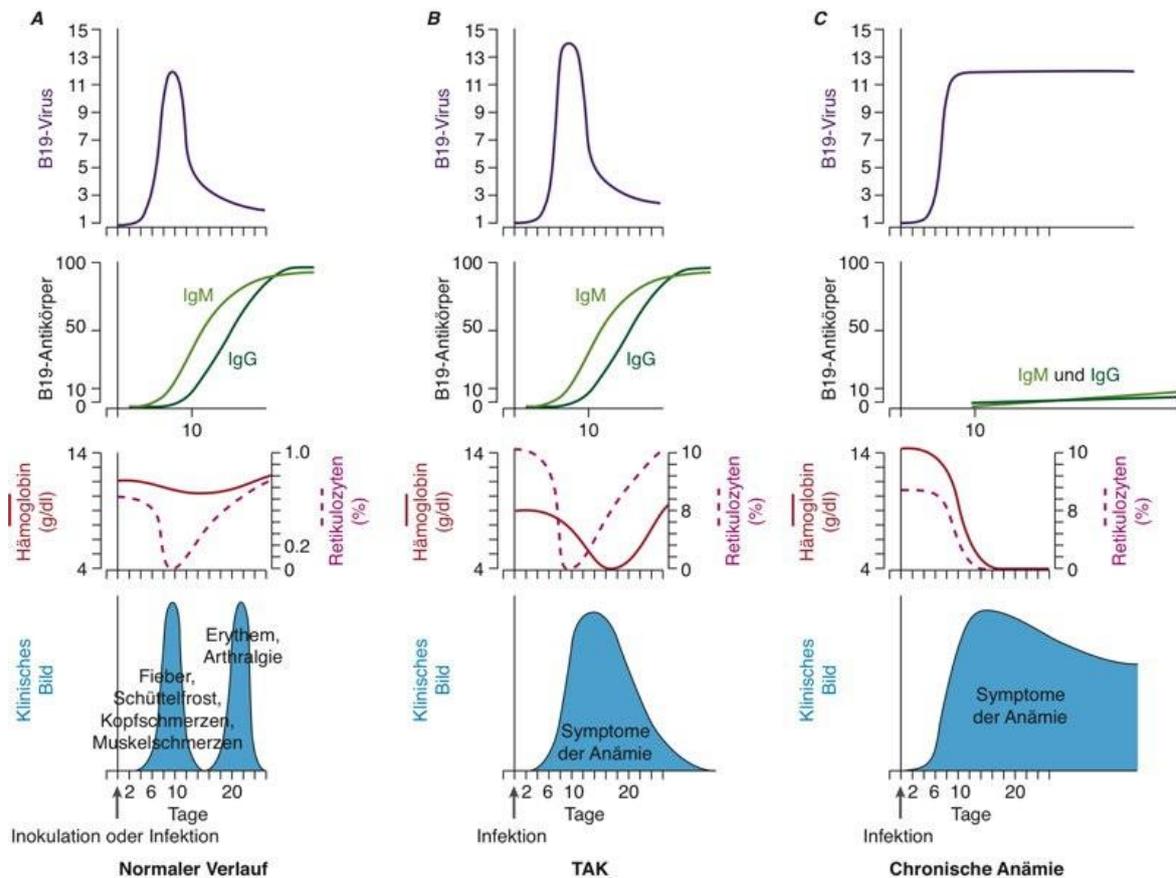


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Verlaufs von Parvovirus B19-Infektionen. A. Normale Verlaufsform (*Erythema infectiosum*). B. Transiente aplastische Krise (TAK). C. Chronische Anämie/isolierte aplastische Anämie (*Pure Red-Cell Aplasia*) [115].

1.1.9. Krankheitsbilder

Die Inkubationszeit der Parvovirus B19-Infektion beträgt durchschnittlich ein bis zwei Wochen. In dieser Zeit ist der Patient virämisch und kann das Virus durch Tröpfcheninfektion übertragen [116]. Nach einer Studie von Woolf et al. verläuft die Infektion bei 25% der Betroffenen asymptomatisch [117]. Das häufigste Erkrankungsbild von B19V ist das *Erythema infectiosum*, auch Ringelröteln oder „fifth disease“ genannt [118]. Die zumeist im Kindesalter auftretende Erkrankung geht mit grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit einher. Der charakteristische Hautausschlag, der im Gesicht beginnt und sich dann auf Arme und Beine ausbreitet, tritt etwa 13 Tage nach der Infektion auf.

1985 wurden erstmals Gelenksbeschwerden, sogenannte Arthropathien, mit einer B19V-Infektion in Verbindung gebracht [119, 120]. Bei Kindern findet man dieses

Erkrankungsbild in ungefähr 10% aller Fälle [121]. Im Erwachsenenalter sind Arthritiden und Arthralgien die Hauptmanifestationen einer B19V-Infektion [117, 118, 122].

Während einer B19V-Infektion kommt es für gewöhnlich zu einer Anämie. Besitzen die Patienten zusätzlich ein gestörtes Blutbildungssystem, wie z.B. bei Thalassämien, Sphärozytosen oder Sichelzellanämien, kann es zu schweren aplastischen Krisen kommen [123, 124].

Ein weiteres mögliches Erscheinungsbild der B19V-Infektion stellen Erythroblastopenien dar. Sie treten vor allem bei Patienten auf, die keine neutralisierenden Antikörper bilden können [125]. Darunter fallen Personen mit chronischer myeloider Leukämie, Burkitt's Lymphom oder Transplantationspatienten [126, 127].

Sehr schwere Folgen kann B19V in der Schwangerschaft haben. Insbesondere bei einer Infektion in den ersten 20 Wochen der Schwangerschaft kommt es häufig zu fetaler Anämie, *Hydrops fetalis* oder spontanen Aborten [128-132]. Statistisch enden etwa 3000 Schwangerschaften pro Jahr in Europa durch B19V-bedingte Komplikationen mit dem Tod des Fetus [133]. Das durchschnittliche Risiko eines *Hydrops fetalis* bei einer akuten B19V-Infektion liegt bei etwa 4% [129].

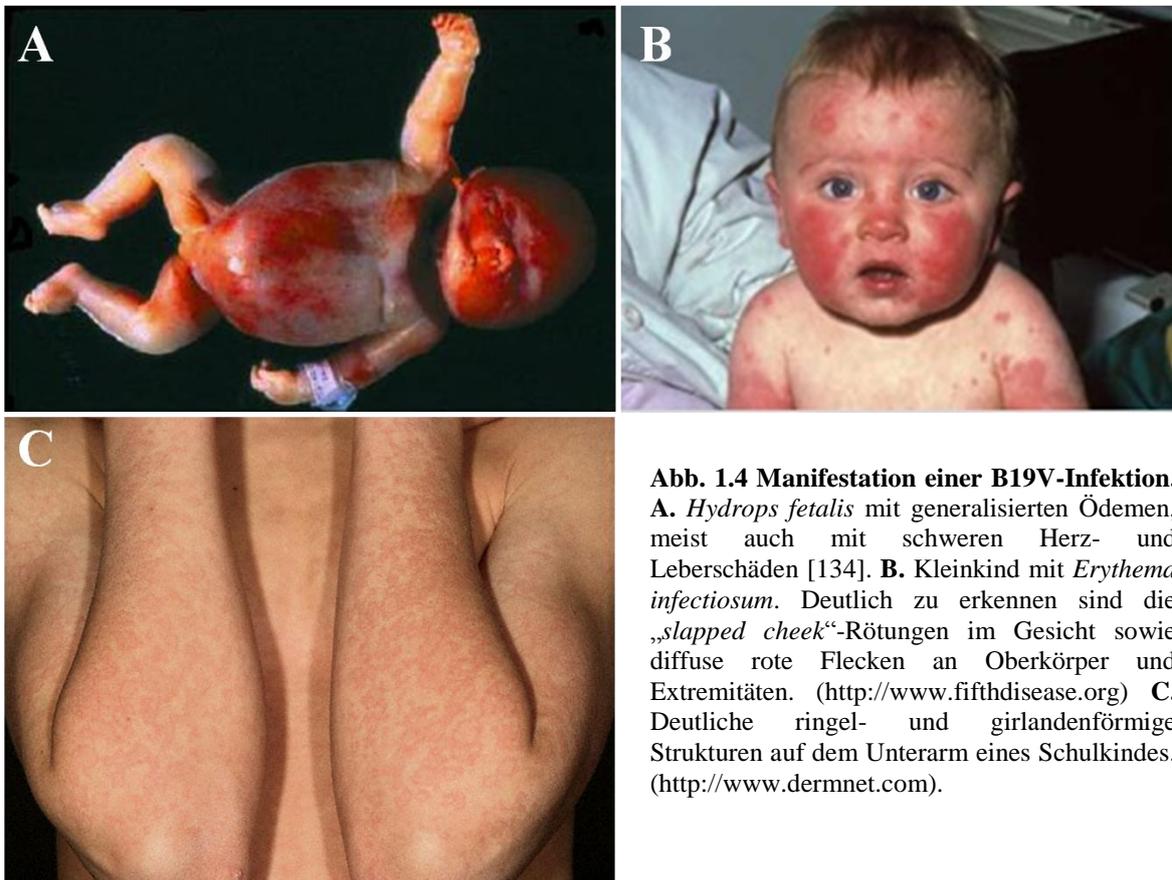


Abb. 1.4 Manifestation einer B19V-Infektion.

A. *Hydrops fetalis* mit generalisierten Ödemen, meist auch mit schweren Herz- und Leberschäden [134]. **B.** Kleinkind mit *Erythema infectiosum*. Deutlich zu erkennen sind die „slapped cheek“-Rötungen im Gesicht sowie diffuse rote Flecken an Oberkörper und Extremitäten. (<http://www.fifthdisease.org>) **C.** Deutliche ringel- und girlandenförmige Strukturen auf dem Unterarm eines Schulkindes. (<http://www.dermnet.com>).

In den letzten Jahren konnten auch noch andere Krankheitsbilder mit B19V assoziiert werden. Diese sind z.B. das *Red Baby Syndrom* [135] oder der systemische *Lupus erythematosus* [136].

Bei der Untersuchung von endomyokardialen Biopsien wurde in 19% der Proben mit akuter Myokarditis B19V-DNA gefunden. Dies lässt darauf schließen, dass Parvovirus B19 ein potentielles kardiotropes Pathogen in allen Altersgruppen sein könnte [137].

1.1.10. Diagnostik, Therapie und Prophylaxe

Eine akute B19V-Infektion kann indirekt über die Detektion von virusspezifischen IgM-Antikörpern bestätigt werden [138]. Der Immunglobulin-Nachweis erfolgt standardmäßig durch Western-Blot oder ELISA-Verfahren [139]. Bei einer persistierenden Infektion findet man gelegentlich einen erneuten Anstieg der IgM-Antikörper. Eine akute oder persistierende B19V-Infektion kann man direkt durch eine PCR der viralen DNA im Serum nachweisen [140, 141]. Der Virus-Titer im Blut bei einer frischen Infektion liegt bei bis zu 10^{14} Viruspartikeln pro ml [142].

Der Nachweis spezifischer IgG-Antikörper weist auf eine abgelaufene Infektion hin. NS1-spezifische Antikörper lassen sich insbesondere bei Patienten mit persistierender B19V-Infektion und bei Patienten mit B19V-assoziiierter andauernder Arthritis nachweisen.

Bei milden Verläufen der B19V-Infektion ist keine Behandlung notwendig. Treten jedoch ernsthafte Komplikationen während einer Infektion auf, z.B. bei immunsupprimierten Patienten (Transplantationspatienten), werden unterschiedliche Maßnahmen ergriffen. Eine schwere Anämie oder aplastische Krise wird durch Bluttransfusionen behandelt [143]. Durch die Gabe von Immunglobulin-Präparaten kann die Viruslast gesenkt werden [144-147].

Die Bestimmung des B19V-Immunistatus bei schwangeren Frauen ist derzeit keine routinemäßige Untersuchung. Ist jedoch eine akute B19V-Infektion in der Schwangerschaft diagnostiziert worden, ist eine engmaschige Ultraschallkontrolle des Fetus notwendig. Kommt es zu hydropischen Ödemen oder zum Absinken der fetalen Hämoglobinwerte, muss eine Bluttransfusion über die Nabelschnurvene zur Rettung des Kindes durchgeführt werden. Antivirale Therapeutika oder ein Impfstoff gegen Parvovirus B19 sind bisher nicht verfügbar [116].

1.1.11. Parvovirus B19-assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie

Neben den koronaren Herzerkrankungen ist die dilatative Kardiomyopathie (DCM) eine der häufigsten Herzerkrankungen, die zu einer Herzinsuffizienz führt [148]. Dabei handelt es sich um eine Herzmuskelerkrankung, die durch eine Erweiterung (Dilatation) und systolischer Dysfunktion der Ventrikel gekennzeichnet ist [149]. Am Ende einer solchen Erkrankung steht oft nur noch die Herztransplantation als mögliche Therapieoption. Die am häufigsten genannten Ursachen der DCM sind myokardiale Entzündungen sowie Virusinfektionen. Bei dieser Form der DCM spricht man von einer inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi) [150]. Sie macht ca. 70% aller DCM-Fälle aus [151-153].

Seit Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts konnten durch hochsensitive molekularbiologische Nachweismethoden eine Vielzahl viraler Infektionen am Herzen identifiziert werden. Die vier häufigsten nachgewiesenen Viren sind Coxsackievirus Typ B, Parvovirus B19, Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6) und Adenovirus [153-155]. Auch die Präsenz mehrerer viraler Erreger wurde beobachtet (12%), wobei eine gleichzeitige Infektion mit HHV-6 und B19V mit 60% am häufigsten war [153].

Eine direkte ätiopathologische Rolle von B19V bei der Entstehung schwerer kardialer Dysfunktionen wurde erst durch die Verwendung von *in situ*-Hybridisierungen hergestellt [156]. Durch diese Technik konnten parvovirale Genome direkt in den Endothelzellen (ECs) des Myokards detektiert werden [157-159] (Abb.1.5).

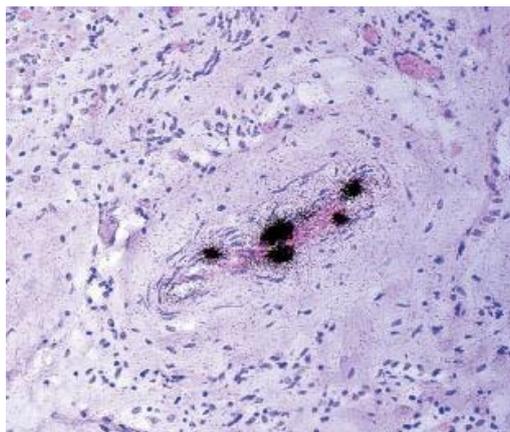


Abb.: 1.5 B19V-infiziertes Myokard. Detektion des B19V-Genoms in ECs einer kleinen intramyokardialen Arterie im Gewebe eines Patienten mit akuter Myokarditis. Radioaktive *in situ* Hybridisierung, 100-fache Vergrößerung. [156]

Bei der akuten DCMi waren ausschließlich Endothelzellen der intramyokardialen Arteriolen und postkapillaren Venolen, nicht aber die Myozyten selbst von der B19V-

Infektion betroffen [156]. Als Folge der Infektion konnte eine starke Entzündungsreaktion im kardialen Gewebe nachgewiesen werden. Diese ging mit einer massiven Margination, Adhärenz, Penetration und perivaskulären Infiltration durch aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten einher. Man vermutet, dass es aufgrund der B19V-assoziierten Endothelzellschäden sowie der damit verbundenen Mikrozirkulationsstörung zu nekrotischen Veränderungen der Myozyten kommt [157, 158, 160]. Im Gegensatz zur akuten B19V-assoziierten DCMi konnte man bei der chronischen Form der dilatativen Kardiomyopathie virale Genome im Endothel der engmaschigen Kapillaren des Myokards nachweisen, welches mit einer chronischen makrophagenreichen Inflammation einherging [159]. Neben dem Ort der Infektion unterschied sich die akute DCMi von der chronischen Form in Hinblick auf die B19V-Viruslast. Durch den Einsatz von quantitativen PCR-Analysen wurden bei der akuten B19V-Infektion des Herzens große Virusmengen von 10^4 bis 10^7 Genomäquivalenten (GE) pro μg der isolierten Gesamt-DNA detektiert, während bei der chronischen DCMi unter 10^3 virale GE pro μg DNA nachgewiesen werden konnten.

Bei einer Virusinfektion des kardialen Endothels kann es durch die Aktivierung von Interferon-abhängigen Signalkaskaden wie dem JAK/STAT- und MAPK-Signalweg, sowie durch die Infiltration des Gewebes mit Leukozyten zum Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion mit einem Verlust der Selektivpermeabilität führen [161, 162]. Dadurch können Ödembildungen entstehen, die im Myokard eine massive Beeinträchtigung der Organfunktion verursachen. Ein solcher Prozess wird auch bei der B19V-Infektion des Herzens vermutet. So wurden in Endomyokardbiopsien von Patienten mit endothelialer Dysfunktion signifikante Mengen von B19V-DNA detektiert [163]. Desweiteren konnte eine Verbindung zwischen einer B19V-induzierten kardialen endothelialen Dysfunktion und einer isolierten diastolischen Dysfunktion hergestellt werden. Untersuchungen belegen, dass in 84% der Endomyokardbiopsien von Patienten mit einer ätiologisch unklaren diastolischen Dysfunktion das B19V-Genom vorliegt [164].

Es gibt jedoch auch entgegengesetzte Studien, die postulieren, dass die B19V-DNA nach der Primärinfektion lebenslang latent in den kardialen Endothelzellen verbleibt, ohne Symptome zu induzieren. So fand man in über 90% der Endomyokardbiopsien von Patienten unterschiedlichster Todesursachen Kopien der B19V-DNA [165, 166]. Diese Theorie wird durch die Tatsache gestützt, dass die detektierte B19V-DNA vom Genotyp 2 stammt, der nur bis in die 70er Jahre vertreten war [101, 167, 168]. Auch in anderen Geweben, wie der Leber, der Haut oder den Tonsillen, konnte eine latent vorliegende

B19V-DNA nachgewiesen werden [110, 169, 170]. Eine Reaktivierung der B19V-DNA im Herzen durch verschiedene Faktoren sowie eine permanente Synthese des zelltoxischen NS1-Proteins, das wiederum zu einer andauernden Schädigung der Endothelzellen führen könnte, ist jedoch nicht auszuschließen. So konnte bereits gezeigt werden, dass adenovirale Faktoren in der Lage sind, die Genexpression der B19V-DNA in kardialen Endothelzellen positiv zu beeinflussen [171].

1.2. Alternative Aufnahmemechanismen

Der Infektionszyklus aller Viren beginnt mit der Anheftung an die Zielzelle durch die Interaktion von viralen Oberflächenproteinen und spezifischen Rezeptoren und Ko-Rezeptoren auf der Zelle. Dieser Schritt der Infektion wird häufig durch spezifische Antikörper, die an die viralen Proteine an der Oberfläche binden, inhibiert, wodurch die Infektiosität deutlich reduziert wird und eine Neutralisierung des Virus stattfindet. Doch unter Umständen kann es durch spezifische Antikörper auch zu einer Verstärkung der viralen Infektion kommen. Diesen Effekt bezeichnet man als Antikörper-abhängige Verstärkung (*antibody-dependent enhancement*; ADE) der viralen Infektion, er wurde erstmals in den 60er Jahren von Hawkes et al. [172, 173] beschrieben. Wirkliche biologische Bedeutung erlangte der Mechanismus der ADE jedoch erst bei der Aufklärung der Pathogenese des Denguevirus, welches zur Familie der *Flaviviridae* gehört [174, 175]. Halstead et al. konnte am Beispiel des Denguevirus zeigen, dass die Fc-Rezeptor-abhängige Antikörper-vermittelte Aufnahme der häufigste Mechanismus der ADE ist [176]. Dabei bindet der Antikörper spezifisch an die Oberflächenproteine des Virus und der so gebildete Antikörper-Viruskomplex wird über die Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an zelluläre Fc-Rezeptoren in die Zelle aufgenommen (Abb. 1.6 A). Dieser Mechanismus wurde durch Peiris et al. [177, 178] bestätigt, in dem er die Fc-Rezeptoren auf Makrophagen mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern blockierte und somit die Virusaufnahme des *West-Nile-Virus* deutlich reduzierte. Auch bei anderen Flaviviren, wie dem Gelbfiebervirus [179, 180], dem *Wesselsbron-* [181] oder dem Japanischen Enzephalitis-Virus [182, 183], konnte dieser Mechanismus der ADE bestätigt werden.

Cardosa et al. identifizierte neben dem Fc-abhängigen Mechanismus eine weitere Form der ADE bei Flaviviren. Dabei werden die Viren verstärkt über spezifische Komplement-Rezeptoren in die Zelle aufgenommen. Durch die Blockierung des CR3 durch spezifische

Antikörper konnte die Infektionsrate des *West-Nile-Virus* in FcR-exprimierenden Zellen deutlich reduziert werden. Blockierte man jedoch die Fc-Rezeptoren, war dieser Effekt nicht nachweisbar [184]. Diese Variante der Virusaufnahme wird durch die Aktivierung des klassischen Komplementsystems ermöglicht. Dabei bindet der C1-Komplementfaktor, bestehend aus dem sechsköpfigen Kollektin C1q und jeweils 2 Molekülen der Serinproteasen C1r und C1s, an den Fc-Teil des Virus-gebundenen Antikörpers. Die über C1 aktivierten Komplementfaktoren C4 und C2 spalten den C3-Faktor in ein aktiviertes C3-Fragment, welches spezifisch an den zellulären Komplement-Rezeptor CR3 binden kann und somit die Aufnahme des Virus-Antikörperkomplexes bewirkt (Abb.1.6 B).

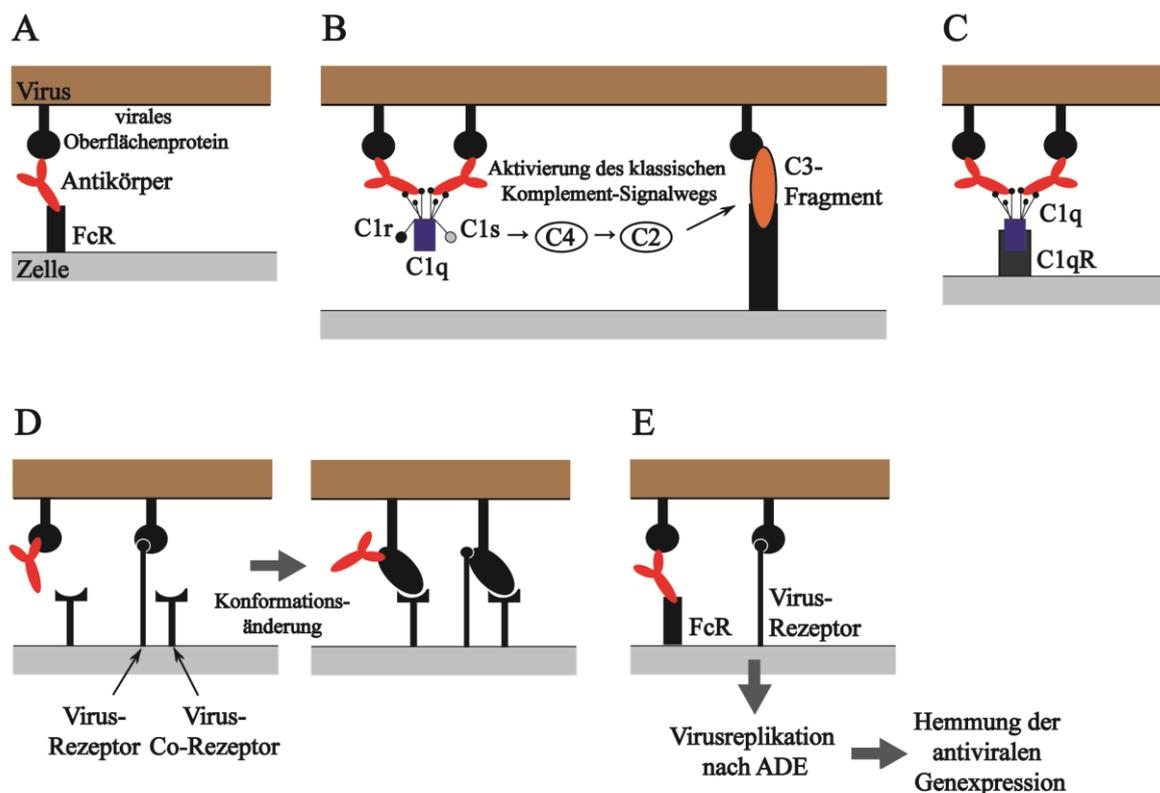


Abb.: 1.6 Schematische Darstellung möglicher Mechanismen der Antikörper-vermittelten Virusaufnahme. Virusaufnahme über die Interaktion zwischen Antikörper und Fc-Rezeptor (A), über die Aktivierung des Komplement-C3-Fragments und den C3-Rezeptor (B) oder über den Komplementfaktor C1q und dem spezifischen C1q-Rezeptor (C). Durch die Bindung des Antikörpers an die Rezeptor-Bindestelle des Virus kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu einer Virusaufnahme führt (D). Bei der viralen Replikation nach ADE-Aufnahme wird die zelluläre antivirale Genexpression gehemmt (E). Modifiziert nach Takada et al. 2003 [185].

Bereits kurz nach der ersten Isolierung des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), wurden auch für dieses Virus die bereits dargestellten Formen der ADE nachgewiesen [186, 187]. Zusätzlich wurde noch ein weiterer Mechanismus der ADE bei der HIV-

Infektion vermutet, der sowohl FcR- als auch CR-unabhängig ist. Es handelt sich um einen Rezeptor-aktivierten Virusaufnahme-Mechanismus, bei dem lösliche CD4-Moleküle eine entscheidende Rolle spielen. Dabei wird postuliert, dass Antikörper oder CD4-Moleküle an eine Untereinheit des HIV-Proteins gp120 binden und eine Konformationsänderung induzieren, die zu einer funktionellen Aktivierung von Glykoproteinen führt. Die aktivierten Glykoproteine begünstigen anschließend Membranfusionsereignisse, die zur Aufnahme der Viren führen (Abb.1.6 D) [188].

Eine vierte Variante der ADE konnte bei Untersuchungen von Ebolavirus-Infektionen identifiziert werden. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Komplement-abhängigen Prozess. Da jedoch Inhibitoren des klassischen Komplement-Signalweges keine Verringerung der Virusaufnahme zur Folge hatten, scheint der Effekt nicht durch die herkömmliche Komplement-Aktivierung vermittelt zu werden [189]. Weitere Studien zeigten, dass der entscheidende Mediator für diese Variante der Virusaufnahme die Komplement-Komponente C1q darstellt [190]. Es wurde nachgewiesen, dass durch die unmittelbare Nähe von spezifischen Epitopen von zwei oder mehr Antikörpern das C1q in der Lage ist, an den Fc-Teil der Antikörper zu binden. Kommt es nun zu einer Interaktion des Antikörpers mit seinem Antigen (Ebolaviruspartikel), so bindet der Komplex, bestehend aus Virus, Antikörper und C1q-Komponente, direkt an den spezifischen C1q-Rezeptor, was zu einer verstärkten Bindung des Ebolavirus an virusspezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche führt oder die zelluläre Endozytoseaktivität erhöht (Abb.1.6 C) [191, 192]. Aufgrund der Tatsache, dass der C1q-Rezeptor im Gegensatz zu Fc-Rezeptoren nicht nur von den Zellen des Immunsystems exprimiert wird, sondern auf vielen anderen Zelltypen, wie neutrophilen Granulozyten, B-Lymphozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und endothelialen Zellen nachgewiesen werden konnte, wird diese Variante als der allgemeinste virologische Mechanismus der ADE bezeichnet [191-193].

In den letzten Jahren konnten ADE-Effekte auch für zahlreiche andere Viren gezeigt werden. Dabei war die Fc-abhängige Antikörper-vermittelte Virusaufnahme der am häufigsten vorkommende Mechanismus. Zu den Viren, die ADE als alternativen Aufnahmemechanismus verwenden, zählen z.B. das Respiratorische Synzytial-Virus (*Paramyxoviridae*) [194, 195], das Influenza A-Virus (*Orthomyxoviridae*) [196, 197], das Hantavirus (*Bunyaviridae*) [198], das *Aleutian mink disease parvovirus* (*Parvoviridae*) [199, 200], sowie das Epstein-Barr-Virus oder das Herpes Simplex-Virus (*Herpesviridae*) [201-203].

In Studien am *Ross River*-Virus wurde ein neues Konzept zur Bedeutung der ADE bei der viralen Pathogenese postuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Replikation des über ADE aufgenommenen Virus zu einer Hemmung der Expression antiviraler Gene, wie dem TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) oder der NO-Synthase, sowie zu einer Reduktion der antiviralen Aktivität von Immunzellen auf transkriptioneller Ebene führt (Abb.1.6 E). Dadurch verläuft der Infektionszyklus deutlich effizienter als bei der herkömmlichen Rezeptor-vermittelten Aufnahme [204, 205]. Anhand dieser Studien wird deutlich, wie wichtig die ADE für das Virus in Hinblick auf die Umgehungstaktiken des Immunsystems sein kann.

Ob ein Antikörper eine virale Infektion eher neutralisiert oder verstärkt, hängt von einer Vielzahl von Faktoren, sowohl qualitativer als auch quantitativer Natur, ab. Die bisher identifizierten Determinanten für das Auftreten von Infektions-verstärkenden Antikörpern sind zum einen der Virusstamm sowie die Virusmenge. Aber auch die Kombination von Zielzelle und Antikörper (Bindungsspezifität zwischen Antikörper und Komplement-Komponenten oder zellulären Rezeptoren) sowie die Konzentration, Klasse und Epitopspezifität der Antikörper sind von großer Bedeutung. Auch die Konzentration des Komplementsystems ist für die Kontrolle der biologischen Aktivität von Antikörpern wichtig [185].

Die Aufklärung von alternativen Infektionsmechanismen, wie der ADE, ist in Hinblick auf die bisher verwendeten Vakzine-Strategien sowie die Entwicklung von neuen Methoden zur Bekämpfung von Virusinfektionen besonders wichtig. Es besteht die Möglichkeit, dass sich sowohl durch den Einsatz von aktiven Vakzinen als auch von Immunglobulinen zur passiven Immunisierung persistierende Infektionen verstärkt manifestieren können [203, 206, 207]. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Entwicklung neuer Immunisierungsstrategien wie beispielsweise Plasmid-DNA- und Vektor-basierter Vakzine voranzutreiben.

1.3. Zielsetzung

Parvovirus B19 ist ein kleines, nicht behülltes Virus mit einem einzelsträngigen DNA-Genom, das aufgrund seines engen Gewebe- und Zelltropismus ausschließlich in erythroiden Vorläuferzellen und fetalen Leberzellen einen produktiven Infektionszyklus durchlaufen kann. Jedoch wurden in den letzten Jahren auch in anderen Gewebe- und Zelltypen größere Mengen an B19V-DNA nachgewiesen. Zu diesen Zellen gehören unter

anderem auch Endothelzellen der intramyokardialen Arteriolen und postkapillaren Venolen. Zahlreiche Untersuchungen zur möglichen ätiopathophysiologischen Rolle von B19V im Herzen reichen von einer asymptomatischen, langjährigen Latenz der B19V-DNA in den Endothelzellen [165, 166] bis hin zu einer Assoziation von B19V mit Herzerkrankungen wie akuten und chronischen Myokarditiden sowie der inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie (DCMi) mit endothelialer Dysfunktion [153, 157, 160, 164]. Dabei konnte der genaue Mechanismus der Virusaufnahme in Endothelzellen bisher nicht geklärt werden.

In Hinblick auf die hohe Prävalenz von B19V-DNA in endomyokardialen Biopsien von Patienten mit chronischen Herzerkrankungen bestanden die Ziele der vorliegenden Arbeit darin, mögliche B19V-Aufnahmemechanismen in endothelialen Zellen zu identifizieren und den weiteren Infektionsverlauf nach der B19V-Aufnahme zu untersuchen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der klassische Infektionsmechanismus, der über spezifische zelluläre Rezeptoren und Co-Rezeptoren vermittelt wird, für die B19V-Aufnahme in Endothelzellen nur eine untergeordnete Rolle spielt und die Mengen an detektierter B19V-DNA in diesen Zellen nicht befriedigend erklären kann [208]. Eine mögliche Alternative zur klassischen Infektion stellt die Antikörper-vermittelte Virusaufnahme (ADE) dar. Dieser alternative Mechanismus wurde bereits von Munakata et al. für B19V in der monozytären Zelllinie U937 beschrieben [209].

Daher sollte zunächst untersucht werden, ob auch bei Endothelzellen eine verstärkte B19V-Aufnahme über Antikörper vermittelt werden kann. Anschließend sollte die Abhängigkeit der Virusaufnahme von der Konzentration der α -B19V-Antikörper, die B19V-Adhäsions- und Internalisierungseigenschaften in Gegenwart von Antikörpern, die Fc-Rezeptorexpression der Endothelzellen sowie die Charakterisierung der Wechselwirkung der Virus-Antikörper-Komplexe mit zellulären Rezeptoren analysiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit, der den weiteren Infektionsverlauf von Parvovirus B19 nach der Aufnahme in Anwesenheit von α -B19V-Antikörper beinhaltet, sollte der Virustransport in den Nukleus, die virale mRNA-Expression sowie die Replikation von B19V in Endothelzellen näher untersucht werden.

2. Material

2.1. Chemikalien

Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Aprotinin	Sigma
Aqua bidest.	Millipore GmbH
Bovine Serum Albumin (10mg/ml)	NEB
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Roth
Chloroform:Isoamylalkohl 24:1	Roth
Cryo SFM	Promocell
DetachKit	Promocell
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Alldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Alldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), High Glucose GlutaMAX™	Gibco
Endothelial Cell Growth Medium MV2 (Ready-to-use)	Promocell
Erythropoetin	PBL Biomedical Laboratories
Ethanol (> 99,8%)	Roth
Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
FACS Clean	BD Biosciences
FACS Flow	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Ficoll Typ 400	Sigma
Formaldehyd (37%)	Roth
Formamid	Roth
Glycerin (86%)	Roth

Glycin	Roth
H ₂ O (RNase/DNase free)	Sigma
High Sensitivity Streptavidin-HRP	Thermo Scientific
HEPES	Roth
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco
Isopropanol (2-Propanol)	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Midori Green	Biozym
Milchpulver	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS, 20%)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Penicillin / Streptomycin (10.000 U/ml)	Biochrom
Pepstatin	Sigma
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
PMSF	Sigma
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Gibco
Rotiphorese® Gel 30	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCL) (37%)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
TRIzol® Reagent	Invitrogen
Tween® 20	Roth
Trypanblau	Roth
Trypsin/EDTA	Invitrogen

2.2. Enzyme und dazugehörige Puffer

Proteinase K		Roth
Puffer (<i>smartcut</i>)		NEB
Restriktionsendonuklease:	DpnI, Sall	NEB
RNase		Genomed

2.3. Medien, Puffer, Lösungen

2.3.1. Medien für Zellkultur

DMEM-Kulturmedium:	1 Vol.% Penicillin/Streptomycin-Lösung 1x HAT-Supplement 10 Vol.% FCS 500 ml DMEM
Endothelial Cell Growth Medium MV2:	1 Vol.% Penicillin/Streptomycin-Lösung 1x Supplement Mix 500 ml MV2-Medium
IMDM-Kulturmedium:	1 Vol.% Penicillin/Streptomycin-Lösung 10 Vol.% FCS 2 IU/ml Erythropoetin 500 ml IMDM
RPMI 1640 -Kulturmedium	1 Vol.% Penicillin/Streptomycin-Lösung 10 Vol.% FCS 500 ml RPMI 1640

2.3.2. Puffer

Puffersysteme für Western-Blot:

Protein-Transferpuffer (pH 8,0)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
5x SDS-Laufpuffer (pH 8,8)	0,25 M Tris 1,9 M Glycin 0,5% (w/v) SDS
2x SDS-Proteinprobenpuffer	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5) 2 mM EDTA 20% (v/v) Glycerin 4% (w/v) SDS 10% (w/v) 2-Mercaptoethanol 0,02% (w/v) Bromphenolblau

Puffersysteme für Southern-Blot:

10x DNA-Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau 25% (w/v) Ficoll Typ 400 10 mM EDTA
20x DNA-Transferpuffer	0,5 M Phosphatpuffer (pH 6,2) 45,96 g/l NaH ₂ PO ₄ 29,62 g/l Na ₂ HPO ₄
Hirt-Lysepuffer	10 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA 1% (w/v) SDS 50 µg/µl Proteinase K

Hochsalzpuffer C	20 mM HEPES pH 7,9 (KOH)
	420 mM NaCl
	1,5 mM MgCl ₂
	0,2 mM EDTA
	0,5 mM DTT
	25% Glycin

Proteaseinhibitoren (wurden unmittelbar vor Gebrauch zu Puffer A und C hinzugefügt):

PMSF	1/100 Vol. (0,1 M)
Pepstatin	1/1000 Vol. (1 mg/ml)
Aprotinin	1/1000 Vol. (1,5 mg/ml)

weitere Puffersysteme:

PBS (pH 7,4)	8 mM Na ₂ HPO ₄
	2 mM NaH ₂ PO ₄
	150 mM NaCl
PBS-T	0,1% (w/v) Tween® 20
	in PBS
50x TAE-Puffer (pH 8,5)	2 M Tris
	50 mM EDTA
	57,1 ml/l Eisessig
1 x TBS	10 mM Tris/HCl (pH 7,4)
	2 mM CaCl ₂ ,
	2 mM MgCl ₂
	150 mM NaCl pH 8,0
1x TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	1 mM EDTA (pH 8,0)

2.3.3. Lösungen

Western-Blot:

Blocklösung 6% (w/v) Milchpulver
in PBS

Milchlösung für Antikörper 6% (w/v) Milchpulver
0,3% (w/v) Tween 20
in PBS

SDS-Proteingellösung B (pH 8,8) 1,5 M Tris/HCl
0,4% (w/v) SDS

SDS-Proteingellösung C (pH 6,8) 0,75 M Tris/HCl
0,4% (w/v) SDS

Southern-Blot:

Agarosegellösung 0,5-1,5% (w/v) Agarose
in TAE

Denaturierungslösung 0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

Depurinierungslösung 0,25 M HCl

Hybridisierungslösung 45% (v/v) Formamid
1 mM EDTA (pH 8,0)
250 mM NaCl
0,125 M Natriumphosphatpuffer*

*pH 7,2: Einstellen des pH durch Mischen von
Na₂HPO₄ und NaH₂PO₄ gleicher Molarität

NaCl-Lösung	5 M NaCl in Aqua bidest.
Natriumacetatlösung	3 M Natriumacetat (pH 5,2) in Aqua bidest.
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris/HCl (pH 7,0) 1,5 M NaCl
Proteinase K	20 mg/ml Proteinase K in bidest. H ₂ O

Virusaufreinigung:

20%ige Saccharoselösung	20% (w/v) Saccharose in Aqua bidest.
-------------------------	---

FACS-Analyse

Fixierungslösung	3,7% (w/v) Formaldehyd in PBS
------------------	----------------------------------

2.4. Größenmarker

DNA-Größenmarker:

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
---------------------------	-----------

Protein-Größenmarker:

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas
--	-----------

2.5. Zelllinien

Tab. 2.1. : Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Medium	Herkunft
EA.hy926	Hybrid-Zelllinie aus HUVEC und A549	DMEM *	AG H. Fechner
HCAEC	humane Endothelzelle aus der Koronararterie	MV2-Medium	Promocell
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzelle	MV-Medium	Promocell
HAoEC	humane Endothelzelle aus der Aorta	MV2-Medium	Promocell
HPAEC	humane Endothelzelle aus der Pulmonalarterie	MV-Medium	Promocell
UT7/Epo-S1	humane megakaryoblastoide Zelle	IMDM *	AG S. Wong
U937	humane histiozytäre Lymphom-Zelllinie mit monozytären Eigenschaften	RPMI *	ATTC

* Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Zellkulturmedien mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.6. Viren und Plasmide

Viren

Parvovirus B19-haltiges Plasma (bereitgestellt von Dr. Knut Gubbe, Institut für Transfusionsmedizin und immunologische Hämatologie, Deutsches Rotes Kreuz, 08529 Plauen)

Tab.2.2. : Virustiter und Infektiosität (reine B19V-Infektion in U937)

Virusstock	Titer (GE/μl)	eingesetzte Genomische Partikel pro Zelle	Infektiosität (aufgenommene Partikel pro Zellen)
D2-Stock	$1,17 \times 10^9$	1000	1,35
		-	-
D5-Stock	$1,07 \times 10^{10}$	1000	0,011
		10.000	0.9

Plasmide

- pM20-Plasmid, welches das gesamte B19V-Genom enthält (bereitgestellt von der AG Fechner, Institut für Biotechnologie, Technische Universität Berlin)
- pHelper-Plasmid, welches die adenoviralen Funktionen E2A, E4 und VA-RNA enthält (Stratagene, USA)

2.7. Proben von Probanden für IgG-Aufreinigung

Arbeitsbezeichnung der IgG-Fraktionen:

4 B19-Antikörper-positive Seren:

HF

KvK

MM

TP

3 B19-Antikörper-negative Seren:

JT

KB

SW

2.8. Antikörper

2.8.1. Monoklonale Antikörper gegen humane Oberflächenmarker

Tab.2.3. : Antikörper für Fc-Rezeptoren

Antikörper	Klon	Hersteller
FITC Mouse Anti-Human CD64	10.1	BD Biosciences
FITC Mouse Anti-Human CD32	3D3	BD Biosciences
FITC anti-human CD16	3G8	BioLegend
FITC Mouse IgG1 κ Isotype Control	MOPC-21	BD Biosciences

2.8.2. Monoklonale Primärantikörper

Anti α Tubulin mouse mAb (DM1A)	Calbiochem
MCM7 (141.2) mouse monoclonal IgG1	Santa Cruz Biotechnology
CD93 Molecule (CD93)-Antikörper	Antikörper-online.de

2.8.3. Polyklonale Sekundärantikörper

Goat-anti mouse-Ab-HRP	Dianova
------------------------	---------

2.9. PCR-Material

MasterMix:

TaqMan Gene Expression MasterMix	Applied Biosystems
----------------------------------	--------------------

B19-Standard:

Parvovirus B19 Klon VP1/2 (1×10^8 Kopien/ μ l)	Applied Biosystems
--	--------------------

Endogene Kontrolle:

TaqMan Template Reagents	Applied Biosystems
--------------------------	--------------------

Primer

Tab. 2.4. : Verwendete Primer

Assay-Name	Primerdesign	Forward Primer	Reverse Primer	Sonde
B19-qPCR	Metabion Internation AG, Applied Biosystem (Sonde)	5`-CAT TTT CYA GAC AGT TTT TAA TYC CA-3`	5`-CTY GCT GCG GGA GAA AAC AC-3`	5`-FAM-ATG ACC CAG AGC ACC- BHQ-3`
11-kDa- qPCR	Metabion Internation AG	5`-GAA GCC TTC TAC ACA CCTTTG G-3`	5`-TGG CTG TCC ACA ATT CTT CAG G-3`	5`-FAM-TCG TGA ACT GTG CAG CTG CCC CTG TG-BHQ-3`
VP2-qPCR	Metabion Internation AG	5`-GAC CAG TTC AGG AGA ATC AT-3`	5`-TTC TGA GGC GTT GTA AGC-3`	5`-FAM-AGA CCA GTT TCG TGA ACT CTA CAG ATG CA-BHQ- 3`
NS1-qPCR	Metabion Internation AG	5`-TTC CTG GAA TTA ATG CAG ATG C-3`	5`-CAC TGC TGC TGA TAC TGG TGT-3`	5`-FAM-ACC TCC AAA CCA CCC CAA TTG TCA-BHQ-3`

2.10. Kommerzielle Kits

BioRad®Protein-Assay Kit

BioRad

Biotin Deca Label DNA Labeling Kit

Thermo Scientific

Biotrin Parvovirus B19 IgG Enzymimmunoassay Kit

DiaSorin

High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit

Applied Biosystems

Pierce Fab Preparation Kit

Thermo Scientific

Pure Link Genomic DNA Mini Kit

Invitrogen

Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate-Kit

Pierce

Turbo DNase Kit

Invitrogen

2.11. Geräte

Abzug (AFC-500)	Thurm
Agarosegelelektrophorese-Apparatur	MPI für Biochemie (Martinsried)
Elektronische Präzisionswaage	Sartorius
Feinanalysewaage	Sartorius
Filmkassetten	Amersham Biosciences
Folienschweißgerät (Polystar®243)	Bachofer
Gelfotodrucker P93D	Mitsubishi
Hybridisierungsofen	UVP / MWG Biotech
Magnetrührer	IKA / Janke & Kunkel
Mikropipetten	Eppendorf / Gilson
Mikrowelle	Toshiba
Netzgerät (2301 Macrodriv1)	LKB Bromma
Netzgerät (Power Pac 300)	BioRad
pH-Meter (Delta 320)	Mettler
PipetBoy	Integra Biosciences / Brand
Polyacrylamidgelelektrophorese-Apparatur	BioRad
Schwenker (Rockomat)	Tecnomara
SemiDryBlot-Apparatur	MPI für Biochemie (Martinsried)
Sterilwerkbank	BDK
Stickstoffbehälter	Isotherm
Thermoblock BBA	Grant Boekel
Thermomixer compact	Eppendorf
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Überkopfschüttler (Reax 2)	Heidolph
Vortexer	Bender & Hobein AG/IKA
Wasserbad	Julabo/Fischer Scientific
<i>Zentrifugen:</i>	
Avanti™ J-25, Rotor JLA 16250	Beckmann
Centrifuge 5417C	Eppendorf

Centrifuge 5415C	Eppendorf
Megafuge 3.0R	Heraeus Sepatech
Minifuge RF	Heraeus Sepatech
Omnifuge 2.0RS	Heraeus Sepatech
Optima™ L-90K Ultrazentrifuge (SW-40 Ti-Rotor)	Beckman Coulter
Sigma Laborzentrifuge 3-10	Sigma
Sigma 2K15	Sigma

Kühl- und Gefrierschränke:

Gefrierschrank (-20°C)	AEG/Bosch/Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	GFL
Kühlschränke (+4°C)	Liebherr

Mikroskope:

Fluoreszenzmikroskop (DMIL)	Leica
Lichtmikroskop (CK2)	Olympus
Lichtmikroskop (Diavert)	Leitz
Lichtmikroskop (IDO2)	Zeiss

Maschinen:

Autoklav	Webeco
DU@530 LifeScience UV/Vis Spectrophotometer	Beckmann
Eismaschine	Ziegra
Entwicklermaschine CURIX 60	Agfa
FACS Calibur	Beckton Dickenson
GeneAmp®PCR System 9700/2400	Applied Biosystems
HPLC (ÄKTA Purifier)	GE HealthCare Life Sciences
NanoDrop®ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer	Thermo Scientific
PCR-Cycler	BioRad
TaqMan ABI 7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
TaqMan ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Tecan Sunrise Mikrotiterplatten-Reader	Tecan Group Ltd
UV-Transluminator (Geldokumentationssystem)	Intas Science Imaging

Inkubatoren:

Brutschrank Hera cell 240	Heraeus
Brutschrank Hera cell	Thermo Scientific

2.12. Verbrauchsmaterialien

Bechergläser (50, 100, 200, 1000 ml)	Schott
Einwegpipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt
Falcon Polystyrene Round Bottom Tubes (15, 50 ml)	Becton Dickinson Bioscience
Glasflaschen (100, 200, 500, 1000, 2000 ml)	Schott
Glaspipetten	Hirschmann
Handschuhe (Latex, Nitril)	Emerson
Medizinischer Röntgenfilm	Fuji
Messzylinder	Simax
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
3MM Whatman-Papier	GE HealthCare Life Sciences
Neubauer Zählkammer	Optik Labor
Nitrocellulose-Transfermembran Whatman	GE HealthCare Life Sciences
Parafilm	American Can Co.
PCR-Reaktionsgefäße	Applied Biosystems
Pinzetten, Scheren	Bochem Feather
Pipettenspitzen gestopft (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt
Protein G-HP-Säule	GE Healthcare Life Sciences
1,8ml Nunc Cryotube™ Vials	Nunc Brand Products Nalge
	Nunc international
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Sarstedt
Schlauchfolie	VWR
Spritzen	BD
Spritzenfilter (22 µm, 45 µm)	Millipore
Stickstoffbehälter	Isotherm
Transfermembran NYTRAN®N amphotere	GE HealthCare Life Sciences
Nylonmembran	
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann

Zellkulturflaschen (25 cm ³ , 75 cm ³)	Sarstedt
Zellkulturplatten / -schalen (24 well, 6-cm)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenbecher	Beckmann

2.13. Software

Adobe Illustrator CS3	Adobe Systems incorporated
Adobe Photoshop 7.0.	Adobe Systems incorporated
Cell Quest ^{Pro}	Becton Dickinson
7500 Fast Real-Time PCR System Software	Applied Biosystems
Intas-Capture-Software	Intas Science Imaging
Magellan TM -Data Analysis Software	Tecan Group Ltd.
Microsoft Office 2007 (Excel, Word, PowerPoint)	Microsoft Corporation
ViiA TM 7 Software	Applied Biosystems

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung von Zellen

Für die Infektionsstudien wurden verschiedene Zellen verwendet. Die adhärenente Zelllinie EA.hy926, die aus der Zellkultursammlung der Arbeitsgruppe stammte. Die adhärenenten Primärzelllinien HCAEC, HDMEC, HAoEC und HPAEC, die über Promocell bezogen wurden. Die monozytäre Suspensionszelllinie U937, die über ATTC bestellt wurde. Sowie die B19V-semipermissive Suspensionszelllinie UT7/Epo-S1, welche freundlicherweise von Susan Wong (Hematology Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, USA) bereitgestellt wurde.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kunststoffflaschen oder -schalen bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten Feuchtbrutschrank. Die EA.hy926-Zellen benötigten DMEM mit einem hohen Glukose-Gehalt ("high glucose") in Gegenwart von 10% FCS und 1% Pen/Strep und wurden mit 1x HAT supplementiert. Die Suspensionszelllinie UT7/Epo-S1 wurde in IMDM-Medium in Gegenwart von 10% FCS und 1% Pen/Strep sowie 2 IU/ml Erythropoetin gehalten.

Neben den permanenten Zelllinien wurden endotheliale Primärzellen verwendet. Diese wurden in einem speziell von der Firma Promocell bezogenem Medium kultiviert. Es handelte sich hierbei um ein serumfreies Medium, welches mit einer Mischung verschiedener Nährstoffe und Wachstumsfaktoren ergänzt wurde, die separat beigefügt waren. Zusätzlich wurde noch 1% Pen/Strep zugegeben.

Erreichten die kultivierten adhärenenten Zellen eine Konfluenz von 80 bis 100% wurden sie passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen abgelöst und in 10 ml Medium aufgenommen und resuspendiert. Je nach Umsetzrate wurde die entsprechende Menge an Suspension entnommen und in eine neue Kulturflasche oder -schale mit frischem Medium überführt.

Die Suspensionszellen UT7/Epo-S1 und U937 wurden einmal in der Woche passagiert. Je nach Umsetzrate wurde eine definierte Menge aus der Zellsuspension entnommen und in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium überführt.

Die endothelialen Primärzellen wurden nach den Angaben des Herstellers kultiviert.

3.1.2. Zellzahlbestimmung

Zur genauen Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Eine Trypanblau-Färbung der Zellsuspension gab Aufschluss über den Anteil noch lebender Zellen. Es wurden jeweils 4 Großquadrate (Q) mit je 16 kleinen Quadraten ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

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

3.1.3. Einfrier-und Auftauverfahren von Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Zellen wurden diese zunächst auf mehrere 75 cm²-Flaschen expandiert und bei einer Konfluenz von 80%, mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA pro 75 cm²-Flasche abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen in Medium resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurde das Medium bei 1600 Upm 5 min abzentrifugiert und die Zellen in Einfriermedium (95% FCS, 5% DMSO) aufgenommen (1x10⁶ bis 5x10⁶ Zellen/ml). Für die primären Endothelzellen wurde ein spezielles Einfriermedium (Cryo-SFM) der Firma Promocell verwendet. Die Zellen wurden in 1 ml Aliquots in Cryo-Röhrchen in einer speziellen Einfrierbox bei -80°C kontrolliert herunter gekühlt (1°C/min) und langfristig in -196°C kaltem Flüssigstickstoff gelagert.

Die Reaktivierung erfolgte durch zügiges Auftauen im 37°C warmen Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden dann in 15 ml frischem Medium in einer 75 cm²-Flasche aufgenommen und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und anschließend wurden die Zellen bis zur gewünschten Konfluenz weiter inkubiert.

3.1.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ermöglichte es, die Größe und Granularität einzelner Zellen innerhalb einer großen Zellpopulation zu bestimmen und dabei gleichzeitig mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern die Expression von ausgewählten Oberflächenproteinen zu charakterisieren.

Durch eine laminare Strömung gelangten die Zellen in eine Messkammer, wo sie durch monochromatisches Laserlicht gemessen wurden. Größe und Granularität (innere Struktur)

der Zelle wurden mit Hilfe von zwei Streuarten des Lichtes ermittelt. Anhand des Vorwärtstreulichtes (*Forward-Scatter*, FSC) wurde die Größe der zu messenden Zellen bestimmt. Die Intensität des Seitwärtstreulichtes (*Side Scatter*, SSC) ist sowohl von der Größe als auch von der inneren Struktur der Zelle abhängig. Hiermit ließ sich die Granularität der Zellen feststellen.

Neben diesen beiden Parametern ließen sich mit einem Vierfarben-Durchflusszytometer zusätzlich noch vier Antikörper, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, gleichzeitig bestimmen.

Dabei wurden die Fluorochrome der gebundenen monoklonalen Antikörper angeregt und emittierten Licht einer definierten Wellenlänge. Dieses wurde dann von den Sensoren des Zytometers aufgenommen und verstärkt.

Die Messergebnisse wurden in Form eines Punktwolkendiagramms, einem sogenannten Dot-Plot, dargestellt. Jede gemessene Zelle wurde als Punkt in diesem Diagramm angezeigt. Stellte man FSC gegen SSC dar, so ließ sich die Zellpopulation lokalisieren. Neben dem Dot-Plot konnte man zusätzlich ein Histogramm-Plot erstellen. Dabei wurden die gemessenen Zellen (Counts) gegen die Fluoreszenz dargestellt.

Zur Untersuchung der Expression von Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurden die Zellen 4-6 Tage in 25 cm²-Flaschen bzw. in 24-well-Platten bei 37°C unter CO₂-Begasung kultiviert. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschen- bzw. Plattenboden gelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 500 µl PBS aufgenommen und mit je 100 µl auf 5 FACS-Röhrchen verteilt. Eine Probe diente als Negativkontrolle und wurde nicht gefärbt. Zusätzlich führte man eine IC-Kontrolle mit, um unspezifische Bindungen zu minimieren. In die restlichen drei FACS-Röhrchen wurden je 20 µl des jeweiligen Antikörpers pipettiert. Das Zell-Antikörpergemisch inkubierte 60 min bei RT im Dunkeln unter kontinuierlichem Schütteln. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um FITC (Fluoreszein Isothiocyanat) -markierte Antikörper, die spezifisch an die Fcγ-Rezeptoren I, II und III binden. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 300 µl 4%igem Formaldehyd oder PBS aufgenommen. Die FACS-Messung erfolgte an einem FACSCaliburTM mit dem Programm Cell Quest Pro von Apple Macintosh.

3.2. Immunochemische Methoden

3.2.1. B19-IgG-ELISA

Der Parvovirus B19-IgG-Enzymimmunoassay (DiaSorin) diente dem quantitativen Nachweis von Parvovirus B19-IgG-Antikörpern. Er beruht auf dem Prinzip des ELISA. Sind im Serum oder in einer aufgereinigten IgG-Fraktion spezifische B19-IgG-Antikörper vorhanden, binden diese an die mit rekombinantem Parvovirus B19-VP2-Protein beschichteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte. Der nach einem Waschschrift zugegebene Meerrettichperoxidase (HRP)-markierte Anti-Human-Kaninchenantikörper bindet seinerseits spezifisch an das humane B19V-IgG. Der so gebildete Komplex wurde durch Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB), das sich in Gegenwart von Peroxidase blau färbt, nachgewiesen. Die Reaktion wurde anschließend mit 0,5 M Schwefelsäurelösung abgestoppt, wobei sich ein stabiles gelbes Endprodukt bildete. Die Farbreaktion wurde mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Mit Hilfe der gemessenen OD konnte ein Indexwert berechnet werden, der Auskunft über das Vorhandensein von B19V-Antikörpern gab.

3.3. Virologische Methoden

3.3.1. Aufreinigung des B19V-Stocks aus Patientenplasma

Für die Aufreinigung der B19V-Partikel aus Patientenplasma wurde zunächst 1 ml sterile 20%ige Saccharose-Lösung in ein Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und für 10 min bei -20°C gekühlt. Dann wurden 7 ml des virushaltigen Plasmas auf die Saccharose geschichtet und mit PBS bis auf 0,5 cm unter den Röhrchenrand aufgefüllt. Es folgte ein zweistündiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 23.700 rpm (mit Vakuum, Accel: slow, Decel: slow) in einer Ultrazentrifuge (Beckmann SW-40 Ti-Rotor). Dadurch wurden die Viruspartikel mit Hilfe der Saccharose von den Bestandteilen des Plasmas getrennt und setzten sich am Boden der Zentrifugenröhrchen ab. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgenommen und das Pellet mit den abzentrifugierten Viruspartikeln in 200 µl PBS ca. 5 min resuspendiert. Der so aufgereinigte Virusstock wurde in 10 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung des

Virustiters wurde mit 20 µl des Virusstocks eine quantitative Bestimmung der B19V-DNA durchgeführt.

3.3.2. Titerbestimmung

Um den Virustiter zu bestimmen, wurden zunächst 20 µl des aufgereinigten Virusstocks in einem Ansatz mit 10 µl 0,5 M EDTA, 50 µl 10% SDS, 415 µl TBS-Puffer sowie 5 µl Proteinase K (5 mg/ml) über Nacht bei 37°C im Schüttler (700 rpm) inkubiert. Nach dem Verdau wurde der Ansatz zunächst auf Eis gekühlt. Die anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion diente zur Abtrennung der Proteine. Hierfür wurden zur Probe 600 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und das Tube mehrfach geschwenkt. Nach der fünfminütigen Zentrifugation bei 3000 rpm und RT wurde die obere Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Tube überführt. Nach Zugabe von 600 µl Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 zur Oberphase wurde die DNA gut geschwenkt und erneut bei 3000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Die Oberphase wurde erneut abgenommen und mit 30 µl 5 M NaCl und 2 Volumina (vom Ausgangsvolumen) 100% Ethanol versetzt und gut gemischt. Anschließend wurde die DNA bei -20°C über Nacht ausgefällt. Durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C wurde die gefällte DNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und erneut bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 10 µl Wasser aufgenommen. Eine 1:10-Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 1×10^{-7} wurden in eine quantitative Real-Time-PCR (RTq-PCR) eingesetzt. Mit Hilfe der folgenden Formel ließ sich der Titer des Virusstocks berechnen.

$$\text{Titer} = \frac{\text{Mittelwert (eingesetzte Verdünnungen)} \times \text{Elutionsvolumen}(10 \mu\text{l})}{\text{eingesetzte Virusmenge} (20 \mu\text{l})}$$

3.3.3. Infektion von UT7-EpoS1, U937, EA.hy926 und verschiedenen primären Endothelzellen (HCAEC, HAoEC, HPAEC, HDMEC) mit B19V

Die Zellen wurden zunächst mit 50.000 bis 80.000 Zellen pro well in einer 24-well-Platte ausgesät und für 24 h inkubiert. Mit einer MOI von 1.000 bzw. 10.000 Partikel/Zelle wurden sie in einem Infektionsvolumen von 300 µl infiziert. Die Infektionsdauer betrug 3-6 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann 5 min

mit 100 µl Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 400 µl Medium wurde die Trypsinierung abgestoppt und die Zellen im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das verbleibende Zellpellet sofort weiter verwendet oder zunächst bei -20°C gelagert werden.

3.3.4. Infektion von UT7-EpoS1, U937, EA.hy926 und verschiedenen primären Endothelzellen (HCAEC, HAoEC, HPAEC, HDMEC) mit B19V und α -B19V-Antikörpern

Die Infektion erfolgte wie unter 3.3.3. beschrieben. Jedoch wurde eine definierte Menge an Viren (1000-10.000 Partikel/Zelle) mit einer definierten Menge an aufgereinigtem IgG pro ml (5-800 µg/ml) für 1 h bei 37°C vorinkubiert. Das Virus-Antikörper-Gemisch wurde anschließend zu den Zellen gegeben und für 3-6 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für weiterführende Versuche wie beschrieben aufgearbeitet. Für die Bindungs- und Aufnahme-Untersuchungen wurden Zellen in zwei 24-well-Platten ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Virus-IgG-Gemisch angesetzt und für 1 h bei 37°C vorinkubiert. Danach folgte die Infektion der Zellen auf Eis und die einstündige Inkubation bei 4°C. Die Zellen der ersten Platte (Bindung) wurden direkt im Anschluss geerntet und die Zellpellets bei -20°C gelagert. Die Zellen der zweiten Platte (Aufnahme) wurden nach der Inkubation bei 4°C mit PBS gewaschen, mit neuem Medium versorgt und bei 37°C für 2 h weiter inkubiert. Anschließend erfolgte auch hier die Zellernte. Die DNA der Proben wurde isoliert und mit Hilfe der RTq-PCR die B19V-Partikel bestimmt. Für die Kompetitionsversuche wurden die Zellen nach dem Aussäen in 24-well-Platten ebenfalls für 24 h inkubiert und anschließend für 1 h bei 4°C mit aufgereinigten unspezifischen Antikörpern (400-1600 µg/ml) bzw. mit spezifischen Antikörpern (5-10 µg/ml) gegen Fc γ -Rezeptoren behandelt. Dadurch wurden die Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche blockiert. Nach der Antikörper-Behandlung wurden die Zellen wie oben bereits beschrieben mit dem Virus-IgG-Gemisch infiziert und nach einer dreistündigen Inkubation bei 37°C geerntet. Anschließend wurde die DNA isoliert und mittels RTq-PCR die B19V-Partikel bestimmt.

3.4. Proteinbiochemische Methoden

3.4.1. IgG-Aufreinigung aus Seren mittels HPLC

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-(flüssigkeits-) chromatographie)) ist eine der schnellsten und einfachsten Methoden, um ein Gemisch in seine einzelnen Bestandteile aufzutrennen.

Das aus Vollblut gewonnene Serum wurde für die IgG-Aufreinigung mit Hilfe der HPLC zunächst für 10 min bei 10.000 rpm bei RT zentrifugiert und anschließend filtriert (45 µm-Filter). Das vorbehandelte Serum wurde 1:1 mit Bindungspuffer verdünnt. Die Antikörperanreicherung erfolgte über eine Protein G-HP-Säule der Firma GE Healthcare mittels HPLC nach Herstellerprotokoll. Mit Hilfe des Bindungspuffers (0,02 M Natriumphosphat pH 7) wurde die Säule mit dem Serum beladen und anschließend mehrfach gespült. Dadurch wurden nicht erwünschte Serumbestandteile entfernt, während in der Säule die Antikörper gebunden wurden. Der saure Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCL pH 2,7) löste die Antikörper von der Säule und der Chromatograph fraktionierte die gewonnen Antikörper in einem Volumen von 1 ml. Um einen neutralen Puffer zu erhalten, in dem die Antikörper gelagert werden konnten, wurde in die 15 ml-Falcons, die als Auffanggefäße fungierten, ein Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCL pH 9) vorgelegt. Die erhaltenen Fraktionen wurden bei -20°C gelagert.

3.4.2. Messung der Proteinkonzentration der aufgereinigten IgG-Fraktionen

Die Proteinbestimmung der IgG-Fraktionen wurde mit Hilfe des Biorad®Protein-Assay Kits durchgeführt. Dieser Protein-Assay basiert auf der Methode von Bradford und ist eine der einfachsten und genauesten Möglichkeiten, um die Konzentration einer Proteinlösung zu bestimmen. Es handelt sich um einen Farbstoff-Bindungs-Assay, bei dem sich die Farbe der Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ändert. Die maximale Absorption der Coomassie Brilliant Blau G-250-Färbelösung bei der Bindung an Proteine liegt bei einer Wellenlänge zwischen 465 nm und 595 nm. Durch einen Vergleich der Absorption einer Standard-Probe bei 595 nm wird die Berechnung der Proteinkonzentration ermöglicht.

Die 5x Protein-Assay-Lösung von BioRad wurde für die Färbung 1:5 mit 1x PBS verdünnt. Als Negativkontrolle bzw. Blankwert diente 1 ml der 1x Färbelösung. Die Positivkontrolle, die gleichzeitig als Standard diente, setzte sich aus 999 µl 1x Färbelösung

und 1 µl einer BSA-Lösung (10 mg/ml) zusammen. Es wurden je 5 µl Probe zu 995 µl 1x Färbelösung gegeben, gevortext und 10-50 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OD bei 595 nm bestimmt.

Die Proteinkonzentration berechnete man mit folgender Formel:

$$\text{Proteinkonzentration } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{Standardkonzentration } (\mu\text{g/ml}) \times \text{OD}_{595\text{nm}} \text{ der Proteinprobe}}{\text{OD}_{595\text{nm}} \text{ des Standards}} \times 200$$

Der Standard in der Färbelösung war 1:1000 verdünnt und besaß somit eine Endkonzentration von 10 µg/ml. Die Proteinproben waren 1:200 in der Färbelösung verdünnt.

3.4.3. Zellkernfraktionierung

Für die Zellfraktionierung wurden zunächst 700.000 Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Infektion wurde wie unter 3.3.4. durchgeführt. Das Infektionsvolumen betrug 1,5 ml pro 6 cm-Schale. Nach 3,5 h Infektion wurde das Medium gewechselt und die Inkubation für 24 h bei 37°C fortgesetzt. Die anschließende Zellfraktionierung erfolgte durch eine hypotonische Lyse mit nachfolgender Hochsalzextraktion. Dabei wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37°C trypsinisiert. Durch die Zugabe von 3 ml Medium wurde die Trypsinierung abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen erneut mit 1 ml PBS gewaschen. Die anschließende Zentrifugation fand bei 13.000 rpm für 1 min (4°C) statt. Nachdem der Überstand entfernt wurde, resuspendierte man das Zellpellet in 100 µl hypotonischen Lysepuffer A und inkubierte die Suspension für 15 min auf Eis. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 4°C mit 15.000 rpm. 50 µl des Überstandes (zytoplasmatische Fraktion) wurden abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die restlichen 50 µl Überstand wurden verworfen. Diese Lysereaktion wurde drei Mal wiederholt, so dass insgesamt 150 µl der zytoplasmatischen Fraktion entstanden. Das verbliebene Pellet, bestehend aus den Zellkernen, wurde 3x mit 300 µl Lysepuffer A gewaschen und anschließend bei 4°C für 1 min und 15.000 rpm zentrifugiert. Dadurch wurden zytoplasmatische Bestandteile restlos entfernt. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in 30 µl Hochsalzpuffer C resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension 20 min bei 15.000 rpm und 4°C

zentrifugiert. Durch die Extraktion mit einer Hochsalzlösung wurden die Kernmembranen aufgebrochen und die DNA in die Lösung entlassen. Nach der Zentrifugation wurden 20 µl des Überstandes (Zellkernfraktion) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fraktionen für die DNA-Bestimmung wurden bei -20°C und die Proben für die Proteinbestimmung bei -80°C gelagert.

3.4.4. Fab-Fragment-Präparation

Mit Hilfe der Antikörperspaltung in Fab-Fragmente und Fc-Teil wurde untersucht, ob die Bindung des Antikörpers an die Rezeptoren der Zelloberfläche Fc-spezifisch ist. Für die Antikörperspaltung mit anschließender Fab-Aufreinigung wurde das *Pierce Fab Preparation Kit* (Thermo Scientific) verwendet.

Es wurden 500 µl der aufgereinigten IgG-Fraktion (α -B19V-Antikörper) für die Präparation verwendet. Die IgG-Probe wurde zunächst mit Hilfe einer Säule (Zeba Desalt Spin Column) entsalzt. Dazu wurde die Säule zunächst mit 1 ml Verdau-Puffer (10 ml Fab-Verdau-Puffer mit 35 mg Cystein HCL, frisch angesetzt) equilibriert und bei 1000 rpm für 2 min zentrifugiert. Nach dem Waschen der Säule mit dreimal 1 ml Verdau-Puffer wurde die IgG-Probe langsam in die Mitte der Säule pipettiert und für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die entsalzte Probe wurde im Anschluss über eine Papain-Säule verdaut. Dafür wurde die Säule zunächst mit einer Papain-Suspension behandelt und anschließend mit 500 µl Verdau-Puffer gewaschen. Die präparierte Säule wurde mit den vorbehandelten 500 µl IgG-Probe beladen und auf beiden Seiten fest verschlossen. Es folgte eine Inkubation über Nacht (18 h) bei 37°C auf einem Schüttler. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm für 1 min. wurde die verdaute IgG-Fraktion aus der Säule entfernt. Die Säule wurde mit 500 µl PBS gewaschen und der Durchfluss wurde mit den 500 µl der IgG-Probe zusammengeführt. Aus der erhaltenen Probe mit einem Endvolumen von 1 ml wurden im Anschluss mit Hilfe einer Nab Protein A-Säule die Fab-Fragmente aufgereinigt. Die Säule wurde mit 2 ml PBS equilibriert und anschließend die Probe aufgetragen. Nach dem Verschließen der Säule folgte eine Inkubation von 20 min bei RT auf dem Überkopfschüttler. Die Säule wurde bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss, der die aufgereinigten Fab-Fragmente enthielt, wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurde die Säule noch zweimal mit 1 ml PBS gespült und der Durchfluss separat gesammelt. Mit Hilfe des IgG-Elutionspuffers wurden die gebundenen Fc-Fragmente aus der Säule herausgelöst. Somit konnte die Säule nach Reinigung mit Elutionspuffer und PBS (0,02% Natriumacetat) wiederverwendet werden.

Die Proteinkonzentration der Fab-Fraktionen wurde mit Hilfe des BioRad®Protein-Assay Kit bestimmt. Die Reinheit der Fab-Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die aufgereinigten Fab-Fragmente wurden anschließend im Infektionsversuch eingesetzt.

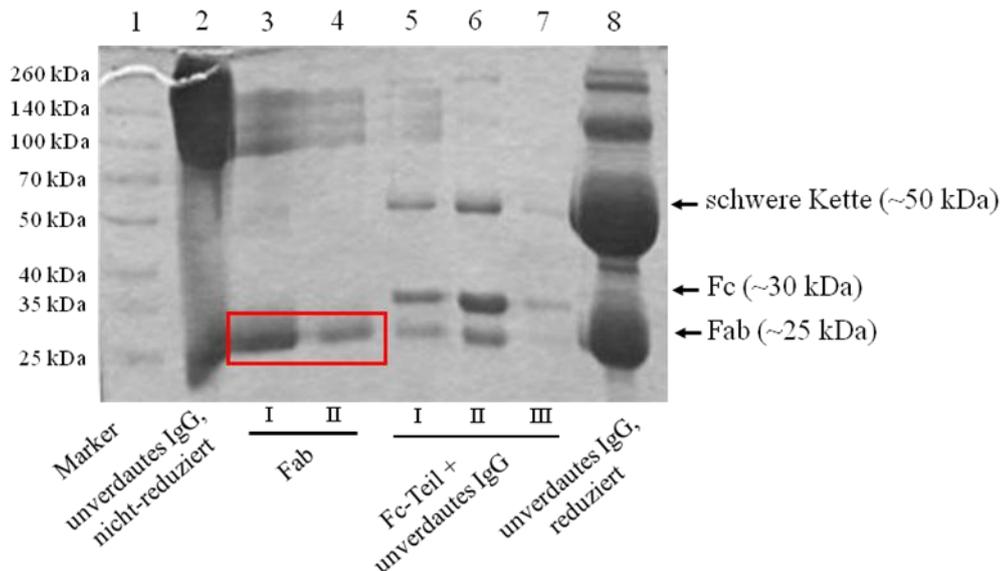


Abb. 3.1 Humanes IgG im SDS-PAGE (10%) mit anschließender Coomassie-Färbung. Die unverdauten und aufgereinigten Fab-Fragmente sind unter reduzierenden Bedingungen deutlich bei einer Größe von 25 kDa (Spur 3 und 4) im Gel zu sehen. In Probe 5, 6 und 7 sind die verdauten, noch nicht aufgereinigten Antikörper ebenfalls unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Man kann deutlich die aufgetrennten Fab-Fragmente (25 kDa) und den Fc-Teil (30 kDa), sowie noch unverdautes IgG (50 kDa) erkennen. Als Kontrollen wurde unverdautes IgG unter nicht-reduzierenden (Spur 2) und reduzierenden (Spur 8) Bedingungen mitgeführt. Der DNA-Marker wurde in Spur 1 aufgetragen

3.4.5. Proteinextraktion von infizierten Zellen

Um die Reinheit der Zellkernfraktionierung zu überprüfen, wurden Proteinextrakte von zytoplasmatischen Fraktionen sowie Kernfraktionen B19V-infizierter Zellen hergestellt. Je 10 µl der Fraktionen wurden mit 10 µl 2x Proteinprobenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Durch den Proteinprobenpuffer wurden die Proteine in der Lösung denaturiert. Zudem konnte das SDS an hydrophobe Proteinregionen binden, wodurch alle Proteine gleich stark negativ geladen wurden. Zusätzlich wurden Disulfidbrücken durch das Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol gespalten. Die Proteinextrakte konnten sofort mittels SDS-PAGE aufgetrennt oder bei -20°C gelagert werden.

3.4.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglichte das Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dabei wurde das SDS-haltige, diskontinuierliche Puffersystem nach Laemli verwendet. In der SDS-PAGE wanderten die negativ geladenen Proteine (durch das SDS) in einem elektrischen Feld zur Anode und wurden dabei aufgrund der Überdeckung ihrer Eigenladung nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Für die Herstellung eines Proteingels wurden zunächst zwei Glasplatten mit zwei Abstandshaltern links und rechts übereinander gelegt und in eine Gießapparatur eingespannt. Anschließend wurden die Trenn- und Sammelgellösungen pipettiert. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine mussten verschiedene prozentige Trenngele angefertigt werden. Die Trenngellösung wurde zuerst zwischen die Platten pipettiert, wobei 1-2 cm bis zur Oberkante für das Sammelgel ausgespart blieben. Damit man eine glatte Trenngelkante erhielt, wurde die Trenngellösung mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen und die Sammelgellösung auf das Trenngel pipettiert. Dabei wurde ein Kamm zwischen die Platten gesetzt, wodurch Aussparungen im Sammelgel verblieben. Diese dienten später dem Auftragen der Proben. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das fertige Proteingel sofort für die Elektrophorese eingesetzt. Eine Lagerung der Gele bei 4°C in feuchten Tüchern war jedoch auch möglich.

Tab. 3.1. : Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (Ansätze für 4 Proteingele)

Chemikalien	10% Trenngel	8% Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid	10 ml	8 ml	3,0 ml
SDS-Gel Lösung B	7,5 ml	7,5 ml	-
SDS-Gel Lösung C	-	-	5,0 ml
Wasser	12,3 ml	14,3 ml	11,8 ml
10% APS	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	40 µl	40 µl	40 µl

Für die Gelelektrophorese wurde das Proteingel in eine Gelkammer eingespannt und die Puffertanks mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Im Anschluss daran wurden die Taschen des

Gels mit ca. 15 μl der Proteinextrakte beladen. Zusätzlich erfolgte die Beladung einer Tasche mit 5 μl eines Protein-Größenmarkers. Danach wurde eine Stromquelle angeschlossen. Im Sammelgel liefen die Proben bei einer Stromstärke von 12 mA pro Gel. Erreichten die Proteine das Trenngel konnte die Stromstärke auf 18 mA erhöht werden. War die Lauffront am unteren Gelrand angelangt, wurde die Elektrophorese gestoppt. Die so aufgetrennten Proteine wurden im Western-Blot analysiert.

3.4.7. Western-Blot-Analyse

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse lassen sich Proteine durch spezifische Antikörper nachweisen. Dazu wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte unter der Verwendung des SemiDry-Elektroblotting-Verfahren.

Zunächst wurden 6x 3MM Whatmanpapierstücke und eine Nitrocellulosemembran auf Gelgröße (Trenngel: 5 cm x 9 cm) zugeschnitten. Diese wurden anschließend in 1x Protein-Transferpuffer getränkt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde vorbereitet, indem das Sammelgel vom Trenngel abgespalten und das Trenngel kurz in Transferpuffer getaucht wurde. Auf der unteren Elektrode der SemiDry-Blotapparatur (Anode) wurde der Blot in einer bestimmten Reihenfolge übereinander angeordnet. Zuerst wurden drei Lagen 3MM Whatmanpapier auf die Anode gelegt, dann folgte die Nitrocellulosemembran, darüber das Trenngel gefolgt von den letzten drei Lagen 3MM Filterpapier. Mit Hilfe einer Glaspipette, die man vorsichtig über den angeordneten Blot rollte, wurden die Luftblasen entfernt. Anschließend wurde der Deckel der Blotapparatur (mit der Kathode) aufgesetzt und eine Stromstärke von 45 mA pro Gel für 90 min angelegt. Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese für 90 min bei RT oder bei 4°C über Nacht in einer Blocklösung (6% Milch) schwenkend inkubiert. Dadurch wurden freie Stellen auf der Membran abgesättigt.

Nach dem Blocken wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch an die zu detektierenden Proteine bindet. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden 1:2000 (α -Tubulin) bzw. 1:1000 (α -MCM7) in 6% Milch/0,3% Tween20 verdünnt und zusammen mit der Membran in Folie eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 90 min oder bei 4°C über Nacht auf dem Überkopfschüttler. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 5 min in PBS-T gewaschen, dadurch wurden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Danach wurde die Membran mit dem

Sekundärantikörper inkubiert. Dieser erkennt spezifisch den Primärantikörper. Der hier benutzte Sekundärantikörper wurde 1:2000 (goat α -mouse-HRP) in 6% Milch/0,3% Tween20 verdünnt und mit der Membran in Folie für 1 h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Es folgte erneut ein Waschschriff für dreimal 10 min in PBS-T. Die durch Antikörper gebundenen Proteine auf der Membran wurden mittels Chemilumineszenz (ECL) detektiert. Dabei wurden die zwei Lösungen des *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate-Kits* (Pierce) 1:1 gemischt, auf die Membran aufgetragen und für 60 s inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase reduzierte das in den Lösungen enthaltene Wasserstoffperoxid, dabei wurde Luminol oxidiert, was wiederum zu einer Lichtemission führte. Diese Reaktion wurde durch das Auflegen eines Röntgenfilms auf die Membran visualisiert. Nach einer Expositionszeit von 5 s bis 10 min wurde der Film entwickelt, dabei erschienen die zu detektierenden Proteine als schwarze Banden auf dem Röntgenfilm.

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. DNA-Isolation aus Säugerzellen

Um die Menge der B19V-Partikel in infizierten Endothelzellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von B19V-spezifischen Antikörpern zu bestimmen, wurde die Gesamt-DNA der infizierten Zellen isoliert.

Die Isolation erfolgte mit Hilfe des Pure Link™ Genomic DNA Mini Kits von Invitrogen entsprechend des Herstellers. Das in PBS gelöste Zellpellet wurde zunächst mit Proteinase K und dem im Kit enthaltenen Lysepuffer für 10 min bei 55°C verdaut. Durch die Zugabe von 100% EtOH wurde die DNA in der Probe gefällt. Anschließend pipettierte man den Reaktionsansatz auf eine DNA-bindende Säule. Durch eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min wurde die DNA auf die Säule geladen. Es folgten zwei Waschschriffe mit dem *PureLink™ Genomic* Waschpuffern 1 und 2. Die so isolierte genomische DNA wurde mit 50 μ l des Elutionspuffers durch eine erneute Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 min eluiert.

3.5.2. DNA-Konzentrationsbestimmung

Bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum. Durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen Wasser oder den entsprechenden Puffer als Leerwert ließ sich die Nukleinsäurekonzentration näherungsweise wie folgt bestimmen: Nukleinsäurekonzentration ($\mu\text{g/ml}$) = Faktor X \times A_{260} , wobei der Faktor X bei Doppelstrang-DNA 50 und bei Oligonukleotiden 33 ist.

Verunreinigungen durch Phenolreste oder Proteine absorbieren stark bei 280 nm. Somit ließ sich die Reinheit einer Nukleinsäurepräparation anhand des Quotienten A_{260}/A_{280} ermitteln. Der Wert des Quotienten sollte immer zwischen 1,8 und 2 liegen.

In dieser Arbeit wurden die DNA-Konzentrationsbestimmungen mit Hilfe des NanoDrop[®]ND-1000 Spectrophotometer durchgeführt. Für die anschließende RTq-PCR wurde die DNA-Konzentration auf 50 ng, bezogen auf das in die PCR eingesetzte Volumen, eingestellt.

3.5.3. Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RTq-PCR)

Die RTq-PCR wurde verwendet, um die Transkription definierter Gene zu bestimmen. Sie ließ sich wie eine nicht-quantitative PCR in drei Einzelschritte unterteilen, die zyklisch durchlaufen wurden. Im ersten Schritt, der sogenannten Denaturierung, wurden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge (Annealing). Im letzten Schritt, der Elongation, vervollständigte die DNA-Polymerase mit Hilfe von Nukleotiden die Einzelstränge zu zwei neuen Doppelsträngen.

Um die entstehenden PCR-Produkte in „*real-time*“ zu messen, wurden kurze DNA-Fragmente (Sonden), deren Sequenz so ausgesucht wurde, dass sie zwischen den Primern mit der DNA des PCR-Produktes hybridisieren, verwendet. An den Enden der Sonde waren Fluoreszenzfarbstoffe gebunden. Am 3'-Ende befand sich der *Quencher* (Q) und am 5'-Ende der *Reporter* (R). Befanden sich beide Farbstoffe in räumlicher Nähe, d.h., lag die Sonde entweder frei in intakter oder in einer an einzelsträngige DNA gebundenen Form vor, reduzierte der *Quencher* die Fluoreszenz des *Reporters*. Es konnte also keine Fluoreszenzemission gemessen werden. Die Sonden banden analog zu den Primern bei jedem Annealing-Schritt an die denaturierten DNA-Einzelstränge. Bei der Elongation spaltete die DNA-Polymerase die gebundene Sonde aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität in einzelne Nukleotide, während sie die Polymerasetätigkeit

fortsetzte. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden räumlich voneinander getrennt. Nach Laseranregung konnte die Fluoreszenzemission des *Reporters* gemessen werden. Ihre Intensität war das Maß für die Anzahl der Elongationsreaktionen und der Menge an gebildetem PCR-Produkt, die vom TaqMan® Cyclyer gemessen wurde. In Abbildung 3.2 ist das TaqMan-Prinzip schematisch dargestellt.

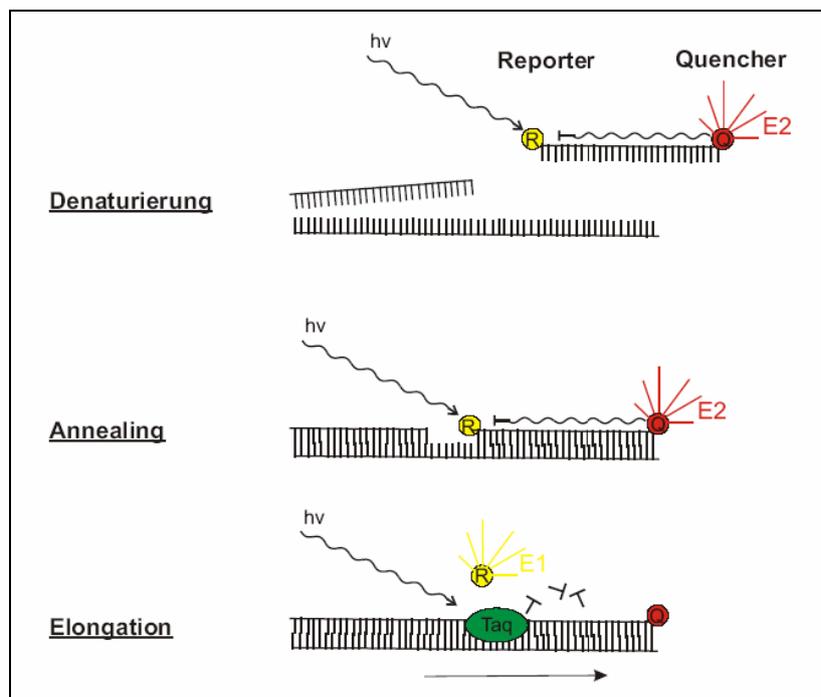


Abb. 3.2 Schematische Darstellung des TaqMan-Prinzips. An die Enden der Sonde sind zwei Fluorochrome gebunden. Der Reporterfarbstoff befindet sich am 5'-Ende, der Quencherfarbstoff am 3'-Ende. Ist die Sonde intakt an die einzelsträngige DNA gebunden, d.h. befinden sich *Reporter* und *Quencher* in räumlicher Nähe, absorbiert der *Quencher* das vom *Reporter* emittierte Licht. Während der Elongationsphase trifft die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert sie. Der *Reporter* befindet sich nun nicht mehr in räumlicher Nähe zum *Quencher*. Die emittierte Fluoreszenz ($E1$) kann gemessen werden (<http://ipj.quintessenz.de>).

Bei der quantitativen Real-Time-PCR unterscheidet man zwischen der absoluten und der relativen Quantifizierung. Bei der hier verwendeten absoluten Quantifizierung wurde die absolute Menge des Zielgens pro Zelle bestimmt. Dazu wurde bei jeder Messung eine Standard-Reihe mitgeführt, welche aus der dekadischen Verdünnungsreihe eines dem entsprechenden B19V-Sequenzbereich enthaltenen Plasmids bestand. Zusätzlich wurde ein Referenzgen, das sogenannte *housekeeping* Gen, dessen Expression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen unverändert bleibt, in die Quantifizierung einbezogen. Damit wurden Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA ausgeglichen. In dieser Arbeit wurde β -Aktin als Referenzgen verwendet.

Die RTq-PCR-Ansätze wurden im Doppelansatz durchgeführt und sahen wie folgt aus:

Ansatz für B19V:	Ansatz für β -Aktin:
10 μ l TaqMan Gene Expression MasterMix	10 μ l TaqMan Gene Expression MasterMix
2,4 μ l as-Primer (60 ng/ μ l)	0,8 μ l forward-Primer
2,4 μ l s-Primer (60 ng/ μ l)	0,8 μ l reverse-Primer
1,2 μ l Wasser	4,4 μ l Wasser
0,8 μ l MGB-Sonde (5 pM)	0,8 μ l Sonde
3,2 μ l Probe (30-50 ng)	3,2 μ l Probe

Der B19V-RTq-PCR-Ansatz wurde im TaqMan® Cyclyer nach folgendem Programm inkubiert:

Segment I:	Initialaktivierung des Enzyms:	95°C	10 min
Segment II (38 Zyklen):	Denaturierung:	95°C	15 s
	Annealing und Elongation:	57°C	1 min
Segment III	Kühlung:	4°C	∞

Der β -Aktin-RTq-PCR-Ansatz wurde im TaqMan® Cyclyer nach folgendem Programm inkubiert:

Segment I:	Initialaktivierung des Enzyms:	95°C	10 min
Segment II (40 Zyklen):	Denaturierung:	95°C	15 s
	Annealing und Elongation:	60°C	1 min
Segment III	Kühlung:	4°C	∞

Statistische Auswertung

Die B19V-Kopienzahl pro Zelle ergab sich wie folgt:

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

$$1a. \text{ korrigierte DNA-Menge} = \frac{\beta\text{-Aktin-Kopien pro TaqMan-Ansatz}}{\text{Mittelwert (Kopienzahl}_{\beta\text{-Aktin}} \text{ aller Proben)}} \times \text{eingesetzte DNA-Menge (ng)}$$

$$2. \text{ B19V-Kopien pro Zelle} = \frac{\text{B19V-Kopienzahl jeder Probe}}{\text{Zellzahl pro TaqMan-Ansatz}}$$

Für die Berechnung der B19V-Kopien pro Zelle wurde zunächst die Zellzahl pro TaqMan-Ansatz ermittelt. Dafür wurde der korrigierte DNA-Gehalt (ng) pro Probe mit dem DNA-Gewicht (0,068 ng) pro Zelle dividiert. Die Korrektur der eingesetzten DNA-Menge mit Hilfe des Mittelwertes von β -Aktin wurde, wie bereits oben im Text beschrieben, durchgeführt, um Ungenauigkeiten bei der Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop auszugleichen. Die B19V-Kopienzahl pro Zelle ergab sich aus der Division der B19V-Kopien pro TaqMan-Ansatz durch die errechnete Zellzahl pro TaqMan-Ansatz.

3.5.4. RNA-Isolation aus Säugerzellen

Um die Transkription von B19V-mRNA in infizierten Endothelzellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von B19V-spezifischen Antikörpern zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des TRIzol[®] Reagenz isoliert. Das Reagenz enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat (GTC). Das chaotrope GTC führte zur Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert wurden. Mit Hilfe des Phenols wurden im sauren Milieu die denaturierten Proteine sowie kleine DNA-Fragmente aus dem Lysat entfernt.

Das Kulturmedium der infizierten Zellen wurde zunächst abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 μ l (für 24-well-Platten) der Trizol-Lösung auf die Zellen gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Das so entstandene Zelllysate wurde durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Direkt im Anschluss war es möglich, die RNA zu isolieren oder das Zelllysate bei -20°C zu lagern.

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion. Dabei wurden 100 µl Chloroform zu jeder Probe (pro 500 µl TRIzol-Reagent) gegeben, 15 s gevortext und 2-3 min bei RT inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C wurde die obere wässrige Phase (enthält RNA) möglichst vollständig (ca. 250 µl) abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zum Ausfällen der RNA wurden 250 µl Isopropanol zu der wässrigen Phase pipettiert, gevortext und für 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für weitere 10 min bei RT inkubiert und dann bei 14000 rpm bei 4° für 10 min zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat wurde als weißliches Pellet sichtbar. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 75% EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, 4°C) und der Überstand restlos entfernt. Das RNA-Pellet wurde bei 55°C im Heizblock mit geöffnetem Deckel bis zur Transparenz getrocknet und in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Durch eine erneute Inkubation bei 55°C für 10 min wurde die RNA vollständig gelöst. Die Proben konnten jetzt direkt in den DNase-Verdau eingesetzt werden oder bei -80°C gelagert werden.

3.5.5. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte ebenfalls mit dem NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer (siehe DNA-Konzentrationsbestimmung). Jedoch betrug der Faktor X bei einzelsträngiger RNA 40.

3.5.6. DNase-Verdau

Der DNase-Verdau wurde mit Hilfe des Turbo DNase Kit der Firma Ambion durchgeführt. Es wurde folgender Ansatz verwendet:

2 µl 10x Reaction Puffer

1 µl (2 unit) Turbo DNase

X µl (2 µg) RNA

Der Verdau-Ansatz wurde auf ein Endvolumen von 50 µl mit H₂O aufgefüllt.

Der Verdau wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion fügte man zu jeder Probe 1 µl Stop-Lösung (0,5 M EDTA) hinzu und inkubierte diese für weiter

10 min bei 75°C. Bis zum Umschreiben in cDNA wurden die Proben auf Eis bzw. bei -20°C gelagert.

3.5.7. Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion

Mit der RT wurde die RNA in cDNA (c = *complementary*) umgeschrieben. Der Reaktionsansatz enthält eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase), dNTPs (Gemisch aller vier Nukleotid-Triphosphate) und als Primer ein Zufalls-Hexamer-Gemisch (Gemisch aller kombinatorisch möglichen 6 bp großen Oligonukleotide, die in statistischer Weise entlang der gesamten RNA binden können). In die RT wurden 500 ng RNA eingesetzt, das entsprach 12,5 µl des DNase-Verdau-Ansatzes. Alle Arbeiten mussten auf Eis durchgeführt werden, da die Reverse Transkriptase bereits bei RT aktiv ist. Für die RT wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems verwendet. Der RT-Ansatz für eine Probe sah wie folgt aus:

12,5 µl des DNase-Verdau (entspricht 500 ng RNA, Endkonzentration der RNA 25 ng/µl)

2 µl 10x RT-Puffer

0,8 µl 25x dNTP-Mix (100 mM, Endkonzentration 4 mM)

2 µl 10x random primer (Hexamer-Primer)

1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase (MuLV)

4,2 µl H₂O

Der RT-Ansatz wurde im Thermocycler mit diesem Programm inkubiert:

25°C, 10 min

37°C, 2 h

85°C, 5 s

4°C, ∞

Um DNA-Kontaminationen durch einen unvollständigen DNase-Verdau auszuschließen, wurde bei der RT-PCR zu jeder Probe ein paralleler Ansatz ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

3.5.8. Quantitative Real-Time-PCR (RNA-Proben)

Wie bereits bei der Bestimmung der B19V-Partikel in infizierten Zellen erfolgte für die Analyse der B19V-mRNA nach der RT-PCR eine RTq-PCR. Als *housekeeping*-Gen wurde auch hier β -Aktin verwendet.

Die RTq-PCR-Ansätze zur mRNA-Bestimmung wurden ebenfalls im Doppelansatz durchgeführt und sahen wie folgt aus:

Ansatz für VP2; 11-kDa; NS1:	Ansatz für β -Aktin:
10 μ l TaqMan Gene Expression MasterMix	10 μ l TaqMan Gene Expression MasterMix
2,4 μ l as-Primer (60 ng/ μ l)	0,8 μ l forward-Primer
2,4 μ l s-Primer (60 ng/ μ l)	0,8 μ l reverse-Primer
1,2 μ l Wasser	4,4 μ l Wasser
0,8 μ l Sonde (5 pM)	0,8 μ l Sonde
3,2 μ l Probe (40 ng)	3,2 μ l Probe

Der VP2-RTq-PCR-Ansatz wurde im TaqMan® Cyclyer nach folgendem Programm inkubiert:

Segment I:	Initialaktivierung des Enzyms:	95°C	10 min
Segment II (45 Zyklen):	Denaturierung:	95°C	15 s
	Annealing und Elongation:	50°C	1 min
		68°C	1 min
Segment III	Kühlung:	4°C	∞

Die 11-kDa-, NS1- und β -Aktin-RTq-PCR-Ansätze wurden im TaqMan® Cyclyer nach folgendem Programm inkubiert:

Segment I:	Initialaktivierung des Enzyms:	95°C	10 min
Segment II (45 Zyklen):	Denaturierung:	95°C	15 s
	Annealing und Elongation:	60°C	1 min
		4°C	∞
Segment III	Kühlung:	4°C	∞

Statistische Auswertung

Die Auswertung der mRNA-Genexpression erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Bei dieser relativen Quantifizierung wurde das Verhältnis der Menge an RNA/cDNA in Probe 1 zu der Menge an RNA/cDNA in Probe 2 bestimmt. Es wurde neben der eigentlichen Zielsequenz (Probe 1 = α -B19V-IgG und B19V-infizierte Zellen) auch eine Referenzprobe (Probe 2 = B19V-infizierte Zellen) mitamplifiziert. Die Berechnung für die quantitative Veränderung der Genexpression in Bezug zum Referenzgen wurde wie folgt durchgeführt:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_X - \Delta CT_R$$

ΔCT_X = normalisierter CT-Wert für das Zielgen

ΔCT_R = normalisierter CT-Wert für das Referenzgen

RQ (Relative Quantifizierung) = $2^{-\Delta\Delta CT}$

FC (Fold Change) = wenn (RQ>1; 1*RQ; -1/RQ)

FC = quantitative Veränderung der Genexpression in Bezug zum Referenzgen

3.5.9. Southern-Bot-Analyse

3.5.9.1. HIRT-DNA-Extraktion

Für die Replikationsanalyse wurden die Zellen zunächst in 6 cm-Schalen ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Infektion der Zellen mit B19V wie unter Punkt 3.3.4. beschrieben. Nach einer Infektionszeit von 3 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurde mit Hilfe der HIRT-Extraktion die extrachromosomale DNA isoliert. Hierfür wurden die Zellen zunächst vom Medium befreit und zweimal mit je 3 ml PBS gewaschen. Anschließend schabte man die Zellen in 3 ml PBS ab und überführte sie in 15 ml-Falcon-Röhrchen. Es folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm und RT. Das Zellpellet wurde in 2 ml Lysepuffer resuspendiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat auf Eis gestellt. Unter ständigem Vortexen wurden zu jeder Probe 500 μ l NaCl (5 M) tropfenweise zugeben, dabei bildete sich ein weißer Niederschlag. Die Lysate wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C. Der erhaltene Überstand wurde mit 2 ml Chloroform extrahiert und die Oberphase (ca. 2 ml) mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 (200 μ l) und 2,5 Vol. absolutem EtOH (5,5 ml) für mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Die gefällte DNA konnte nun bei 14.000 rpm, 4°C, für 10 min abzentrifugiert werden. Das so erhaltene DNA-Pellet wurde mit 3 ml 70% EtOH

gewaschen und im Anschluss luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer pH 7,6 aufgenommen und die Konzentration der DNA mit Hilfe des NanoDrop (OD bei 260 nm) bestimmt.

Um frisch replizierte DNA zu analysieren, wurden die isolierten DNA-Extrakte mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Dieses Enzym schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, lässt unmethylierte DNA aber intakt. So wurde die ursprünglich eingesetzte DNA durch DpnI abgebaut, wohingegen die in den eukaryotischen Zellen neusynthetisierte DNA unerkannt blieb. In einem 20 µl-Ansatz wurden 4 µg der aufgereinigten DNA mit Dpn I (40 Units) und dem dazugehörigen Puffer für 2 h bei 37°C im Heizblock verdaut und vor der Elektrophorese mit 0,4 µl RNase (1 mg/ml) für 15 min bei RT behandelt.

3.5.9.2. Kapillar-Blot

Die verdaute DNA wurde auf ein Midori Green gefärbtes Agarose-Gel der entsprechenden Konzentration aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Das Gel wurde im Anschluss für genau 10 min mit 0,25 M HCL-Lösung behandelt, dabei wurde die DNA depuriniert. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurde das Gel dreimal 30 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl inkubiert. Dadurch wurde die DNA denaturiert. Das Gel wurde erneut zweimal mit Aqua dest. gewaschen und anschließend dreimal 30 min mit 0,5 M TRIS-HCL pH 7,0/1,5 M NaCl behandelt, um die DNA zu neutralisieren. Der Kapillar-Transfer der DNA auf eine Nylonmembran NYTRAN®N erfolgte über Nacht in 25 mM Phosphat-Puffer pH 6,8. Dafür wurden 2 Lagen 3MM-Whatman-Papier in das Puffer-Reservoir eingetaucht, das Gel darauf platziert, dann die Membran und anschließend zwei weitere Lagen feuchtes 3MM-Whatman-Papier darauf gegeben. Es folgten 2 trockene Lagen des 3MM-Whatman-Papiers sowie ein Stapel Papiertücher. Das Ganze wurde mit Hilfe einer leeren Schottflasche beschwert.

3.5.9.3. Biotin-(11-dUTP)-Markierung von DNA-Sonden

Vor der Hybridisierung der Membran wurde ein B19V-DNA-Fragment (SalI-verdautes pM20, 5,6 kb) mit Hilfe des Biotin DecaLabel DNA Labeling Kits mit Biotin markiert. Dafür wurden 100 bis 200 ng DNA mit H₂O auf 34 µl aufgefüllt und 10 µl 5x Reaktionspuffer hinzugegeben. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei 95°C. Anschließend wurde die Sonde auf Eis gestellt und 5 µl des Biotin Labeling Mix (1 mM

dGTP, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM Biotin-11-dUTP) hinzugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation der Sonde bei 37°C wurde die Reaktion mit 1 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Die markierte Sonde wurde direkt für die Hybridisierung eingesetzt.

3.5.9.4. Hybridisierung von Southern-Blots

Nach dem Transfer wurde die Membran für 10 min auf 3MM-Papier getrocknet und anschließend mit Hilfe des Strata-Linker UV-fixiert. Es folgte eine Vorhybridisierung des Blots in einer Glasröhre mit Hybridisierungslösung für 1 h bei 42°C im Hybridisierungssofen.

Die eigentliche Hybridisierung erfolgte mit 5 ml Hybridisierungslösung, welche mit der hitzedenaturierten Sonde bei 42°C über Nacht versetzt wurde. Um die Bindung der Sonde zu verstärken, ist auch eine längere Hybridisierungszeit möglich. Anschließend wurde die Membran mit verschiedenen Lösungen in der Glasröhre gewaschen. Zum Herausverdünnen der Sonde wurde die Membran viermal für 10 min mit 2x SSC/0,1% SDS bei 42°C gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 0,1x SSC/0,1% SDS bei 55°C für zweimal 30 min.

3.5.9.5. Detektion Biotin-11-dUTP markierter DNA-Sonden mit Streptavidin-HRP und ECL

Zunächst wurde die Membran zweimal mit 20 ml PBS (5% SDS/5% Milch) für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Das *High Sensitivity Streptavidin-HRP* (Thermo Scientific) wurde 1:10.000 in PBS (5% SDS/5% Milch) verdünnt. Anschließend wurde die Membran für 20 min mit 20 ml des verdünnten Enzyms bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 50-100 ml PBS (1% SDS) bei RT für zweimal 10 min. Nachdem die Membran erneut für dreimal 10 min bei RT mit 50-100 ml PBS-T (0,1% Tween20) gewaschen wurde, erfolgte der Nachweis von replizierter DNA mit Hilfe von Chemilumineszenz (ECL).

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle eines alternativen, über Antikörper vermittelten Aufnahmemechanismus (ADE) von Parvovirus B19 (B19V) in der Pathogenese der kardio-endothelialen B19V-Infektion untersucht.

4.1. Klassische Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Parvovirus B19 in Endothelzellen

Trotz des ausgeprägten Zelltropismus von Parvovirus B19 für erythroide Vorläuferzellen (EPC) und fetale Leberzellen [91, 109] wurde es wiederholt als mögliches kardiotropes Virus beschrieben, da in Myokardbiopsien von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie B19V-DNA mit einer hohen Prävalenz detektiert werden konnte [157, 160]. In weiterführenden Studien konnte gezeigt werden, dass die B19V-DNA überwiegend in den Endothelzellen der kleinen intramyokardialen Arteriolen und der postkapillären Venolen und Venen persistiert [159]. Dies lässt vermuten, dass B19V mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert ist, die zu einer massiven Schädigung des Myokards führen kann [153, 164].

In einer Reihe von Untersuchungen zur B19V-Aufnahme konnten das P-Antigen als Primärrezeptor und das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin sowie das Autoantigen Ku80 als mögliche Ko-Rezeptoren charakterisiert werden [56, 58, 62]. Für Endothelzellen konnte von unserer Forschungsgruppe mittels FACS-Analysen gezeigt werden, dass relativ große Mengen an P-Antigen und β_1 -Integrin auf der Zelloberfläche exprimiert werden, während Ku80 nur sehr schwach auf der Oberfläche vertreten war und hauptsächlich intrazellulär nachgewiesen werden konnte. Dieses Expressionsmuster stimmte weitgehend mit dem der als Positiv-Kontrolle eingesetzten UT7/Epo-S1-Zellen überein. UT7/Epo-S1-Zellen sind permissiv für die B19V-Aufnahme und zeigen auch eine geringe Virusreplikation, weshalb sie als B19V-semi-permissiv bezeichnet werden. In Übereinstimmung mit den Daten zur Rezeptorexpression konnte dann gezeigt werden, dass Endothelzellen ein ähnliches B19V-Bindungsverhalten aufweisen wie die UT7/Epo-S1-Zelllinie. Eine Ausnahme bildete die permanente endotheliale Hybridzelllinie EA.hy926 mit einer deutlich reduzierten Viruspartikel-Bindung. Dagegen war bei der Internalisierung der gebundenen Viruspartikel für die Endothelzellen eine sehr starke Reduktion im Vergleich zu den UT7/Epo-S1-Zellen zu beobachten (Abb. 4.1) [208].

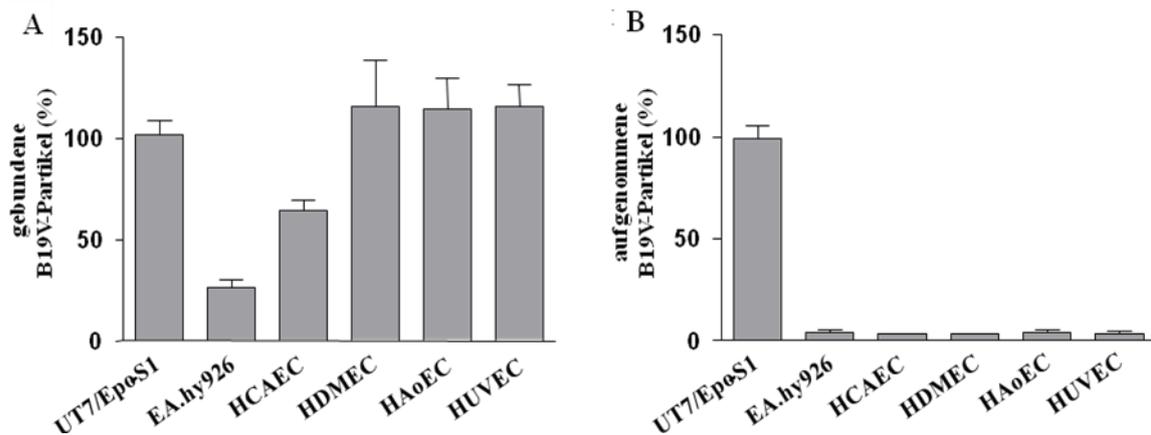


Abb. 4.1 Vergleich der B19V-Bindung und -Aufnahme in verschiedenen Endothelzellen. Die Quantifizierung der (A) gebundenen bzw. (B) aufgenommenen Viruspartikel erfolgte mittels RTq-PCR. Die für B19V semi-permissiven UT7/Epo-S1-Zellen dienten als Referenz und wurden auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der anderen Zellen wurden auf die UT7/Epo-S1-Zellen bezogen. Das Diagramm fasst die Daten von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zusammen \pm Standardabweichung [208].

Die *in vivo* in Endothelzellen nachgewiesenen B19V-DNA-Mengen lassen sich aufgrund dieser Daten nur sehr schwer mit einer klassischen Rezeptor-vermittelten Internalisierung erklären. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Hypothese zusätzlicher alternativer B19V-Aufnahmemechanismen in Endothelzellen postuliert. Ein gut beschriebener alternativer Mechanismus für viele Viren ist die Antikörper-vermittelte Virusaufnahme (ADE), die erstmalig bei Flaviviren identifiziert wurde [174]. Von Munakata et al. wurde diese Art der Virusaufnahme 2006 auch für B19V in der monozytären Zelllinie U937 beschrieben [209].

Es wurde daher zunächst untersucht, ob auch bei Endothelzellen eine verstärkte B19V-Aufnahme über Antikörper vermittelt werden kann. Um allgemein gültige Aussagen über Endothelzellen treffen zu können, wurden eine Reihe von endothelialen Primärzellen, die permanente endotheliale Zelllinie EA.hy926, die monozytäre Zelllinie U937 als Positivkontrolle für die ADE sowie die semi-permissive Zelllinie UT7/Epo-S1 in die Untersuchungen mit einbezogen. Von Interesse waren dabei insbesondere die Abhängigkeit der Virusaufnahme von der Konzentration der α -B19V-Antikörper, die B19V-Adhäsions- und Internalisierungseigenschaften in Gegenwart von Antikörpern, die Fc-Rezeptorexpression der Endothelzellen und die Charakterisierung der Wechselwirkung der Virus-Antikörper-Komplexe mit zellulären Rezeptoren.

4.2. Untersuchung der B19V-Aufnahme in verschiedenen Zellsystemen in Gegenwart von gereinigten B19V-Antikörper-positiven IgG-Fraktionen

Um zu untersuchen, ob der Effekt der ADE bei B19V außer in der monozytären Zelllinie U937 auch in endothelialen Zellsystemen auftritt, wurde initial die B19V-Aufnahme in Anwesenheit von gereinigten IgG-Fraktionen aus drei α -B19V-Antikörper-positiven Serumproben verschiedener Spender in der semi-permissiven Zelllinie UT7/Epo-S1 und der primären Endothelzelle HCAEC (Endothelzelle der Koronararterie) analysiert und mit der in Abwesenheit von gereinigten Antikörpern und der in Gegenwart von IgG-Fraktionen α -B19V-Antikörper-negativer Spender verglichen. Die verwendeten IgG-Fraktionen waren zuvor mittels ELISA auf das Vorhandensein von α -B19V-Antikörpern untersucht worden. Der so genannte Indexwert, der die Menge an α -B19V-Antikörper kennzeichnet, lag bei der Kontroll-IgG-Fraktion mit 0,2 deutlich unterhalb des Grenzwertes von 0,9 für die Differenzierung von α -B19V-Antikörper-negativen und -positiven Seren. Die Indexwerte der drei im Versuch verwendeten α -B19V-Antikörper-positiven IgG-Fraktionen betragen 8,0 (Serum 1), 6,0 (Serum 2) und 5,2 (Serum 3). Für den Versuch wurde B19V (B19V-Virus-Stock D2: 1.000 Genomische Einheiten (GE)/Zelle; IgG: 400 μ g/ml) zunächst für 1 h bei 37°C mit der jeweiligen IgG-Fraktion vorinkubiert und anschließend für die Infektion der Zellen verwendet. Die Infektion wurde für einen Gesamtzeitraum von 6 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgte, nach einer fünfminütigen Trypsinierung zur Abtrennung nicht aufgenommenen B19V-Partikel, die Isolierung der Gesamt-DNA. Die Anzahl der B19V-Partikel pro Zelle wurde mit Hilfe der RTq-PCR ermittelt.

Die in Abbildung 4.2 dargestellten Ergebnisse (in dieser wie auch in den folgenden Abbildungen als logarithmische Skala) zeigen sowohl in der B19V-semi-permissiven Zelllinie UT7/Epo-S1 (A) als auch in der endothelialen Primärzelle der Koronararterien HCAEC (B) eine gesteigerte B19V-Aufnahme in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern im Vergleich zur normalen Infektion mit B19V oder der Infektion mit B19V und einer Kontroll-IgG-Fraktion. In der UT7/Epo-S1-Zelllinie (A) wurden bei der reinen B19V-Infektion und der Infektion in Anwesenheit des Kontroll-IgG 4,1 bzw. 4,3 Viruspartikel pro Zelle aufgenommen. Trotz der unterschiedlichen Indexwerte war die Steigerung der Virusaufnahme bei allen drei α -B19V-IgG-Fraktionen ähnlich hoch. Die B19V-Aufnahme in Gegenwart der IgG-Fraktion aus Serum 1 war 75-fach gesteigert im Vergleich zur Kontroll-IgG-Fraktion, bei Serum 2 war eine 55-fache und bei Serum 3 eine 90-fache Steigerung zu beobachten.

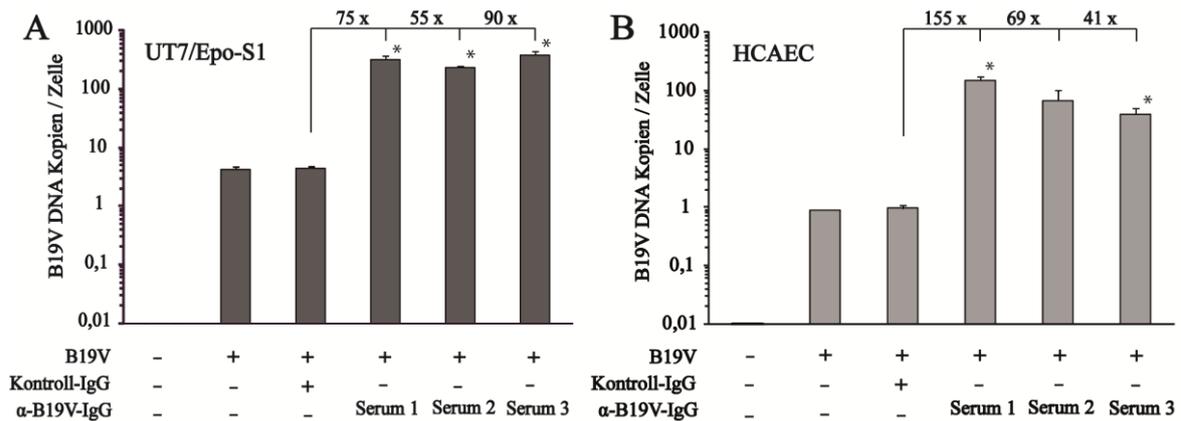


Abb. 4.2 Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in Anwesenheit von drei unterschiedlichen α -B19V-IgG-Fraktionen. UT7/Epo-S1-Zellen (A) und HCAEC (B) wurden mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V: 1.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert und die DNA nach 6 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgG-Fraktion (400 μ g/ml) von α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen mit B19V ohne Vorinkubation mit Antikörpern infiziert. Die Ergebnisse sind logarithmisch dargestellt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. (*= p <0,05)

Betrachtet man jedoch die Ergebnisse in den HCAEC (B), so kann man deutliche Unterschiede zwischen den drei verschiedenen α -B19V-Antikörper-positiven IgG-Proben feststellen. Die aufgenommene Virusmenge bei der B19V-Infektion in Abwesenheit von Antikörpern bzw. in Gegenwart der Kontroll-IgG-Fraktion war mit 0,8 und 0,9 Viruspartikeln pro Zelle im Vergleich zur semi-permissiven UT7/Epo-S1-Zelle deutlich geringer, was die initialen Befunde zur klassischen Rezeptor-vermittelten Aufnahme (vgl. Abb.4.1), die unter geringfügig veränderten Bedingungen durchgeführt wurden, bestätigte. Die Aufnahme in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern war deutlich gesteigert, wobei eine klare Korrelation mit der Konzentration spezifischer Antikörper zu beobachten war. Bei Serum 1 mit dem höchsten Indexwert (8,0) kam es zu einer 155-fachen Steigerung. Die IgG-Fraktion von Serum 2 mit einem Indexwert von 6,0 führte nur noch zu einer 69-fach gesteigerten Aufnahme. Bei der Infektion in Gegenwart der α -B19V-IgG-Fraktion aus Serum 3, deren Indexwert bei 5,2 lag, wurden nur noch 40 Viruspartikel pro Zelle nachgewiesen, was einer 41-fachen Steigerung entspricht.

Auf der Grundlage dieser initialen Ergebnisse wurden die Versuche im weiteren Verlauf der Arbeit mit der α -B19V-Antikörper-positiven IgG-Fraktion aus Serum 1 durchgeführt. Da der Effekt der ADE in der monozytären Zelllinie U937 bereits gut beschrieben worden war, diente sie als Referenz in dieser Arbeit.

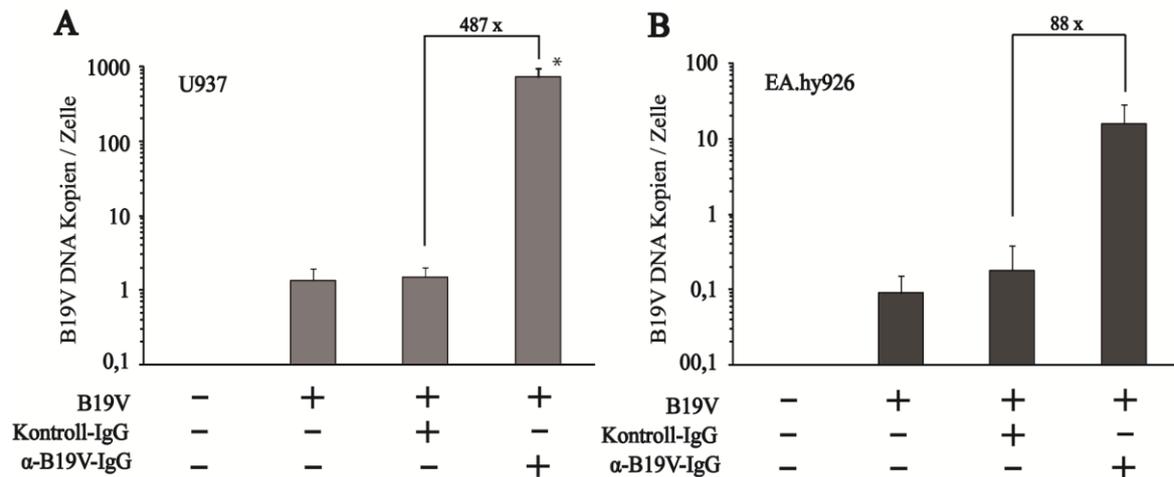


Abb. 4.3 Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in Anwesenheit von α -B19V-IgG. Die monozytäre Zelllinie U937 (A) und die permanente endotheliale Hybridzelllinie EA.hy926 (B) wurden mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V: 1.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert und die DNA nach 6 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgG-Fraktion (400 μ g/ml) aus α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen in Abwesenheit von Antikörpern infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. (*= $p < 0,05$)

Abbildung 4.3 zeigt die Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in den U937-Zellen (A) und der Hybridzelllinie EA.hy926 (B). Bei den U937-Zellen ist eine deutliche Steigerung der Partikel-Aufnahme von 728 B19V-Partikeln pro Zelle in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern im Vergleich zu 1,5 Partikeln pro Zelle in Anwesenheit des Kontroll-IgG zu beobachten (Faktor 487). Die EA.hy926-Zellen sind generell nicht gut mit B19V infizierbar. In Anwesenheit der Kontroll-IgG-Fraktion wurden nur 0,2 Viruspartikel pro Zelle aufgenommen. Die Infektion mit α -B19V-Antikörpern brachte eine 88-fache Steigerung der B19V-Aufnahme mit 16 Viruspartikeln pro Zelle. In beiden Zelllinien war die Infektion in Abwesenheit von Antikörpern vergleichbar mit der B19V-Infektion in Anwesenheit der Kontroll-IgG-Fraktion aus einem α -B19V-negativen Serum.

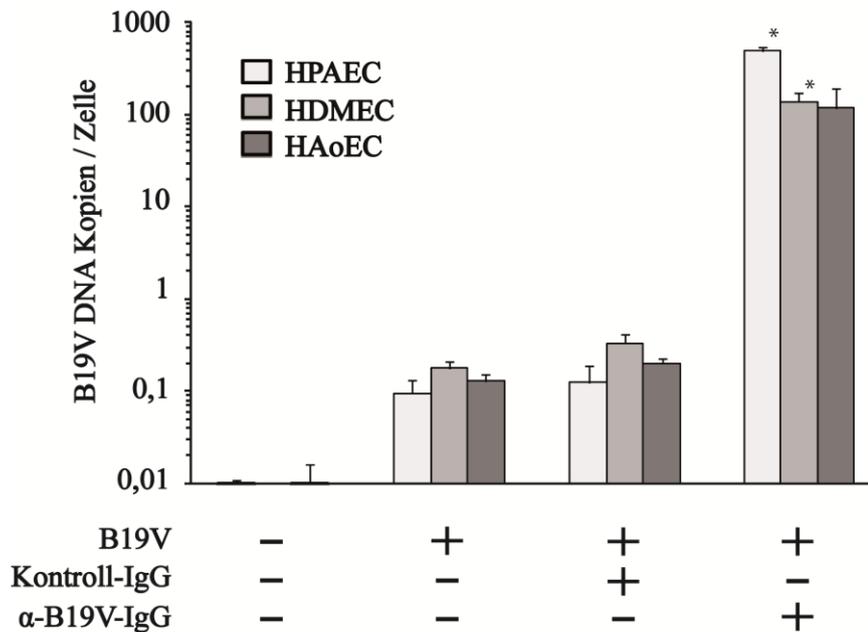


Abb. 4.4 Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in Anwesenheit von α -B19V-IgG in verschiedenen Primär-Endothelzellen. Endotheliale Primärzellen aus der Lunge (HPAEC), der Haut (HDMEC) und der Aorta (HAoEC) wurden mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V: 1.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert und die DNA nach 6 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. Die IgG-Fraktion (400 μ g/ml) eines α -B19V-negativen Serums wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen in Abwesenheit von Antikörpern infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. (*= $p < 0,05$)

In Abbildung 4.4 wurden die Ergebnisse von drei weiteren primären Endothelzellen aus unterschiedlichen Organsystemen nach der Infektion mit B19V in Ab- und Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern zusammengefasst. Der Versuchsansatz entsprach den bisherigen Experimenten. Nach der Infektion mit einer B19V MOI von 1.000 GE pro Zelle und in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von IgG-Fractionen in einer Endkonzentration von 400 μ g/ml, wurde die Gesamt-DNA isoliert und die B19V-DNA mittels RTq-PCR quantifiziert. Alle drei getesteten primären Endothelzellen zeigten eine sehr starke Antikörper-vermittelte Aufnahme. Dabei konnte in den HPAEC (Endothelzellen aus der Pulmonalarterie) mit 491 Viruspartikeln pro Zelle nach Infektion in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern eine 3964-fache Steigerung im Vergleich zur Kontrollinfektion mit unspezifischen Antikörpern beobachtet werden. Auch die Endothelzellen der Haut (HDMEC) nahmen in Gegenwart von α -B19V-IgG 411 Mal mehr Viruspartikel auf als bei der Kontroll-Infektion, bei der nur 0,3 Partikel pro Zelle nachgewiesen werden konnten. Die Endothelzellen der Aorta (HAoEC) zeigten mit einer 590-fachen Steigerung der Viruspartikel-Aufnahme in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern ein ähnliches Ergebnis wie die HDMEC.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in allen getesteten Zellen eine starke Steigerung der Virusaufnahme zu beobachten war, wenn bei der Infektion α -B19V-Antikörper zugesetzt wurden. Alle Kontrollinfektionen in den Endothelzellen mit unspezifischen Antikörpern oder in Abwesenheit von Antikörpern zeigten hingegen eine sehr geringe Virusaufnahme, was mit den in Abbildung 4.1 dargestellten Ergebnissen übereinstimmt.

4.2.1. B19V-Aufnahme in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von α -B19V-Antikörpern

Die initialen Untersuchungen zur B19V-Aufnahme durch α -B19V-Antikörper wurden mit einer IgG-Konzentration von 400 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Die physiologischen Immunglobulin-Konzentrationen liegen bei 10 mg/ml in humanen Seren. Damit lag die bis dato für die Versuche verwendete Konzentration schon deutlich unter der physiologischen Konzentration. Um jedoch noch genauere Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung der Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahme zu ziehen, wurden Titrationsexperimente durchgeführt. Dabei wurden die monozytäre Zelllinie U937, die Hybridzelllinie EA.hy926 und die Endothelzelle HCAEC mit B19V (D2: 1.000 GE/Zelle) in Gegenwart von α -B19V-IgG in verschiedenen Konzentrationen von 5 bis 800 $\mu\text{g/ml}$ infiziert. Als Kontrolle dienten Infektionsansätze mit der Kontroll-IgG-Fraktion in den gleichen Konzentrationen. Nach einer sechsständigen Inkubationszeit bei 37°C wurde die Gesamt-DNA isoliert und B19V mit RTq-PCR quantifiziert.

In Abbildung 4.5 ist die Konzentrationsabhängigkeit der Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahme in U937 (A), EA.hy926 (B) und HCAEC (C) zusammengefasst. In den U937-Zellen war bereits bei der geringsten Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ der α -B19V-positiven IgG-Fraktion eine 10-fach stärkere Virusaufnahme zu beobachten. Mit steigender Konzentration nahm die B19V-Aufnahme konstant zu. Zwischen 400 $\mu\text{g/ml}$ und 800 $\mu\text{g/ml}$ stagnierte die B19V-Aufnahme bzw. sank sogar von 366 auf 267 aufgenommene Viruspartikel pro Zelle ab. Ab dieser Konzentration schien eine Sättigung eingetreten zu sein. Die Kontrollansätze mit unspezifischen IgGs blieben auch mit steigenden Konzentrationen mit durchschnittlich 1,14 Partikeln pro Zelle auf niedrigem Niveau.

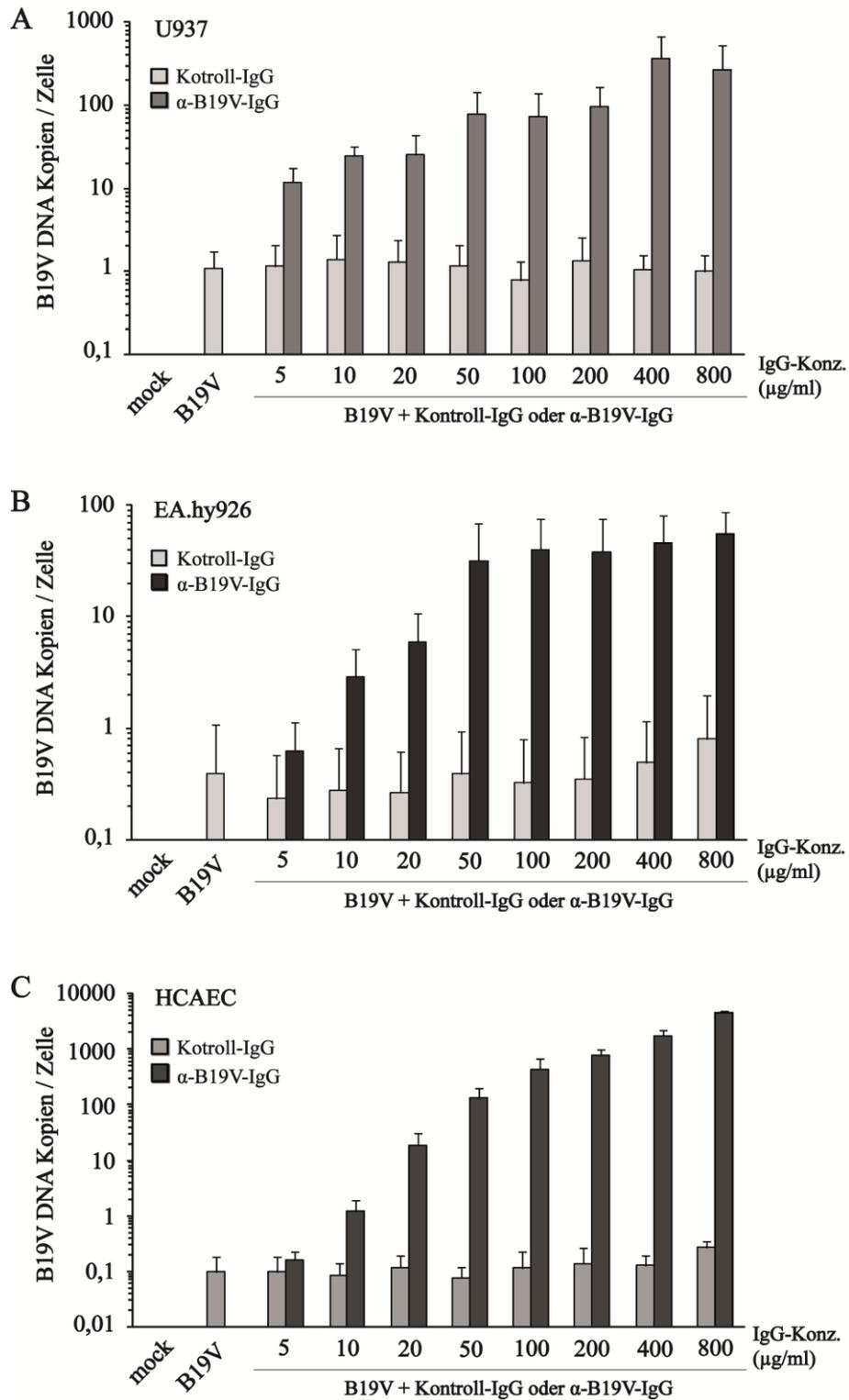


Abb. 4.5 Konzentrationsabhängige Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in verschiedenen Zelllinien. U937 (A), EAhy926 (B) und HCAEC (C) wurden mit einem Virus-IgG-Gemisch (B19V: 1.000 GE/Zelle; IgG: Konz. von 5-800 µg/ml), welches für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert und die DNA nach 6 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. Eine IgG-Fraktion aus α-B19V-negativem Serum in identischen Konzentrationen (5-800 µg/ml) wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen und sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

In den EA.hy926-Zellen stieg die Virusaufnahme erst bei einer IgG-Konzentration von 10 µg/ml deutlich um einen Faktor von 10 an. Bereits bei einer Konzentration von 100 µg/ml an α -B19V-IgG trat eine weitgehende Sättigung ein. Die Virusaufnahme stieg nur noch sehr leicht von 4 Partikeln pro Zelle bei 100 µg/ml auf 5,5 Partikel pro Zelle bei 800 µg/ml an. Die Virusaufnahme in den Kontrollansätzen war auch hier mit durchschnittlich 0,04 detektierten Partikeln pro Zelle, unabhängig von der eingesetzten IgG-Konzentration, sehr niedrig. Möglicherweise ist eine limitierte Expression des Virus-IgG-Komplex-bindenden Rezeptors für die rasche Sättigung in diesem Zellsystem verantwortlich. Auch die HCAEC zeigten erst bei einer α -B19V-IgG-Konzentration von 10 µg/ml eine signifikant verstärkte Virusaufnahme, die 14-fach höher war als die B19V-Aufnahme bei der Kontrollinfektion. Im Gegensatz zu den EA.hy926-Zellen war jedoch bei den primären Endothelzellen der Koronararterie eine kontinuierlich steigende Virusaufnahme mit steigender IgG-Konzentration bis zur maximal eingesetzten Konzentration von 800 µg/ml zu beobachten.

4.2.2. B19V-Adhäsions- und Internalisierungseigenschaften von Endothelzellen nach Infektion in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern

Um zu untersuchen, welche Schritte des B19V-Aufnahmeprozesses in Gegenwart von Antikörpern stimuliert werden, wurden die Bindung der B19V-Partikel an die Zelloberfläche sowie die Internalisierung der gebundenen Partikel getrennt voneinander analysiert.

Für die Analyse der B19V-Bindungs- und Aufnahmeeigenschaften von Endothelzellen in Anwesenheit von α -B19V-IgG und der Differenzierung zwischen extrazellulär gebundenen und internalisierten Virus-IgG-Komplexen musste in einem Vorversuch zunächst untersucht werden, ob sich die extrazellulären, nicht-internalisierten Komplexe mit Hilfe von Trypsin von der Zelloberfläche entfernen ließen. Hierzu wurden die Zellen mit einem B19V/ α -B19V-IgG-Gemisch, welches für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 5 min bei 37°C mit Trypsin behandelt. Nach der DNA-Isolierung wurden die B19V-Partikel pro Zelle mittels quantitativer PCR bestimmt.

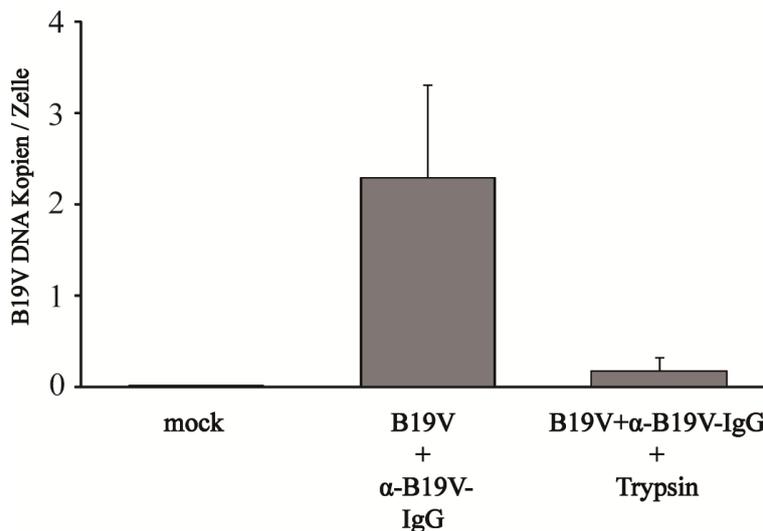


Abb. 4.6 Dissoziation extrazellulär-gebundener, nicht-internalisierter B19V-IgG-Komplexe mittels Trypsinbehandlung EA.hy926-Zellen wurden mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V: 1.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, für 1 h auf Eis inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und dann 5 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der nach der Inkubation nicht trypsiniert wurde. Anschließend wurden die DNA isoliert und mittels RTq-PCR die B19V-Partikel pro Zelle quantifiziert. Das Diagramm zeigt die gemittelten Daten \pm Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

In Abbildung 4.6 ist zu sehen, dass eine fünfminütige Trypsinbehandlung ausreicht, um 95% der extrazellulär-gebundenen B19V-IgG-Komplexe von der Zelloberfläche zu entfernen.

Im eigentlichen Versuchsansatz wurden für die Bestimmung der gebundenen B19V-Partikel die Zellen mit einem B19V-IgG-Gemisch, das für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, für 1 h auf Eis inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend die DNA isoliert. Für die Bestimmung der internalisierten Viruspartikel wurden die U937, EA.hy926 und HCAEC nach der einstündigen Inkubation auf Eis mit PBS gewaschen und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Um nicht-aufgenommene, ausschließlich extrazellulär gebundene B19V-Partikel zu entfernen, wurden die Zellen anschließend 5 min bei 37°C trypsiniert, mit PBS gewaschen und die DNA isoliert. Als Kontrollen dienten ein Versuchsansatz mit einer IgG-Präparation aus einem α -B19V-negativem Serum, sowie die B19V-Infektion ohne Antikörper. Auch hier erfolgte die Quantifizierung der B19V-Partikel mit Hilfe der RTq-PCR.

In Abbildung 4.7 sind die Ergebnisse der Bindungs- und Aufnahmestudien der drei getesteten Zellen zusammengefasst. Bei der monozytären Zelllinie U937 (A) stieg die Anzahl der gebundenen Viruspartikel in Anwesenheit von α -B19V-Antikörper auf das 204-fache. Betrachtet man jedoch die Internalisierung, ist die Anzahl der aufgenommenen B19V-Partikel bei der Infektion in Anwesenheit von α -B19V-IgG mit einer Steigerung auf

das 1217-fache im Vergleich zur Kontrollinfektion deutlich höher als der Anstieg bei der Bindung. Im Gegensatz dazu konnte man bei der endothelialen Hybridzelllinie EA.hy926 (B) und den primären HCAEC (C) nur einen sehr geringen Unterschied im Bindungsverhalten der Viruspartikel zwischen den Versuchsansätzen mit α -B19V-Antikörpern und denen mit den Kontroll-Antikörpern beobachten. In Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern wurden an die Oberfläche der EA.hy926-Zellen 2,8-fach mehr und an die Oberfläche der HCAEC doppelt so viele Partikel gebunden als bei der Kontrollinfektion. Bei der Internalisierung hingegen konnte die Anzahl der aufgenommenen B19V-Partikel in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern in den EA.hy926 auf das 117-fache und in den HCAEC auf das 46-fache gesteigert werden. Die im Vergleich zu den in den vorangegangenen Abbildungen dargestellten Experimenten geringen Absolutwerte bei der Internalisierung lassen sich damit erklären, dass nur die während der einstündigen Inkubation auf Eis tatsächlich gebundenen Partikel auch aufgenommen werden konnten, während bei den vorangegangenen Versuchen ständig neue Viruspartikel an die Zellen binden konnten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Effekt der ADE für B19V in Endothelzellen fast ausschließlich auf der Ebene der Internalisierung vermittelt wird, während in den monozytären U937-Zellen schon die primäre Bindung stark erhöht ist. Dies deutet auf eine Beteiligung unterschiedlicher Mechanismen hin.

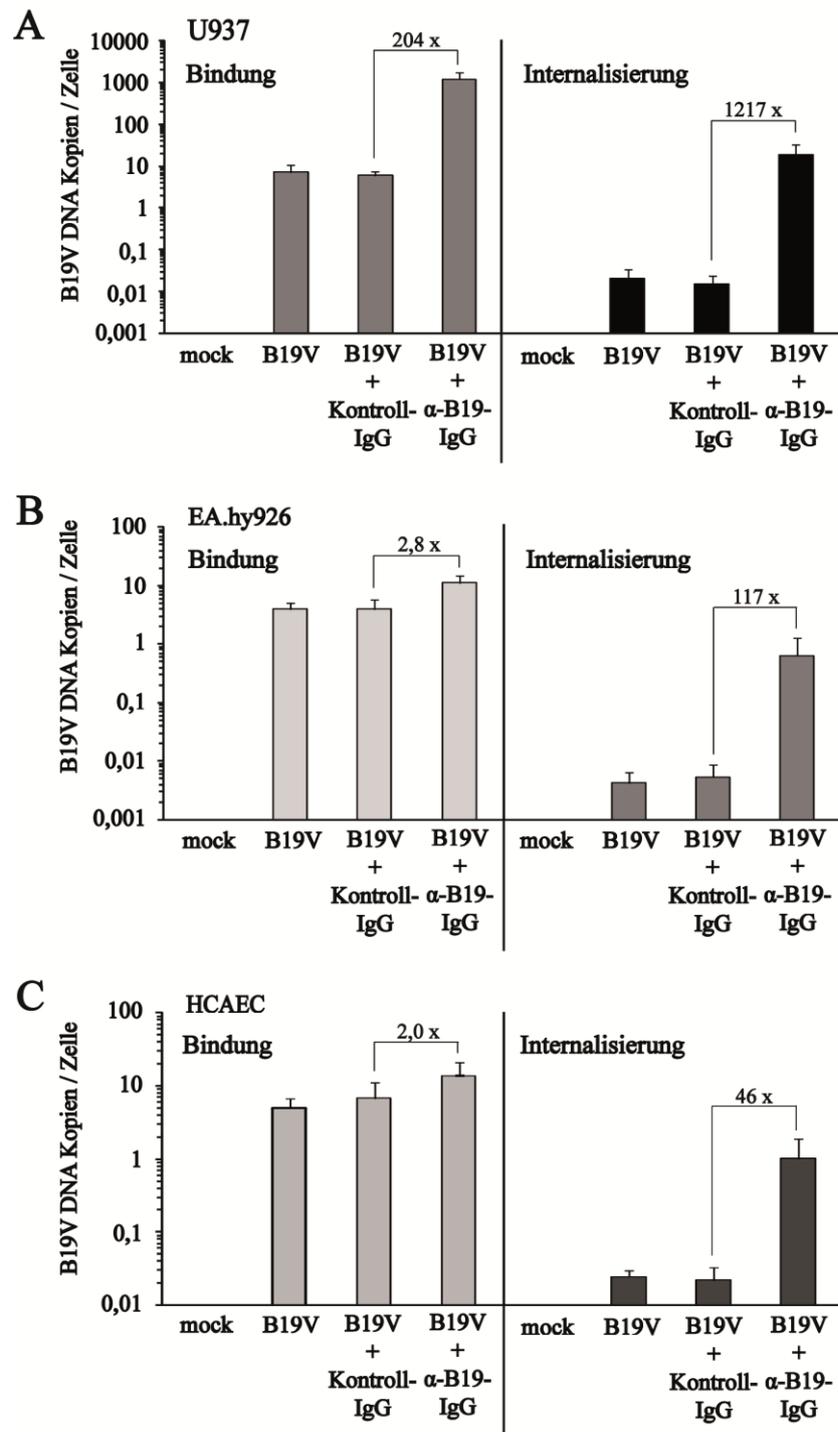


Abb. 4.7 Vergleich der B19V-Adhäsion und -Internalisierung in Ab- und Anwesenheit von α -B19V-IgG. Für die Bindung wurden U937 (A), EA.hy926 (B) und HCAEC (C) mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V: 1.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, für 1 h auf Eis inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und mit dem Zellschaber für die anschließende DNA-Präparation abgelöst. Für die Aufnahme wurden die Zellen mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V: 1.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, für 1 h auf Eis inkubiert, einmal mit PBS gewaschen, mit neuem Medium überschichtet und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für die DNA-Präparation 5 min mit Trypsin abgelöst. Mit RTq-PCR wurden die B19V-Partikel pro Zelle quantifiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

4.2.3. Aufklärung des genauen Mechanismus der Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahme

Um den Mechanismus der Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahme näher zu charakterisieren wurde zunächst untersucht, ob für den beobachteten Effekt der konstante Fc-Anteil der zugegebenen Antikörper erforderlich ist. Dazu wurde vorab von den IgG-Präparationen der Fc-Teil mit Hilfe des *Pierce Fab Preparation Kit* abgespalten und die Fab-Fragmente über eine Protein A-Säule aufgereinigt. U937, EAhy926 und HCAEC wurden mit B19V in Anwesenheit von Fab-Fragmenten (200 µg/ml) für 3 h infiziert. Als Kontrolle diente ein Versuchsansatz mit intakten α -B19V-IgGs in gleicher Konzentration. Die Quantifizierung der B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR.

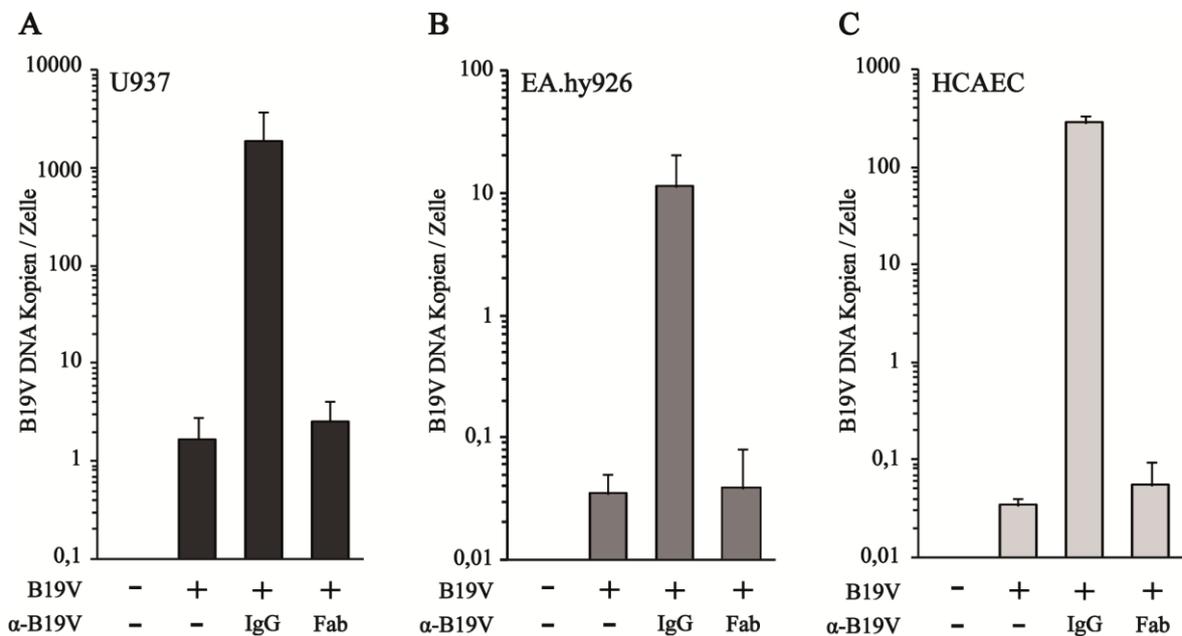


Abb. 4.8 B19V-Infektion in Anwesenheit einer Fab-Fragment-Präparation von α -B19V-IgG. Die monozytäre Zelllinie U937 (A), die permanente endotheliale Hybridzelllinie EA.hy926 (B) und die primäre Endothelzelle HCAEC (C) wurden mit einem B19V-Fab-Fragment-Gemisch (B19V (D5): 10.000 GE/Zelle; Fab-Fragmente: 200 µg/ml), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert und die DNA nach 3 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. Ein Infektionsansatz mit unbehandelten α -B19-IgGs in gleicher Konzentration diente als Positivkontrolle, als weitere Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Abbildung 4.8 zeigt, dass in den drei untersuchten Zelllinien die B19V-Aufnahme durch die intakte α -B19V-IgG-Fraktion, wie erwartet, verstärkt wird. Trennt man jedoch den Fc-Teil von den Fab-Fragmenten, so ist in allen drei Zellsystemen eine komplette Aufhebung

des ADE-Effekts mit einer B19V-Aufnahme auf dem Niveau der reinen B19V-Infektion zu beobachten.

4.2.4. Fc-Rezeptorexpression auf der Oberfläche von unterschiedlichen Zelllinien

Eine Fc-Rezeptor-abhängige Verstärkung der Virusbindung ist der am häufigsten beschriebene Mechanismus der ADE bei viralen Infektionen. Die Verstärkung beruht auf der direkten Wechselwirkung des Fc-Anteils der Antikörper in den Virus-Antikörper-Komplexen mit Fc-Rezeptoren (FcR) auf den Zielzellen [177, 178]. FcR sind hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems zu finden, doch auch auf der Oberfläche von einigen Endothelzellen wurden sie teilweise detektiert [210]. Um Aussagen über eine mögliche Beteiligung dieses Mechanismus an der beobachteten ADE von B19V in Endothelzellen treffen zu können, wurden mit Hilfe von FACS-Messungen detaillierte Analysen hinsichtlich des Expressionsprofils von Fc γ -Rezeptoren auf den verschiedenen Endothelzellen durchgeführt. Untersucht wurden Endothelzellen der Koronararterie, der Lungenarterie, der Haut und der Aorta. Zusätzlich wurde die Oberflächenexpression der Fc-Rezeptoren in EA.hy926- und UT7/Epo-S1-Zellen untersucht. Als Referenz diente wiederum die monozytäre Zelllinie U937.

In Abbildung 4.9 sind die Expressionsprofile der untersuchten Zellen dargestellt. Bei 99,5% der U937-Zellen konnte der Fc γ -II-Rezeptor (CD32) nachgewiesen werden. Mit einem Prozentsatz von 36,7% positiver Zellen war auch der Fc γ -I-Rezeptor (CD64) noch recht stark auf der Zelloberfläche vertreten. Der Fc γ -III-Rezeptor (CD16) war mit 0,61% positiver Zellen praktisch nicht nachweisbar.

Auf der Zelloberfläche der permanenten endothelialen Hybridzelllinie EA.hy926 konnte ebenfalls der Fc γ -II-Rezeptor identifiziert werden, jedoch im Vergleich zu den U937-Zellen mit 27,6% positiven Zellen deutlich verringert. Der Fc γ -I-Rezeptor ist nicht detektierbar, während CD16 (Fc γ -RIII) mit 7,63% positiven Zellen gering auf der Oberfläche vertreten ist.

Die primäre Endothelzelle HCAEC zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie die EA.hy926 mit 29,66 % positiven Zellen für CD32 (Fc γ -RII) und 2,56% positiver Zellen für CD16. Auch hier war der Fc γ -I-Rezeptor nicht nachweisbar. Die primären Endothelzellen der Lungenarterie (HPAEC) und der Haut (HDMEC) zeigten keine Expression von CD64 (Fc γ -RI) und CD16. Auch CD32 ist mit je 7,6% positiven HPAEC und 9,5% positiven HDMEC im Vergleich zu den HCAEC deutlich geringer auf der Zelloberfläche vertreten.

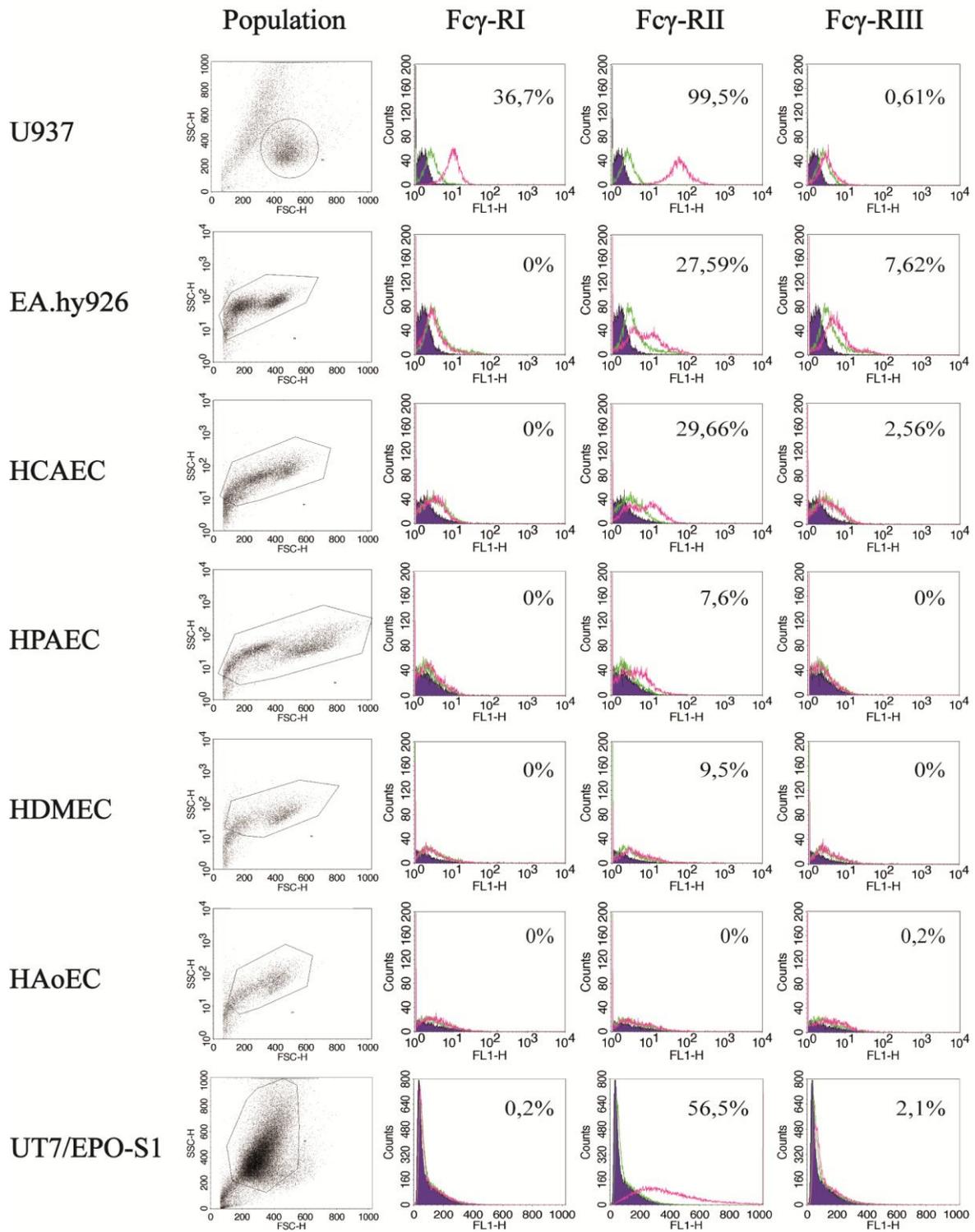


Abb. 4.9 Expression der Fc γ -Rezeptoren auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien und Primär-Endothelzellen. Die Fc γ -Rezeptoren wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Fc γ -RI: monoklonaler FITC-gelabelter mouse anti-Human CD64-Antikörper; Fc γ -RII: monoklonaler FITC-gelabelter mouse anti-Human CD32-Antikörper; Fc γ -RIII: monoklonaler FITC-gelabelter anti-Human CD16-Antikörper; Isotypenkontrolle: FITC-gelabelter mouse anti-Human IgG1 κ -Antikörper. Alle Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Für die FACS-Analysen wurden 10.000 Zellen ausgezählt. Dargestellt sind zum einen die Zellpopulationen im Punkt-Wolken-Diagramm, sowie die Rezeptorexpression im Histogramm-Plot (Zellzahl gegen Fluoreszenzintensität). Die lilafarbenen Kurven in den Histogrammen stellen die Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) und die grünen Kurven die Isotypenkontrollen dar. Die roten Kurven zeigen die mit spezifischen Antikörpern behandelten Zellen. Die Prozentangaben geben die Anzahl der positiven Zellen wieder.

Die Endothelzellen der Aorta (HAoEC) exprimieren keine Fc γ -Rezeptoren. Die für B19V semi-permissive Zelllinie UT7/Epo-S1 exprimiert wie die EA.hy926 und HCAEC mit 56,5% positiver Zellen ausschließlich den Fc γ -II-Rezeptor, während die Fc γ -I- und Fc γ -III-Rezeptoren nicht nachweisbar waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten Endothelzellen im Vergleich zu den U937-Zellen nur eine sehr geringe Fc γ -Rezeptor-Expression zeigten. Darüber hinaus war keine direkte Korrelation der FcR-Expression in den verschiedenen Endothelzellen mit dem Ausmaß der ADE zu erkennen. Dies gilt insbesondere für die HAoEC, die komplett negativ für alle 3 Familien von Fc γ -Rezeptoren waren, und für die HPAEC, die ausschließlich kleine Mengen des Fc γ -RII exprimierten und trotzdem von allen untersuchten Zellen die höchste relative Zunahme der Virusaufnahme in Gegenwart von Antikörpern aufwiesen.

4.2.5. Auswirkung der Blockierung der Fc-Rezeptoren auf die Antikörpervermittelte B19V-Aufnahme

Die Fc-Rezeptor-Expressionsstudien legten nahe, dass trotz der Notwendigkeit für den Fc-Anteil der Antikörper deren Verstärkungseffekt in den Endothelzellen nicht durch die Interaktion mit Fc-Rezeptoren vermittelt wird. Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse der monozytären U937-Zellen mit der ausgeprägten Fc γ -RII-Expression und der Verstärkung der primären Virusbindung im Einklang mit einer möglichen Beteiligung der Fc-Rezeptoren. Um weitere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Fc-Rezeptoren zu erhalten bzw. um diese auszuschließen, wurden Wettbewerbsversuche sowohl mit Fc γ -R-blockierenden Antikörpern als auch mit einem Überschuss an unspezifischen Antikörpern zur Blockierung aller Fc-Rezeptortypen durchgeführt.

Dafür wurden zunächst die Fc γ -Rezeptoren auf der Zelloberfläche der monozytären U937-Zellen, der endothelialen Hybridzelllinie EA.hy926 und der primären Endothelzelle HPAEC mit Hilfe von spezifischen Antikörpern blockiert. Die Behandlung erfolgte für 1 h auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit B19V in Anwesenheit von α -B19V-IgG infiziert. Auch hier wurden die viralen Partikel mittels RTq-PCR bestimmt. Als Kontrollen dienten B19V-Infektionsansätze ohne Antikörper oder in Anwesenheit des Kontroll-IgG.

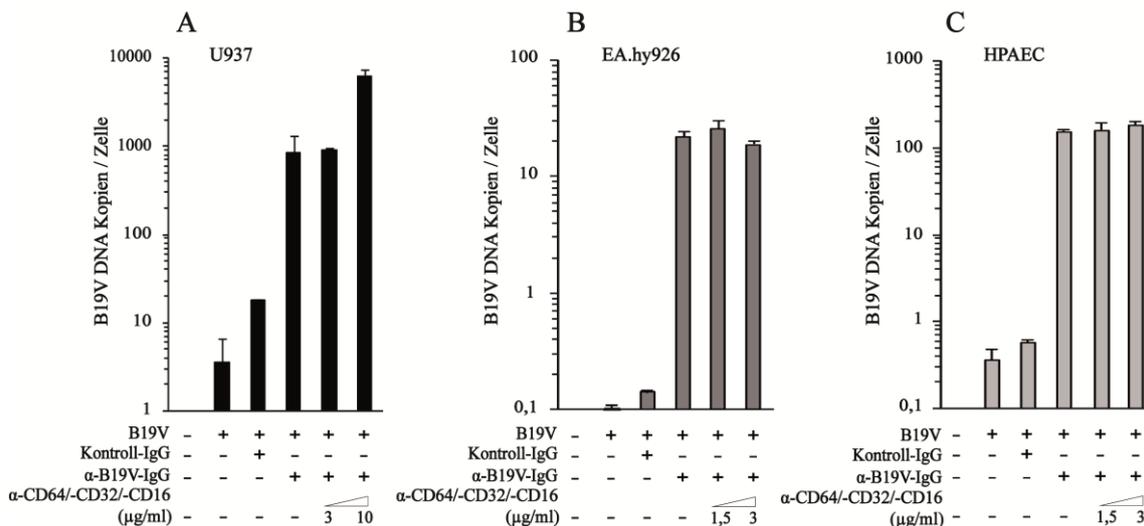


Abb. 4.10 Blockierung der Fc γ -Rezeptoren durch spezifische Antikörper und die Auswirkung auf die Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in U937 EA.hy926 und HPAEC. U937 (A), EA.hy926 (B) und HPAEC (C) wurden mit einem Gemisch aus spezifischen anti-Fc γ -Rezeptor-Antikörpern (α -CD64, α -CD32, α -CD16) mit einer Konzentration von je 1,5 μ g/ml; 3 μ g/ml bzw. 10 μ g/ml pro Antikörper für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V (D2; D5): 1.000; 10.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert. Die DNA wurde nach 6 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgGs (400 μ g/ml) von α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

In Abbildung 4.10 sind die Ergebnisse der Blockierung der Fc γ -Rezeptoren durch spezifische Antikörper in den U937 (A), den EA.hy926 (B) und in den HPAEC (C) zusammengefasst. In der monozytären Zelllinie U937 konnte man, nach der Behandlung der Zellen mit spez. α -Fc γ -R-Antikörpern mit einer Konzentration von 3 μ g/ml, keinen hemmenden Effekt auf die B19V-Aufnahme beobachten. Es wurden im Durchschnitt 860 Viruspartikel pro Zelle aufgenommen, unabhängig davon, ob die Zellen mit 3 μ g/ml der spez. Antikörper gegen Fc γ -Rezeptoren behandelt wurden oder nicht. Erhöhte man die Konzentration der spezifischen Antikörper auf 10 μ g/ml, konnte man sogar eine 7-fache Verstärkung der B19V-Aufnahme feststellen. Bei den EA.hy926-Zellen war ebenfalls kein hemmender Effekt auf die B19V-Aufnahme nach der Behandlung der Zellen mit spez. Antikörpern gegen die Fc γ -Rezeptoren zu beobachten. Es wurden in Anwesenheit von α -B19V-IgG 22 Viruspartikel pro Zelle detektiert. Erfolgte zuvor eine Behandlung der EA.hy926-Zellen mit blockierenden Antikörpern, wurden 25 Partikel (1,5 μ g/ml) bzw. 18 Partikel pro Zelle (3 μ g/ml) detektiert. Versuche mit höheren Konzentrationen der α -Fc γ -R-Antikörper (10 μ g/ml) zeigten, wie bei den U937-Zellen bereits beobachtet, keine Konkurrenz der Virusaufnahme, sondern eine leichte Verstärkung (Daten sind nicht dargestellt).

Bei den HPAEC wurden im Schnitt 160 Viruspartikel pro Zelle aufgenommen, egal ob die Zellen zuvor mit blockierenden Antikörpern behandelt wurden oder nicht. Hier wurde darauf verzichtet, die HPAEC mit einer höheren Konzentration (10 µg/ml) an spezifischen Antikörpern vorzubehandeln, da bei der FACS-Analyse nur eine äußerst geringe Fcγ-Rezeptor-Expression detektiert werden konnte.

Da die Blockierung der Fcγ-Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern auf der Zelloberfläche keine Auswirkungen auf die Antikörper-vermittelte Virusaufnahme hatte, wurden Wettbewerbsversuche mit einer unspezifischen IgG-Fraktion durchgeführt, um alle auf der Zelloberfläche befindlichen Fc-Rezeptoren zu blockieren.

Dafür wurden U937, EA.hy926 und HCAEC zunächst mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (400 µg/ml; 800 µg/ml; 1600 µg/ml) einer unspezifischen Antikörper-Fraktion auf Eis für 1 h vorbehandelt. Im Anschluss erfolgte die Infektion mit dem Gemisch aus B19V und der α-B19V IgG-Fraktion in zwei verschiedenen Konzentrationen (B19V (D5): 10.000 Partikel/Zelle; IgG: 100 µg/ml; 400 µg/ml) für 3 h bei 37°C. Die aufgenommenen B19V-Partikel pro Zelle wurden mittels RTq-PCR ermittelt.

In Abbildung 4.11 sind die Ergebnisse der Konkurrenz der B19V-Partikel durch unterschiedliche Konzentrationen der unspezifischen IgG-Fraktion in der monozytären Zelllinie U937 zusammengefasst. Bei der Infektion der Zellen mit B19V in Anwesenheit von 100 µg/ml α-B19V-IgG (A) führte die Vorinkubation der Zellen mit einem Überschuss von unspezifischem IgG zu keiner Reduktion der Virusaufnahme, sondern sogar zu einer leichten Steigerung. Während bei der Infektion mit B19V in Anwesenheit von α-B19V-IgG ohne Vorbehandlung der Zellen 965 Viruspartikel pro Zelle aufgenommen wurden, konnte eine deutlich verstärkte Virusaufnahme mit 7319 Partikeln pro Zelle nach der Behandlung der Zellen mit 1600 µg/ml einer unspezifischen IgG-Fraktion beobachtet werden. Das entspricht einer 7,5-fachen Steigerung. Auch bei der Infektion mit B19V in Anwesenheit von 400 µg/ml α-B19V-IgG (B) kam es zu einer Steigerung der Virusaufnahme nach der Vorbehandlung der Zellen mit der unspezifischen IgG-Fraktion. Diese war mit einem Faktor von 3,7 nach Vorinkubation der Zellen mit 1600 µg/ml unspesz. IgG jedoch deutlich geringer als die entsprechende relative Zunahme in Gegenwart von 100 µg/ml α-B19V-IgG.

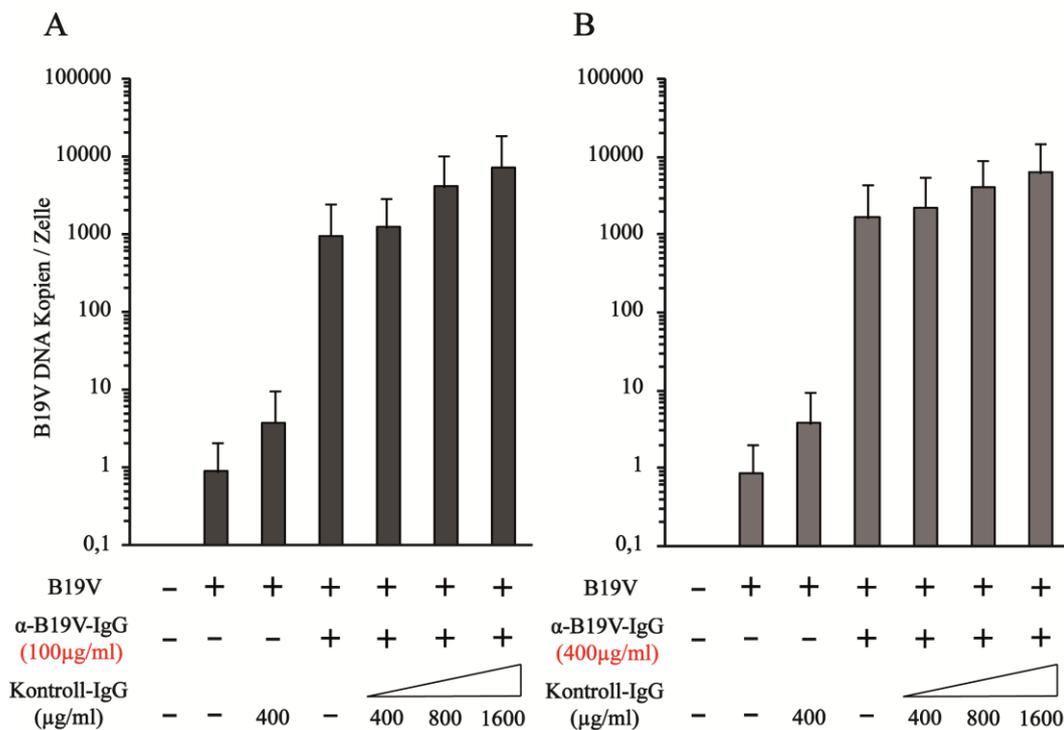


Abb. 4.11 Blockierung der Fc-Rezeptoren durch unspezifische Antikörper und die Auswirkung auf die Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in U937. U937-Zellen wurden mit unspezifischen Antikörpern (400, 800, 1600 µg/ml) für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V (D5): 10.000 GE/Zelle; IgG: 100 µg/ml (A); 400 µg/ml (B)), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert. Die DNA wurde nach 3 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgGs (400 µg/ml) von α-B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung.

Betrachtet man die Ergebnisse der Kompetition in der endothelialen Zelllinie EA.hy926, so stellt man auch hier fest, dass bei der Infektion mit B19V und 100 µg/ml α-B19V-IgG (Abb.4.12 A) die B19V-Aufnahme durch die Vorbehandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen von 400 µg/ml bis zu 1600 µg/ml einer unspezifischen IgG-Fraktion nicht sinkt, sondern kontinuierlich steigt. Es wurde nach der Inkubation der Zellen mit 1600 µg/ml unspez. IgG mit 170 Viruspartikeln pro Zelle 4,3 Mal mehr B19V aufgenommen als bei der Infektion mit B19V und α-B19V-IgG ohne Vorbehandlung der Zellen. Wurden die Zellen mit B19V und 400 µg/ml der spezifischen α-B19V-IgG-Präparation infiziert (Abb.4.12 B). Die Ergebnisse zeigen, dass der Effekt der verstärkten ADE nach Vorinkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen einer unspez. IgG-Fraktion bei dieser Ausgangskonzentration von B19V-spezifischen Antikörpern nicht zu beobachten war. Trotz kleinerer Schwankungen bleibt die Zahl der aufgenommenen Partikel weitestgehend gleich. Hier ist möglicherweise der gleiche Sättigungseffekt

beteiligt, der schon bei den Versuchen zur Konzentrationsabhängigkeit der Virusaufnahme von α -B19V-Antikörpern in dieser Zelllinie zu beobachten war.

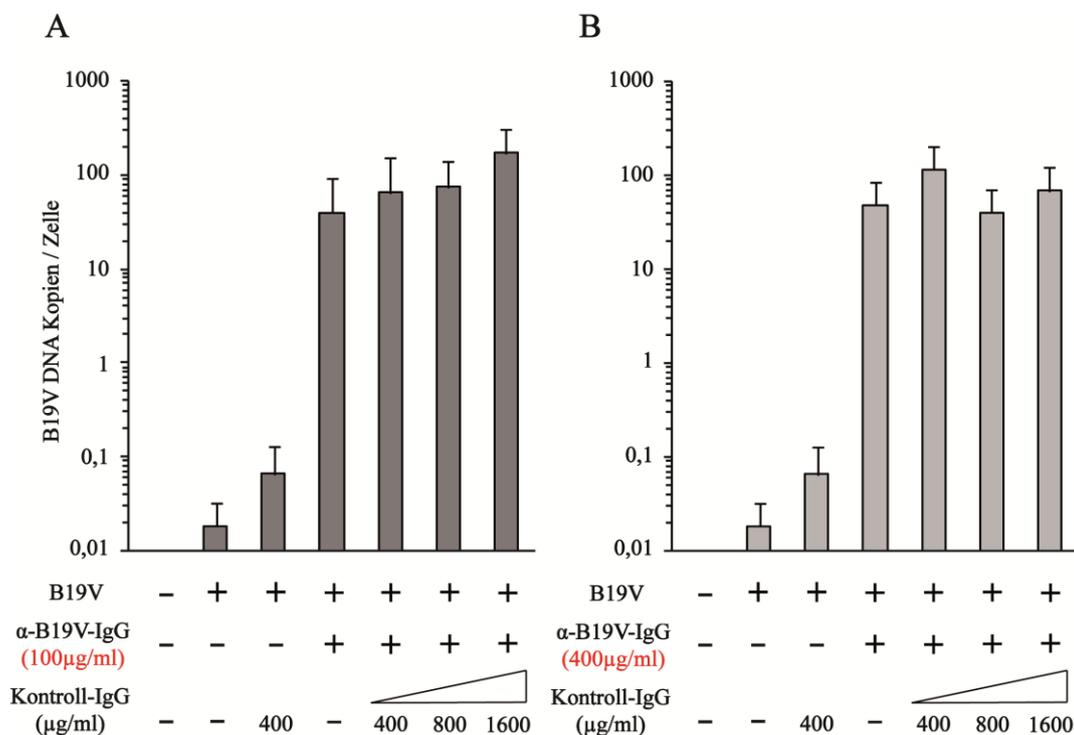


Abb. 4.12 Blockierung der Fc-Rezeptoren durch unspezifische Antikörper und die Auswirkung auf die Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in EA.hy926. Die EA.hy926-Zellen wurden mit unspezifischen Antikörpern (400, 800, 1600 μ g/ml) für 1h auf Eis inkubiert und anschließend mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V (D5): 10.000 GE/Zelle; IgG: 100 μ g/ml (A); 400 μ g/ml (B)), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert. Die DNA wurde nach 3 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgGs (400 μ g/ml) von α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

In Abbildung 4.13 sind die Ergebnisse zur Konkurrenz der B19V-Aufnahme durch unspesz. Antikörper in der primären Endothelzelle HCAEC dargestellt. Wie bereits in den anderen beiden Zelllinien zu beobachten war, konnte auch hier keine Reduktion der aufgenommenen Viruspartikel, sondern eine Verstärkung der B19V-Aufnahme durch die Vorbehandlung der Zellen mit einer unspesz. IgG-Fraktion beobachtet werden.

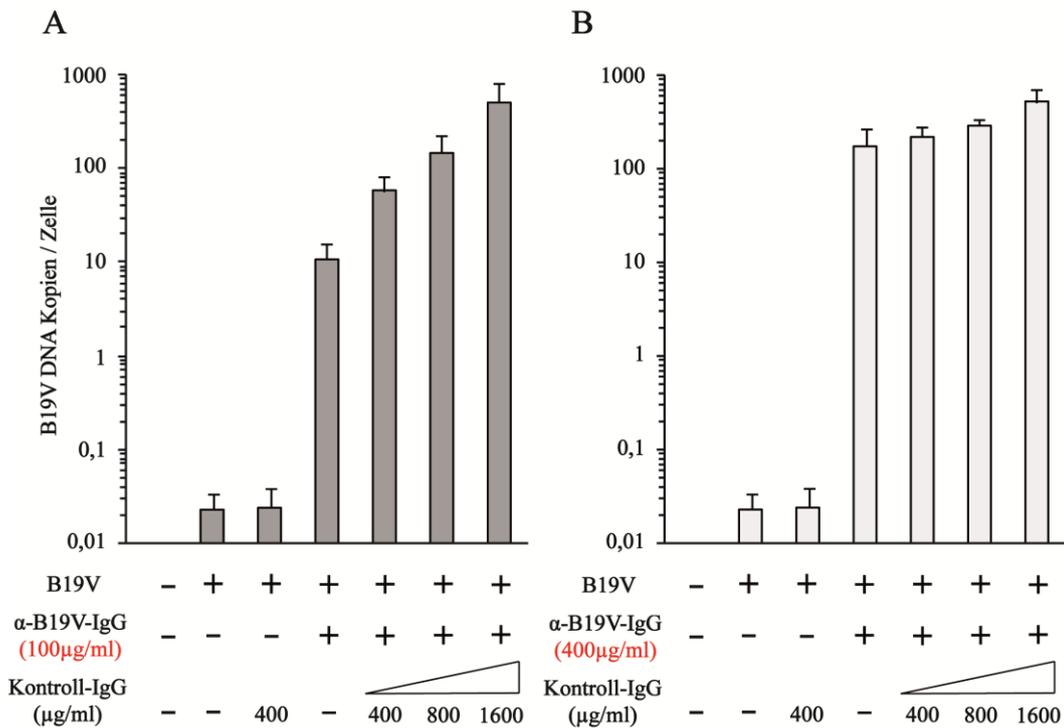


Abb 4.13 Blockierung der Fc-Rezeptoren durch unspezifische Antikörper und die Auswirkung auf die Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in HCAEC Die HCAEC wurden mit unspezifischen Antikörpern (400, 800, 1600 µg/ml) für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V (D5): 10.000 GE/Zelle; IgG: 100 µg/ml (A); 400 µg/ml (B)), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert. Die DNA wurde nach 3h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgGs (400 µg/ml) von α-B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung.

Wurden die Zellen mit B19V und 100 µg/ml α-B19V-IgG (Abb.4.13 A) ohne Vorbehandlung mit unspezifischen Antikörpern infiziert, kam es zu einer Aufnahme von 11 Viruspartikeln pro Zelle. Inkubierte man die Zellen jedoch zusätzlich mit 1600 µg/ml einer unspezifischen IgG-Fraktion vor, so konnte man eine weitere 48-fache Steigerung der Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahme beobachten. In Abbildung 4.13 B ist die Infektion von HCAEC mit B19V und 400 µg/ml α-B19V-IgG dargestellt. Hier ist ebenfalls eine gesteigerte ADE zu beobachten, wenn man die Zellen mit unspezifischen IgG vorbehandelt. Jedoch ist diese mit einem Faktor von 3 bei einer Konzentration von 1600 µg/ml unspezifischen IgGs deutlich geringer als bei der Ausgangskonzentration von 100 µg/ml α-B19V-IgG. Alle drei Zelllinien zeigten keine gesteigerte B19V-Aufnahme, wenn die B19V-Infektion ausschließlich in Gegenwart von α-B19V-negativen Antikörperpräparationen durchgeführt wurde (vgl. auch Abb. 4.5).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei allen untersuchten Zelllinien zu keiner Reduktion der B19V-Aufnahme durch die Blockierung der Fc-Rezeptoren mittels

unspezifischer Antikörper kam. Die Aufnahme der Viruspartikel wurde hingegen durch die Vorbehandlung der Zellen mit der unspez. IgG-Fraktion noch verstärkt. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei den HCAEC bei einer Konzentration der α -B19V-positiven IgG-Präparation von 100 $\mu\text{g/ml}$.

Aufgrund der Ergebnisse der Wettbewerbsversuche wurde die Hypothese postuliert, dass ein oder mehrere lösliche Faktoren, die so eng mit den Antikörpern assoziiert sind, dass sie zusammen mit diesen über die Protein G-Säule aufgereinigt wurden, an der ADE von B19V beteiligt sein könnten. Mögliche lösliche Faktoren sind beispielsweise Komponenten des Komplementsystems. Diese wurden auch schon mit einer Antikörper-vermittelten Verstärkung der Aufnahme von verschiedenen Viren wie Ebola oder Flaviviren in Verbindung gebracht [184, 190].

Um eine mögliche Beteiligung eines oder mehrerer solcher löslicher Faktoren an der ADE von B19V näher zu untersuchen, wurden zunächst Infektionsversuche mit hitzeinaktivierten α -B19V-IgG-Fraktionen durchgeführt. Durch eine solche Hitzebehandlung sollten mögliche Komplementfaktoren in der IgG-Fraktion zerstört werden, die hitzestabilen Antikörper ihre Funktion jedoch beibehalten [211, 212]. Dazu wurde zunächst die aufgereinigte α -B19V-IgG-Präparation bei 56°C für 30 min in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die endotheliale Hybridzelllinie EA.hy926 sowie die primäre Endothelzelle HCAEC mit einem Gemisch aus B19V-Partikeln und den hitzevorbehandelten α -B19V-Antikörper-positiven IgG-Fraktionen für 3 h bei 37°C infiziert, nach der üblichen Vorinkubation von Virus und Antikörpern für 1 h bei 37°C. Als Positivkontrolle diente ein Infektionsansatz mit unbehandelten α -B19V-IgG und als Negativkontrolle ein Ansatz mit unbehandelten unspezifischen IgG (Abb.4.14 A). Zusätzlich wurde ein weiterer Wettbewerbsversuch mit einem B19V/ α -B19V-IgG-Gemisch nach Vorinkubation der Zellen für 1 h auf Eis mit einer hitzeinaktivierten unspezifischen IgG-Fraktion im direkten Vergleich zur Vorinkubation mit einer nicht behandelten unspezifischen IgG-Fraktion durchgeführt (Abb.4.14 B). Weitere Ansätze enthielten die α -B19V-IgG-Präparation in einer hitzevorbehandelten und die zur Konkurrenz eingesetzte unspezifische IgG-Fraktion in einer unbehandelten Form, oder beide IgG-Präparationen in hitzeinaktivierter Form. Wie üblich wurde jeweils eine Kontrolle ohne Antikörper mitgeführt. Nach der DNA-Präparation der infizierten Zellen wurden die aufgenommenen Partikel mit Hilfe der RTq-PCR ermittelt.

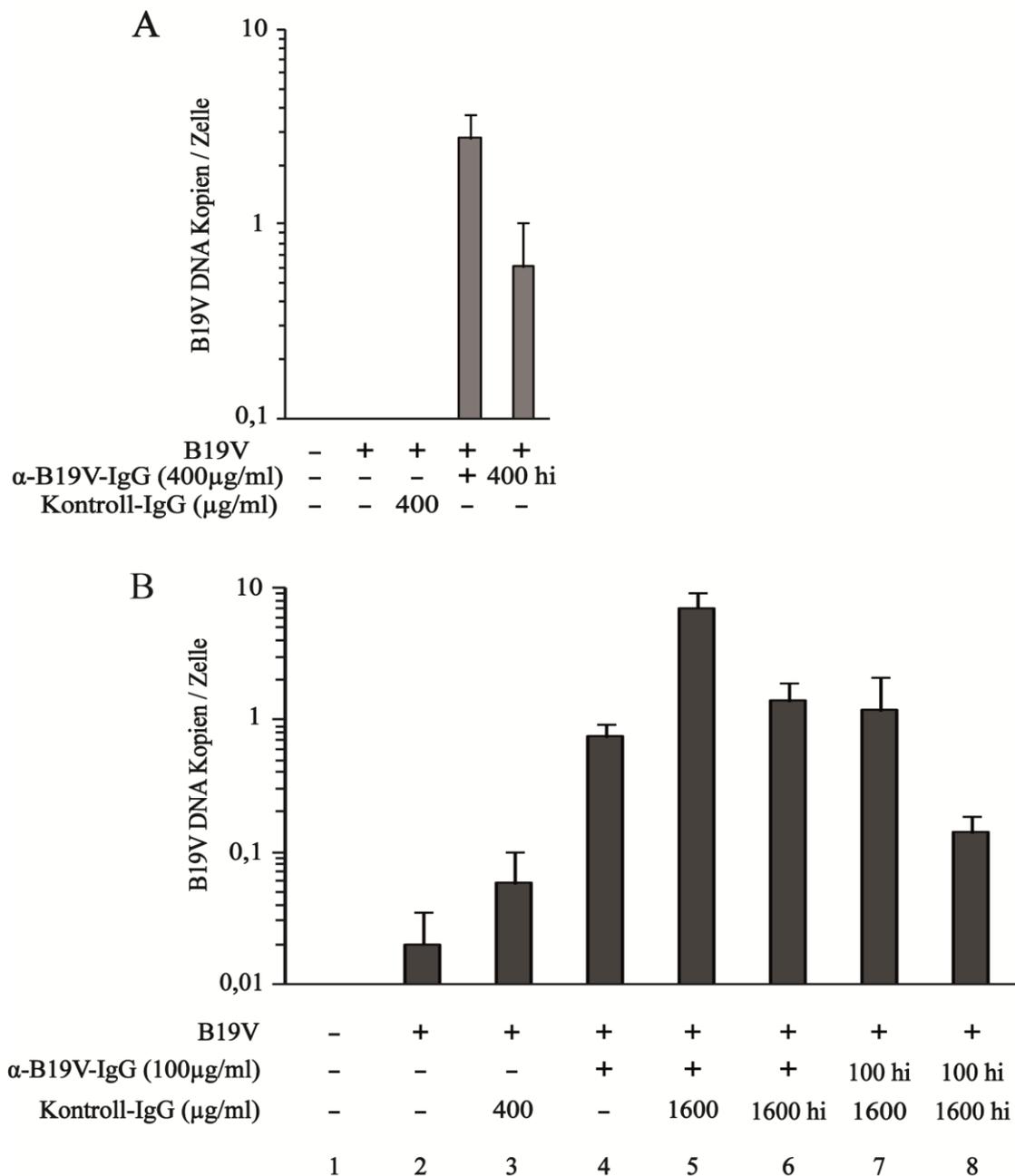


Abb. 4.14 B19V-Infektion in Anwesenheit von hitzeinaktivierten IgG-Fractionen in EA.hy926. **A:** Die endotheliale Hybridzelllinie EA.hy926 wurde mit B19V (D5: 10.000 GE/Zelle) in Gegenwart von hitzeinaktivierten (hi) α -B19V-IgG (400 μ g/ml) infiziert (B19V-IgG-Gemisch: 1 h bei 37°C vorinkubiert). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit B19V und unbehandelten α -B19V-IgG der gleichen Konzentration infiziert. **B:** EA.hy926 wurden sowohl mit hitzeinaktivierten als auch mit unbehandelten unspezifischen Antikörpern (1600 μ g/ml) für 1 h auf Eis vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit B19V (D5: 10.000 GE/Zelle) und hitzeinaktivierten oder unbehandelten α -B19V-IgG (100 μ g/ml) infiziert. Die DNA wurde nach 3 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgGs (400 μ g/ml) von α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

In Abbildung 4.14 A ist das Ergebnis der Infektion mit B19V und hitzeinaktivierten α -B19V-Antikörpern in den EA.hy926-Zellen dargestellt. Nach der Infektion mit B19V und

α -B19V-Antikörpern konnten 2,8 Viruspartikel pro Zelle nachgewiesen werden. Infizierte man die Zellen jedoch mit B19V und hitzeinaktivierten α -B19V-IgG, so konnte man im direkten Vergleich eine Reduktion der Virusaufnahme um den Faktor 4,6 auf 0,6 Partikel pro Zelle feststellen. Die Versuche nach Vorinkubation mit einem Überschuss an unspezifischem IgG, entweder in unbehandelter oder in hitzevorbehandelter Form, ebenfalls in EA.hy926-Zellen durchgeführt, sind in Abbildung 4.14 B dargestellt. Durch Vorinkubation mit unbehandeltem unspezifischem IgG in einer Konzentration von 1600 μ g/ml konnte die durch spezifische α -B19V-Antikörper-vermittelte ADE in Übereinstimmung mit den Daten der vorangegangenen Versuche (vgl. Abbildung 4.12) um den Faktor 9,4 verstärkt werden (Abb.4.14 B, Ansätze 4 und 5). Wurden die Zellen jedoch mit einer hitzebehandelte Fraktion unspez. Antikörper in gleicher Konzentration vorinkubiert, lag die Virusaufnahme wieder auf dem Niveau des Wertes ohne Vorinkubation mit unspezifischen Antikörpern (Abb.4.14 B, Ansatz 6). Durch die Hitzeinaktivierung wird somit der zusätzliche Effekt der unspezifischen IgG-Präparation fast komplett aufgehoben. Wurde die α -B19V-Antikörper-haltige Fraktion hitzebehandelt und die unspezifische IgG-Fraktion in unbehandelter Form für die Vorinkubation eingesetzt, so war die zuvor beobachtete Reduktion der ADE nach Hitzeinaktivierung der α -B19V-IgG-Präparation (vgl. Abb.4.14 A) aufgehoben (Abb.4.14 B, vgl. Ansatz 7 mit Ansatz 4). Dies bedeutet, dass an der ADE beteiligte hitzelabile Faktoren in der α -B19V-spezifischen IgG-Fraktion durch solche aus der unspezifischen Fraktion ersetzt werden können. Wurden beide IgG-Präparationen hitzeinaktiviert, war damit ein weitgehender Verlust der ADE verbunden (Abb.4.14 B, Ansatz 8). Insgesamt muss man sagen, dass die Infektionsrate in dieser speziellen Versuchsreihe etwas unter der vorangegangener Infektionen in der gleichen Zelllinie lag.

In Abbildung 4.15 ist das Ergebnis des analogen Wettbewerbsversuches mit den jeweiligen hitzeinaktivierten IgG-Fraktionen in den HCAEC dargestellt. Die reine B19V-Infektion sowie die Infektion in Anwesenheit von α -B19V-negativem IgG zeigten wie erwartet eine Virusaufnahme auf niedrigem Niveau mit durchschnittlich 0,35 Partikeln pro Zelle. Die Verstärkung der Aufnahme durch die Zugabe von α -B19V-Antikörper-positiven IgG-Präparationen (100 μ g/ml) war in dieser Versuchsreihe mit einer 21-fachen Steigerung etwas schwächer ausgeprägt als zuvor (vgl. Abb.4.5 C), jedoch immer noch deutlich. Wurden die Zellen vor der Infektion mit B19V und dem α -B19V-IgG mit einer unbehandelten unspez. IgG-Fraktion vorinkubiert, verstärkte sich die Virusaufnahme noch einmal um einen Faktor von 35 (Abb.4.15, vgl Ansatz 5 mit Ansatz 4). Dieser zusätzliche

Effekt der unspezifischen IgG-Präparation wurde jedoch ähnlich wie bei den EA.hy926-Zellen durch Hitzeinaktivierung weitgehend, wenn auch nicht komplett, aufgehoben (Abb.4.15, Ansatz 6). Ebenfalls übereinstimmend mit den Daten aus den EA.hy926-Zellen konnte die Hitzeinaktivierung der α -B19V-IgG-Fraktion durch die Zugabe von unspezifischem IgG vollständig kompensiert werden (Ansatz 7). Es war eine Reduktion der ADE nach Hitzeinaktivierung beider IgG-Präparationen (Ansatz 8) zu beobachten, diese war jedoch nicht so stark wie bei den EA.hy926-Zellen, wo die Virusaufnahme in diesem Ansatz auf dem gleichen Niveau wie bei der Infektion mit B19V und α -B19V-negativem IgG lag.

Die für die EA.hy926 und HCAEC erhaltenen Ergebnisse mit hitzevorbehandelten IgG-Präparationen lassen darauf schließen, dass der Effekt der ADE für Parvovirus B19 in Endothelzellen zusätzlich zu den Antikörpern über einen oder mehrere hitzelabile Antikörper-assoziierte lösliche Faktor(en) vermittelt wird.

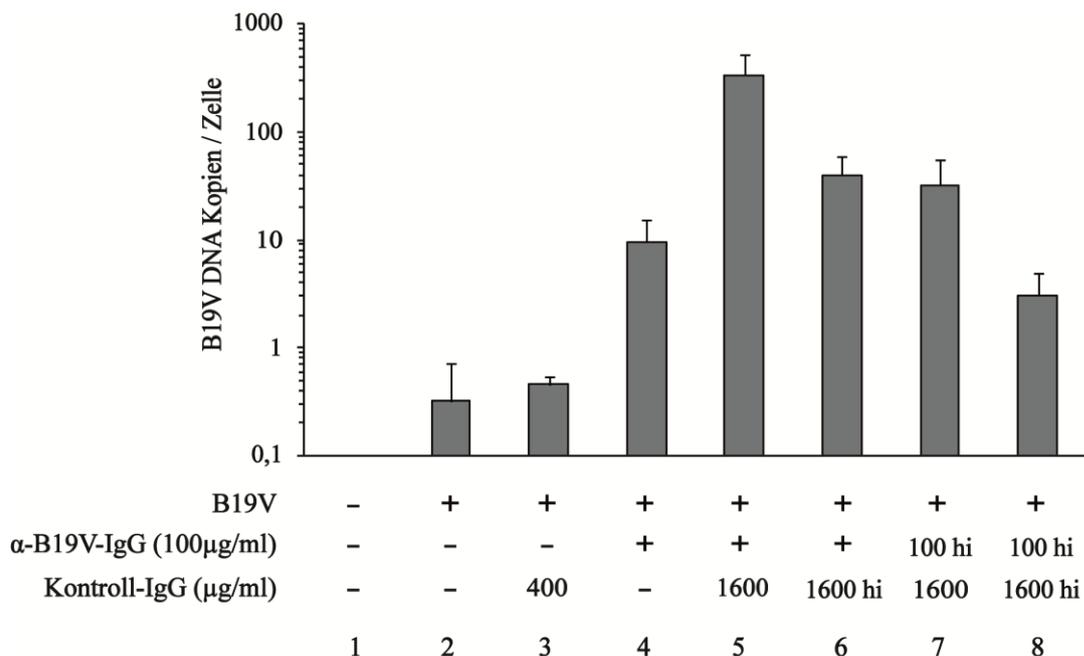


Abb. 4.15 B19V-Infektion in Anwesenheit von hitzeinaktivierten IgG-Fractionen in HCAEC. HCAEC wurden sowohl mit hitzeinaktivierten als auch mit unbehandelten unspezifischen Antikörpern (1600 μ g/ml) für 1 h auf Eis vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit B19V (D5: 10.000 GE/Zelle) und hitzeinaktivierten bzw. unbehandelten α -B19V-IgG-Präparation (100 μ g/ml) infiziert. Die DNA wurde nach 3 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgGs (400 μ g/ml) von α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Aufgrund der Tatsache, dass bereits für verschiedene andere Viren, wie z.B. das Ebolavirus, die Beteiligung von Komponenten des Komplementsystems an der ADE nachgewiesen werden konnte [185], lag es daher nahe, solche Komplement-Faktoren näher zu untersuchen. Als Schlüsselkomponente des Komplementsystems bei der ADE wurde das C1q identifiziert, wobei zwei alternative Mechanismen beschrieben sind. C1q kann zum einen die klassische Komplementkaskade aktivieren und so das Virus über den C3-Rezeptor in die Zelle schleusen. Alternativ kann es ohne die Aktivierung weiterer Komplementfaktoren direkt über den C1q-Rezeptor (CD93) die Virusaufnahme vermitteln. Daher wurden die primären Endothelzellen HCAEC mit B19V in Anwesenheit von α -B19V-IgG in Gegenwart eines spezifischen Antikörper gegen den C1q-(CD93)-Rezeptor auf der Zelloberfläche für 3 h bei 37°C inkubiert und die aufgenommene Virusmenge mit der in Abwesenheit des CD93-Antikörpers verglichen. Um eine Beteiligung der klassischen Komplementkaskade zu untersuchen, wurde ein weiterer Infektionsansatz mit dem B19V- α -B19V-IgG-Gemisch in Gegenwart von EGTA durchgeführt. Das EGTA stört die Calcium-abhängige Aktivierung des Komplementsystems, wirkt jedoch eher verstärkend auf die direkte Aktivierung von C1q und Bindung an seinen Rezeptor. Nach der Aufreinigung der DNA wurden die B19V-Partikel mittels RTq-PCR detektiert.

In Abbildung 4.16 sind die Ergebnisse der Antikörper-vermittelten B19V-Infektionen in Anwesenheit von α -CD93-Antikörpern sowie EGTA in den HCAEC zusammengefasst. In Anwesenheit der α -CD93-Antikörper mit einer Konzentration von 5 μ g/ml reduzierte sich die Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme signifikant um den Faktor 4,5 im Vergleich zum Wert in Abwesenheit des α -CD93-Antikörpers. Während bei alleiniger Anwesenheit der α -B19V-Antikörper noch 107 Partikel pro Zelle aufgenommen wurden, waren es nach Zugabe von α -CD93-Antikörpern (5 μ g/ml) nur noch 24 B19V-Partikel pro Zelle. Wurde die Konzentration der α -CD93-Antikörper auf 20 μ g/ml erhöht, konnte man keine stärkere Reduktion der Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahme beobachten. Es kam sogar zu einer tendenziell leichten Abschwächung des Hemmeffekts. Im Gegensatz dazu konnte nach Inhibition der Komplementkaskade durch EGTA keine nennenswerte Abschwächung der ADE beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Parvovirus B19 mit großer Wahrscheinlichkeit über B19V-spezifische Antikörper unter Beteiligung der Komplement-Komponente C1q und des C1q-spezifischen zellulären Rezeptors in endotheliale Zellen aufgenommen wird. Eine Aufnahme über den C3-Rezeptor nach Aktivierung der klassischen Komplementkaskade kann hingegen ausgeschlossen werden.

Der gleiche Mechanismus konnte bereits für die Ebolavirus-*Zaire*-Infektion in endothelialen Zellen demonstriert werden.

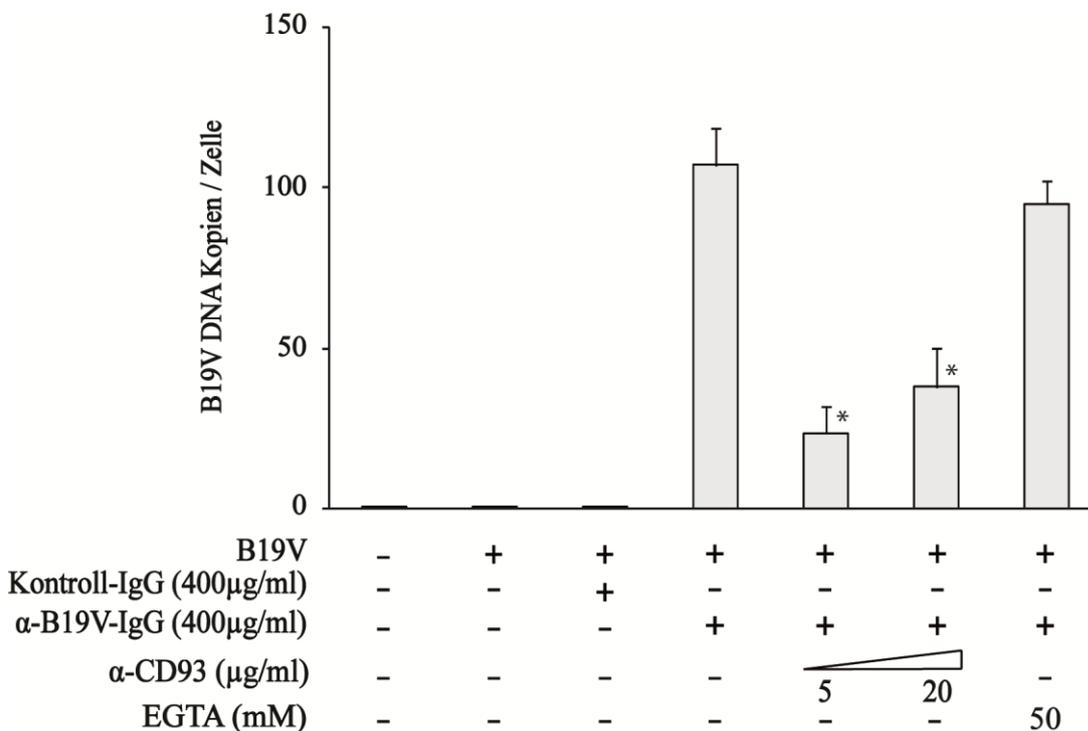


Abb. 4.16 Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in HCAEC nach Blockierung des C1q-Rezeptors oder unspezifischer Inhibition des Komplementsystems. Die Endothelzelle HCAEC wurde mit einem Gemisch aus B19V (D5: 10.000 GE/Zelle), α -B19V-IgG (400 μ g/ml) und α -CD93-Antikörper (5; 20 μ g/ml), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert. Die DNA wurde nach 3 h bei 37°C p.i. isoliert. Die Quantifizierung der aufgenommenen B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgGs (400 μ g/ml) von α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Ein Ansatz in Gegenwart von EGTA in einer Endkonzentration von 50 mM wurde zur Untersuchung der Rolle der klassischen Komplementkaskade mitgeführt. Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. (*= $p < 0,05$)

4.3. Weiterer Infektionsverlauf nach Antikörper-vermittelter B19V-Aufnahme in Endothelzellen

Nach dem im ersten Teil der Arbeit detailliert gezeigt werden konnte, dass Parvovirus B19 in großem Umfang über einen alternativen α -B19V-Antikörper-vermittelten Mechanismus in Endothelzellen aufgenommen werden kann, wurden im zweiten Teil die Post Entry-Schritte nach der B19V-Aufnahme in Gegenwart von α -B19V-Antikörper näher charakterisiert. Dabei wurde der Virustransport in den Nukleus, die mRNA-Expression sowie die Replikation von B19V in Endothelzellen untersucht.

4.3.1. Transport von B19V-Partikeln in den Nukleus verschiedener Zelllinien

Zur Überprüfung, ob die mittels Antikörper aufgenommenen Viruspartikel auch in den Nukleus der Zelle transportiert werden, wurden U937, EA.hy926 und HCAEC in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern mit B19V infiziert und die infizierten Zellen im Anschluss mit Hilfe von hypotonischer Lyse und Hochsalzextraktion in Zytoplasma- und Kernfraktion aufgespalten. Die erhaltenen Fraktionen wurden zum einen proteinchemisch im Western-Blot untersucht, um die Reinheit der Fraktionen festzustellen, zum anderen wurde die DNA isoliert und mittels RTq-PCR die B19V-Partikel detektiert. Auch hier wurde ein Infektionsansatz mit α -B19V-negativem IgG als Negativkontrolle und eine B19V-Infektion ohne Antikörper als weitere Kontrolle mitgeführt.

In Abbildung 4.17 ist die Antikörper-vermittelte B19V-Aufnahme in den einzelnen Zellfraktionen in allen drei untersuchten Zelllinien zusammengefasst. Vergleicht man die zytoplasmatische Fraktion mit der Kernfraktion der U937-Zelllinie (Abb. 4.17 A), so stellt man fest, dass bei der reinen B19V-Infektion sowie bei der Infektion mit B19V in Anwesenheit von α -B19V-negativem IgG in beiden Fraktionen eine ähnliche Anzahl von B19V-Partikeln pro Zelle detektiert werden konnten. Wie bei allen vorangegangenen Versuchen war die Infektionsrate der beiden Ansätze mit durchschnittlich 0,18 Partikeln pro Zelle sehr gering. Betrachtet man die B19V-Infektion in Gegenwart von α -B19V-Antikörpern, unterscheiden sich die beiden Fraktionen hingegen sehr stark. Der überwiegende Teil der durch ADE aufgenommenen Viruspartikel akkumulierte im Zellkern (263 Viruspartikel pro Zelle), während nur ein Bruchteil in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert werden konnte (1,2 Partikel pro Zelle). Auch in der endothelialen Hybridzelllinie EA.hy926 (Abb.4.17 B) wurden nach Infektion mit B19V in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern eine deutlich größere Menge von B19V-Partikeln in der Kernfraktion (33 Partikel pro Zelle) als in der zytoplasmatischen Fraktion (0,7 Viruspartikel pro Zelle) detektiert. Die reine B19V-Infektion sowie die Infektion in Anwesenheit des Kontroll-IgG zeigten in beiden Fraktionen nur eine sehr schwache B19V-Aufnahme mit durchschnittlich 0,05 Partikeln pro Zelle. In der primären Endothelzelle HCAEC war die B19V-Kopienzahl auch bei der reinen B19V-Infektion sowie bei der Infektion in Gegenwart von α -B19V-negativen Antikörpern in der Kernfraktion gegenüber der zytoplasmatischen Fraktion um das 4-fache bzw. um das 10-fache erhöht, mit in beiden Fällen 2,6 Partikeln in der Kernfraktion immer noch auf einem niedrigem Niveau. Bei der Infektion mit B19V in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern wurden mit 34 B19V-Partikeln pro Zelle in der Kernfraktion 70 Mal mehr Partikel als im Zytoplasma detektiert.

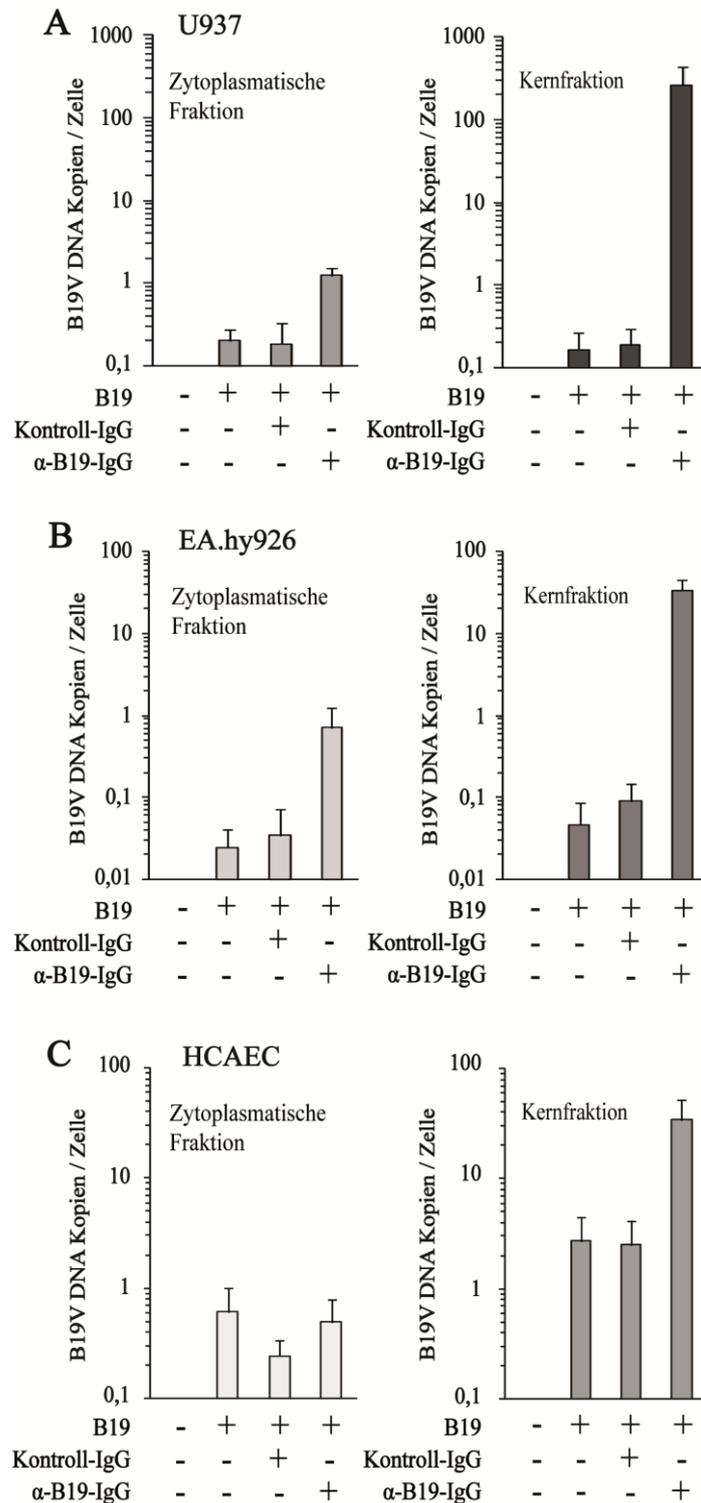


Abb. 4.17 Nachweis von B19V-Partikel im Zytoplasma und im Zellkern von B19V infizierten U937, EA.hy926 und HCAEC. Die Zellen wurden mit einem Virus-IgG-Gemisch (B19V(D5): 10.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, für 3 h bei 37°C infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels hypotonischer Lyse und Hochsalzextraktion in Zytoplasma- und Kernfraktion aufgespalten und die DNA aus diesen Fraktionen isoliert. Die Quantifizierung der B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. Die Vorinkubation mit IgGs (400 μ g/ml) aus α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Ergebnisse wurden logarithmisch dargestellt. Das Diagramm zeigt eine Zusammenfassung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in Gegenwart von α -B19V-Antikörpern internalisierten B19V-Partikel zu einem sehr hohen Prozentsatz in den Zellkern transportiert werden.

Um die Reinheit der gewonnenen Zellfraktionen zu untersuchen, wurde eine proteinchemische Western-Blot-Analyse von Markerproteinen für diese Fraktionen durchgeführt. Dabei wurden die Proteine der beiden Fraktionen unter denaturierenden Bedingungen über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss wurde die jeweilige Menge des zytoplasmatischen Proteins Tubulin sowie des Kernproteins MCM7 mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmt.

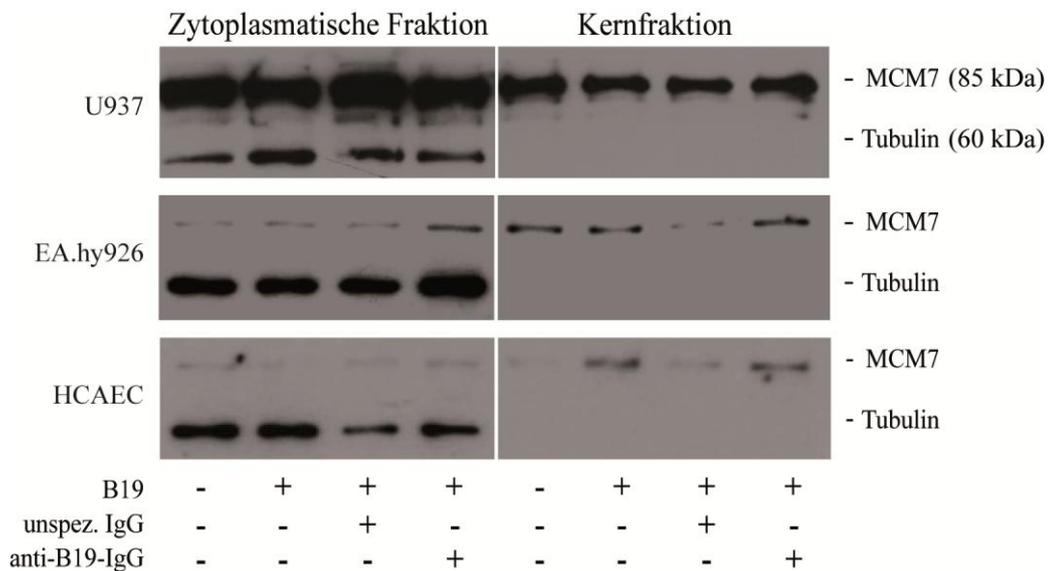


Abb. 4.18 Überprüfung des Reinheitsgrades der Zellfraktionierungen der Zelllinien U937, EA.hy926 und HCAEC. Die Zellen wurden ausschließlich mit B19V oder in Gegenwart spezifischer bzw. unspezifischer Antikörper (Virus-IgG-Gemisch (B19V(D5): 10.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), Vorinkubation: 1 h bei 37°C) für 3 h bei 37°C infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels hypotonischer Lyse und Hochsalzextraktion in Zytoplasma- und Kernfraktion aufgetrennt und die Proteinextrakte im Western-Blot (verwendete Antikörper: α -Tubulin (1:2000); α -MCM7 (1:1000)) analysiert. Das Diagramm zeigt exemplarisch einen repräsentativen von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

In Abbildung 4.18 sind die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse der drei untersuchten Zelllinien dargestellt. Das Protein Tubulin, welches als zytoplasmatischer Marker verwendet wurde, konnte in allen drei Zelllinien ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden. In der Kernfraktion der drei Zelllinien konnte kein Tubulin detektiert werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass sich keine zytoplasmatischen Verunreinigungen in den erhaltenen Kernfraktionen befinden. Als

kernspezifischen Marker wurde das MCM7-Protein verwendet. Es konnte in allen drei Zelllinien in der Kernfraktion nachgewiesen werden. In den EA.hy926 und den HCAEC wurden geringe Mengen des MCM7 ebenfalls in der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen. Größere Mengen des MCM7 wurden in der zytoplasmatischen Fraktion der monozytären Zelllinie U937 nachgewiesen. Eine Fraktion, ausschließlich zytoplasmatischen Ursprungs konnte mit der verwendeten Methode nicht hergestellt werden. Diese Verunreinigung der zytoplasmatischen Fraktion beeinträchtigt jedoch nicht die getroffene Schlussfolgerung, dass der überwiegende Teil der in Gegenwart von spezifischen Antikörpern internalisierten B19V-Virionen in den Nukleus transportiert werden, da der Anteil im Nukleus durch die Verunreinigung der zytoplasmatischen Fraktion mit Kernproteinen eher unterschätzt wird.

4.3.2. Transkription viraler Gene nach Antikörper-vermittelter B19V-Aufnahme in Endothelzellen

Im Anschluss an den Nachweis, dass die Viruspartikel nach der Antikörper-vermittelten Aufnahme in den Zellkern transportiert werden, wurde die Transkription der viralen Proteine näher untersucht. Dazu wurden die monozytäre Zelllinie U937, die endotheliale Hybridzelllinie EA.hy926 und die primäre Endothelzelle HCAEC mit einem Virus/ α -B19V-IgG-Gemisch (B19V (D5): 10.000 Partikel/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert und für 72 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert, mit DNase behandelt und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe von RTq-PCR-Untersuchungen wurde dann die Menge verschiedener viraler mRNAs quantifiziert. Dabei wurden die Transkripte für das Strukturprotein VP1, das 11-kDa-Protein und das Nichtstrukturprotein NS1 analysiert. Als Kontrollen wurden Zellen mit B19V und α -B19V-negativem IgG sowie mit B19V in Abwesenheit von Antikörpern infiziert.

In allen drei untersuchten Zelllinien konnte sowohl bei der reinen B19V-Infektion als auch bei der B19V-Infektion in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern keine mRNA von VP2 und dem 11-kDa-Protein detektiert werden. Eine reine B19V-Infektion von HCAEC mit einer höheren MOI (5000 Partikel/Zelle) des B19V-D2-Stock, der gegenüber dem für die meisten anderen Experimente verwendeten B19V-D5-Stock eine ca. 1000-fach erhöhte Infektiösität aufwies (siehe Tab. 2.2.), zeigte eine sehr schwache Transkription der mRNAs für das Strukturprotein VP2 und das 11-kDa-Protein, jedoch konnte auch hier bei der Infektion mit B19V und α -B19V-Antikörpern keine mRNA der beiden Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Das Nichtstrukturprotein NS1 wurde in allen untersuchten Zelllinien bei der B19V-Infektion in Abwesenheit von Antikörpern sehr schwach transkribiert. Im Vergleich dazu konnte man bei der B19V-Infektion in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern keine oder eine noch geringere mRNA des NS1-Proteins als bei der reinen B19V-Infektion feststellen. Zusammenfassend kann man sagen, dass es nach der Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahme trotz der stark erhöhten Anzahl viraler Partikel im Zellkern zu keiner gesteigerten viralen Genexpression gegenüber den Infektionsansätzen ohne Antikörper kam. Aufgrund der sehr schwachen bzw. nicht nachweisbaren mRNA wurden die Ergebnisse tabellarisch dargestellt.

Tab. 4.1. : mRNA-Expression der viralen Proteine VP2, 11-kDa-Protein und NS1 in den Zelllinien U937, EA.hy926 und HCAEC (- keine Expression, ++ schwache Expression, + sehr schwache Expression)

Zelllinie	Versuchsansatz	mRNA der untersuchten Proteine		
		VP2	11-kDa-Protein	NS1
<i>U937</i>	mock	-	-	-
	B19V	-	-	++
	B19V + Kontroll-IgG (400 μ g/ml)	-	-	++
	B19V + α -B19V-IgG (400 μ g/ml)	-	-	+
<i>EA.hy926</i>	mock	-	-	-
	B19V	-	-	++
	B19V + Kontroll-IgG (400 μ g/ml)	-	-	++
	B19V + α -B19V-IgG (400 μ g/ml)	-	-	-
<i>HCAEC</i>	mock	-	-	-
	B19V	-	-	++
	B19V + Kontroll-IgG (400 μ g/ml)	-	-	++
	B19V + α -B19V-IgG (400 μ g/ml)	-	-	+

4.3.3. Replikation des viralen Genoms nach Antikörper-vermittelter B19V-Infektion in Endothelzellen

Neben der Transkription viraler mRNA wurde die Replikation des B19V-Genoms in den Zelllinien U937, EA.hy926 und HCAEC nach Antikörper-vermittelter Aufnahme untersucht. Dazu wurden die Zellen in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern (400 μ g/ml) infiziert und für 72 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe der HIRT-Extraktion niedermolekulare DNA isoliert. Durch eine Southern-Blot-Analyse wurden die Replikationsformen von B19V analysiert. Als Positivkontrolle diente die DNA von HEK293-Zellen, welche mit dem M20-Plasmid (enthält die gesamte B19V-DNA-Sequenz)

und dem Helferplasmid pHelper (enthält die adenovirale Helferfunktionen E2a, E4orf6 und die VA-RNA) transfiziert wurden. Unter diesen Bedingungen kommt es in HEK293-Zellen zur Bildung der charakteristischen B19V-Replikationsintermediate [213]. Die reine B19V-Infektion sowie die Infektion mit B19V und unspez. Antikörpern der jeweiligen Zelllinien wurden ebenfalls als Kontrollen mitgeführt. In Abbildung 4.18 ist das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse der drei untersuchten Zelllinien dargestellt.

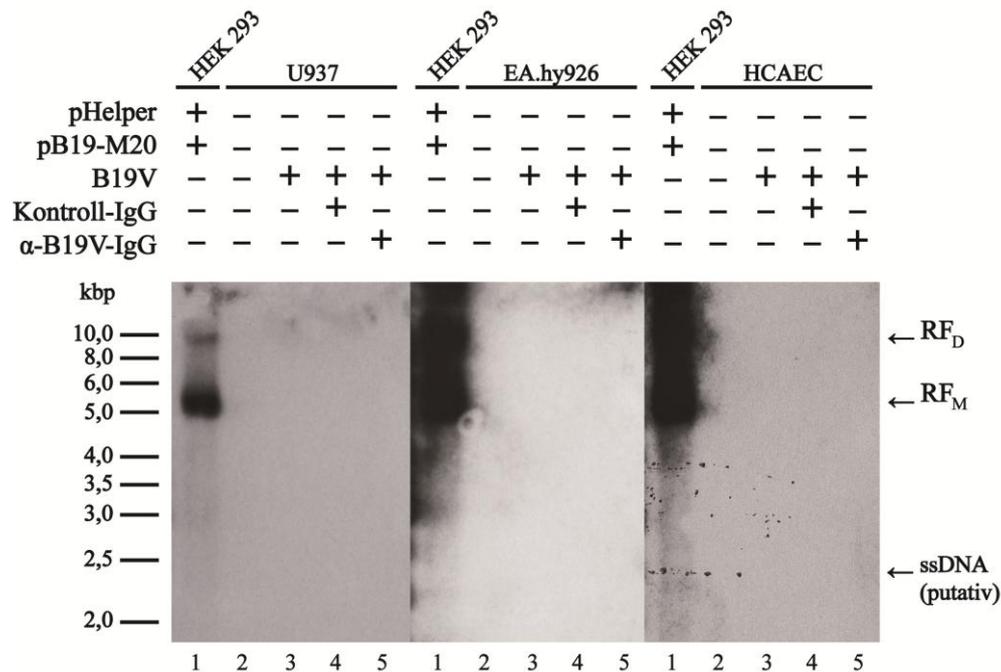


Abb. 4.19 Untersuchung einer möglichen B19V-Replikation in U937, EA.hy926 und HCAEC. Die Zellen wurden mit einem Virus-IgG-Gemisch (B19V(D5): 10.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, für 3 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Infektionsansätze mit Medium aufgefüllt und für weitere 72 h inkubiert. Die niedermolekulare DNA wurde mittels HIRT-Extraktion isoliert. Der Nachweis der Replikationsformen von B19V erfolgte mit Hilfe eines Southern-Blots. IgGs (400 μ g/ml) aus α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Als Positivkontrolle wurde die DpnI-verdaute HIRT-DNA von HEK293-Zellen, die mit dem B19V-M20-Plasmid und dem pHelper (Adenovirale Funktionen) ko-transfiziert wurden, im Southern-Blot eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit einem 5608 bp Sall-Fragment aus pB19-M20, welches das komplette B19V-Genom umfasst. Das Diagramm zeigt exemplarischen je einen von je zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Bei der Positivkontrolle, den mit einem infektiösen B19V-Genom und frühen adenoviralen Funktionen ko-transfizierten HEK293-Zellen, kann man DpnI-resistente Banden mit Größen von 5,6 kb und 11 kb erkennen. Hierbei handelte es sich um die monomerischen und die dimerischen Replikationsformen von B19V. Somit konnte hier eine Replikation des viralen Genoms nachgewiesen werden. Bei den drei untersuchten Zelllinien hingegen

war sowohl bei der reinen B19V-Infektion als auch bei der Infektion in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern keine der beiden Replikationsformen detektierbar.

Bei einer Infektion mit einer höheren MOI (5000 Viruspartikel/Zelle) des infektiöseren B19V-D2-Stocks konnten, wie in Abbildung 4.20 dargestellt, ausschließlich virale DNA-Moleküle detektiert werden, die in ihrem Laufverhalten der monomerischen doppelsträngigen (ds) und der monomerischen einzelsträngigen (ss) Form der viralen DNA entsprechen, nachgewiesen werden. Aufgrund des Fehlens der replikativen dimerischen Form der viralen DNA und der hohen MOI ist davon auszugehen, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die aufgenommene "Input"-DNA handelt. Die doppelsträngige Form könnte dabei durch die Hybridisierung von getrennt verpackten komplementären Strängen entstehen. Anhand der erhaltenen Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die über spezifische Antikörper in endotheliale Zellen aufgenommene B19V-DNA innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht repliziert wird.

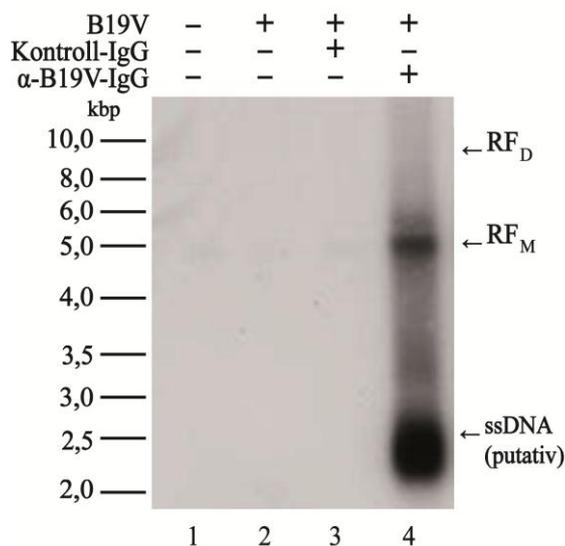


Abb. 4.20 B19V-Replikation in EA.hy926 nach B19V-Infektion mit hoher MOI. Die Zellen wurden mit einem Virus-IgG-Gemisch (B19V(D2): 5.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches für 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, für 3 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Infektionsansätze mit Medium aufgefüllt und für weitere 72 h inkubiert. Danach wurde die niedermolekulare DNA mittels HIRT-Extraktion isoliert. Der Nachweis der Replikationsformen von B19V erfolgte mit Hilfe eines Southern-Blots. IgGs (400 μ g/ml) aus α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Die Hybridisierung erfolgte mit einem 5608 bp Sall-Fragment aus pB19-M20, welches das komplette B19V-Genom umfasst.

Da keine B19V DNA-Replikationsintermediate nach Antikörper-vermittelter Aufnahme in den endothelialen Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde zusätzlich ein Langzeitexperiment durchgeführt, bei dem die Gesamtmenge viraler DNA nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt wurde. Damit sollte überprüft werden, ob die virale

DNA zu einem späteren Zeitpunkt in der Zelle vermehrt wird. Die monozytäre Zelllinie U937, die endotheliale Hybridzelllinien EA.hy926 und die primäre Endothelzelle HCAEC wurden mit einem B19V- α -B19V-IgG-Gemisch, welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, infiziert und für 12 h bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde nach 12 h geerntet und die DNA isoliert. Die restlichen Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit neuem Medium versorgt und für weitere 6 d, 12 d und 20 d inkubiert. Die isolierte DNA aller vier Zeitpunkte wurde anschließend in eine B19V-spezifische RTq-PCR eingesetzt.

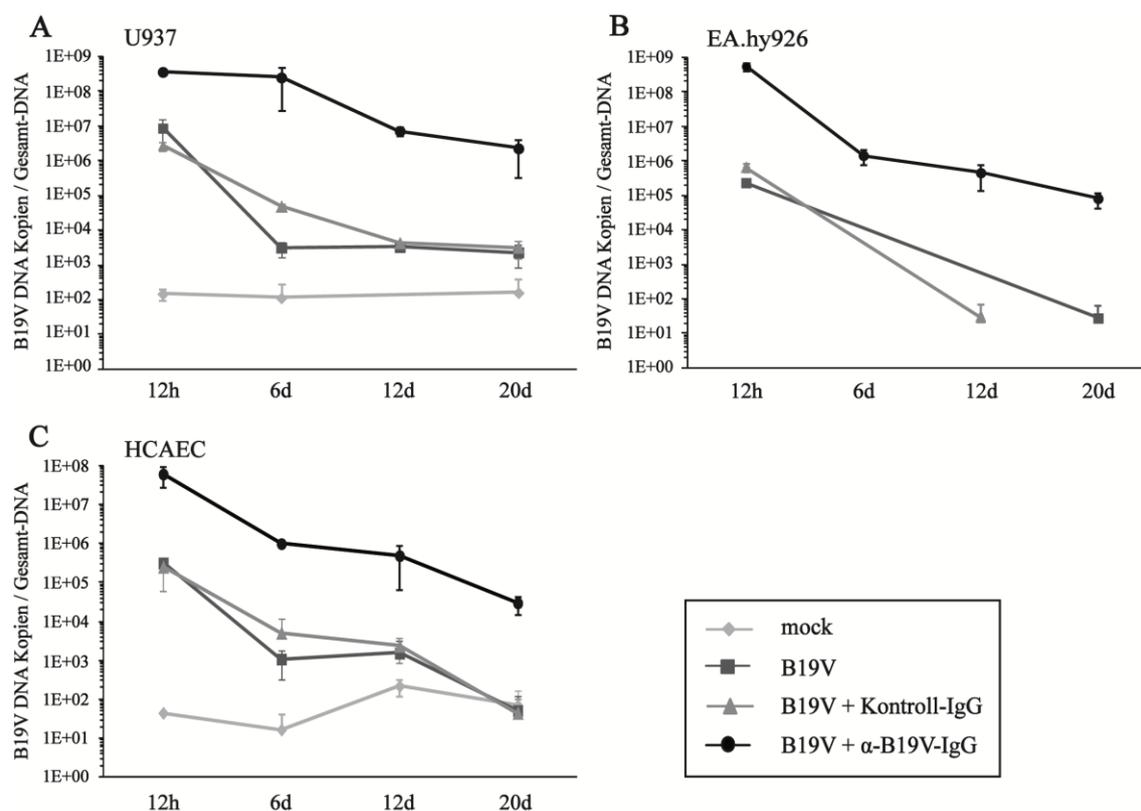


Abb. 4.21 B19V-Infektion in Gegenwart von α -B19V-Antikörpern in verschiedenen Zellen über einen Zeitraum von 20 Tagen. Die monozytäre Zelllinie U937 (A), die permanente endotheliale Hybridzelllinie EA.hy926 (B) und die primäre Endothelzelle HCAEC wurden mit einem B19V-IgG-Gemisch (B19V (D2: 1.000 GE/Zelle; IgG: 400 μ g/ml), welches 1 h bei 37°C vorinkubiert wurde, für 12 h (erster Messpunkt) infiziert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, auf frisches Medium gesetzt und für weitere 6 d, 12 d und 20 d inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde die DNA isoliert. Die Quantifizierung der B19V-Partikel erfolgte mittels RTq-PCR. IgG-Fractionen (400 μ g/ml) aus α -B19V-negativem Serum wurde als Negativkontrolle verwendet, als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen ohne Antikörper infiziert. Es wurden die B19V-DNA-Kopien von der Gesamt-DNA der Probe \pm Standardabweichung zum jeweiligen Zeitpunkt auf einer logarithmischen Skala dargestellt.

In Abbildung 4.21 ist der B19V-Infektionsverlauf über 20 Tage in den drei untersuchten Zelllinien zusammengefasst. In den U937-Zellen (A) konnten 12 h nach der Infektion mit B19V und α -B19V-Antikörpern $3,5 \times 10^8$ B19V-DNA-Kopien aus der Gesamt-DNA der Probe nachgewiesen werden. Nach 12 Tagen war die Virus-DNA-Menge bereits 50-fach

reduziert und nach 20 Tagen p.i. wurden nur noch $2,2 \times 10^6$ virale DNA-Kopien detektiert. Auch bei der Infektion mit B19V in Abwesenheit von Antikörpern konnte im zeitlichen Verlauf über 20 Tage keine Virus-DNA-Erhöhung beobachtet werden. In den EA.hy926 (B) wurden 12 h nach der Infektion mit B19V in Anwesenheit von B19V-positiven Antikörpern insgesamt $5,5 \times 10^8$ B19V-DNA-Kopien in der Probe detektiert. Die Virus-DNA-Menge sank auch hier mit steigender Inkubationszeit kontinuierlich ab. An Tag 20 konnten nur noch 8×10^4 virale DNA-Kopien in der gesamten DNA-Menge des Versuchsansatzes nachgewiesen werden. Wie bereits in den U937-Zellen, ergaben sich auch bei der Infektion der EA.hy926-Zelllinie mit B19V in Abwesenheit von Antikörpern keine Hinweise auf eine Replikation der B19V-DNA.

Auch bei der primären Endothelzelle HCAEC (C) kam es nach Infektion mit B19V in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern im zeitlichen Verlauf zu einem stetigem Abfall der B19V-DNA-Menge. Konnten nach 12 h p.i. noch insgesamt 6×10^7 B19V-DNA-Kopien in der Probe nachgewiesen werden, so waren es nach 20 Tagen noch 3×10^4 virale DNA-Kopien. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es auch zu einem späteren Zeitpunkt in den drei untersuchten Zelllinien keinen Hinweis auf eine Replikation der in Gegenwart von spezifischen Antikörpern aufgenommenen B19V-DNA gibt. Die stetige Abnahme des relativen Anteils an viraler DNA lässt sich durch deren Ausverdünnung im Zuge der Teilung der primär infizierten Zellen erklären.

5. Diskussion

Parvovirus B19 (B19V) ist ein autonom replizierendes, einzelsträngiges DNA-Virus, das sich aufgrund seines starken Zell- und Gewebetropismus ausschließlich in erytroiden Vorläuferzellen oder fetalen Leberzellen vermehrt [109]. Das typische Krankheitsbild, welches durch B19V verursacht wird, ist das *Erythema infectiosum*, auch unter der Bezeichnung Ringelröteln bekannt [4, 118]. Bei einer B19V-Infektion in der Schwangerschaft kann es zur Entstehung eines *Hydrops fetalis* beim Fetus kommen oder zu Aborten [128, 130]. Aplastische Krisen und Polyarthritiden sind ebenfalls typische Krankheitsbilder von B19V [117, 122-124]. In den letzten Jahren wurde, durch die Weiterentwicklung neuer, verbesserter Nachweismethoden, B19V-DNA in Endomyokardbiopsien von Patienten mit verschiedenen Herzerkrankungen detektiert [153, 160, 164, 167]. Dies ließ die Vermutung nahe, dass es sich bei B19V auch um ein kardiotropes Virus handeln könnte. In zahlreichen Studien wurde die ätiopathophysiologische Rolle von B19V im Herzen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind jedoch ambivalent und reichen von einer asymptomatischen, langjährigen Latenz der B19V-DNA in den Endothelzellen des Herzens [165, 166] bis hin zu einer Assoziation von B19V mit Herzerkrankungen wie akuten und chronischen Myokarditiden und inflammatorischer dilatativer Kardiomyopathie (DCMi) mit endothelialer Dysfunktion [153, 157, 160, 164]. Dabei konnte der genaue Mechanismus der B19V-Aufnahme in Endothelzellen bisher nicht geklärt werden. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe zur klassischen Rezeptor-vermittelten B19V-Aufnahme in verschiedenen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass trotz deutlicher Expression von Virus-spezifischen Rezeptoren und putativen Ko-Rezeptoren auf der Zelloberfläche nur sehr geringe Virusmengen internalisiert werden [208]. Daher lassen sich die in den Endothelzellen des Herzens detektierten Mengen an Virus-DNA nur schwer mit einer Rezeptor-vermittelten Aufnahme in Einklang bringen, was auf die Beteiligung alternativer Aufnahmemechanismen hinweist. Eine für verschiedene Viren gut beschriebene Form der Virusaufnahme verläuft über Antikörper-vermittelte Mechanismen. Da diese Art der Virusaufnahme für B19V in der monozytären Zelllinie U937 bereits beschrieben worden war [209], bestand die Aufgabe in dieser Arbeit darin, zu untersuchen, ob B19V in Endothelzellen ebenfalls über diesen Mechanismus aufgenommen wird. Weiterhin wurde der Infektionsverlauf nach erfolgreicher Virusaufnahme in Endothelzellen näher charakterisiert.

5.1. Analyse der B19V-Aufnahme über einen alternativen Antikörper-vermittelten Mechanismus in Endothelzellen

In allen untersuchten Zellen, zu denen die permanente endotheliale Hybridzelllinie EA.hy926, die primären Endothelzellen HCAEC, HPAEC, HDMEC und HAoEC sowie die semi-permissive UT7-Epo/S1 und die monozytären Zelllinie U937 gehörten, konnte man nach der Infektion mit B19V in Anwesenheit von α -B19V-positiven Antikörpern eine deutlich gesteigerte Zell-assoziierte Virusmenge im Vergleich zu einer reinen B19V-Infektion bzw. einer B19V-Infektion in Anwesenheit von α -B19V-negativen Antikörpern detektieren. Dieses Ergebnis ließ auf einen alternativen Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahmemechanismus (ADE) in endothelialen Zellen schließen. Da jedoch durch den initialen Versuchsaufbau nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob es sich bei dem beobachteten Effekt um eine tatsächliche Internalisierung oder doch nur um eine verbesserte Bindung der Viren an die Zelloberfläche handelt, wurden zusätzlich Bindungs-Aufnahme-Studien durchgeführt. Die Untersuchungen in den Endothelzellen EA.hy926 und HCAEC zeigten, dass die Menge der an die Zelloberfläche gebundenen Viruspartikel in Anwesenheit von α -B19V-positiven Antikörpern nur unwesentlich höher war als bei Infektionen ohne Antikörper oder mit α -B19V-negativen Antikörpern. Schaut man sich dagegen die Mengen der internalisierten B19V-DNA an, so stellt man in beiden Zelllinien einen deutlichen Unterschied zwischen der Infektion mit B19V-spezifischen Antikörpern und Infektionen mit B19V-unspezifischen Antikörpern fest. Während bei der Infektion mit dem Kontroll-IgG bzw. der reinen B19V-Infektion nur sehr wenige von den gebundenen Partikeln in die Zelle aufgenommen wurden, konnte man bei der Infektion mit spezifischen B19V-Antikörpern einen erheblich größeren Anteil an internalisierter viraler DNA detektieren. Die monozytäre U937-Zelllinie zeigte im Gegensatz zu den getesteten Endothelzellen bereits auf der Ebene der Bindung eine deutliche Steigerung der detektierten B19V-Partikel bei der Infektion in Gegenwart von α -B19V-positiven Antikörpern. Auch hier kam es auf der Stufe der Internalisierung nochmals zu einer erheblichen Verstärkung des Effektes in Anwesenheit von B19V-spezifischen Antikörpern. Mit Hilfe der Bindungs-Aufnahme-Untersuchungen konnte daher gezeigt werden, dass der Effekt der ADE für B19V in Endothelzellen ausschließlich auf der Ebene der Internalisierung vermittelt wird, während er in der monozytären Zelllinie bereits bei der Bindung auftritt. Dennoch konnte auch in den U937-Zellen eine starke Zunahme der Internalisierung von B19V in Anwesenheit von α -B19V-positiven Antikörpern beobachtet werden. Somit wurde der Effekt der ADE für B19V in der monozytären Zelllinie U937,

wie er bereits von Munakata et al. beschrieben wurde [209], bestätigt. Die differenziellen Effekte von Antikörpern auf die verschiedenen Teilschritte der Virusaufnahme in den Monozyten und den Endothelzellen legen jedoch nahe, dass zumindest teilweise unterschiedliche Mechanismen der ADE zum Tragen kommen.

Untersuchungen mit unterschiedlichen Antikörpermengen gaben Aufschluss darüber, in wie weit die Aufnahme von B19V von der Konzentration der eingesetzten α -B19V-positiven Antikörper abhängig ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass die B19V-Aufnahme in U937-Zellen bereits bei einer Antikörperkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zur reinen B19V-Infektion oder der Infektion in Anwesenheit von B19V-negativen Antikörpern deutlich gesteigert wurde. Mit zunehmender Konzentration an α -B19V-positiven Antikörpern stieg auch die B19V-Aufnahme, erst bei einer Konzentration von 400 bis 800 $\mu\text{g/ml}$ trat ein Sättigungseffekt ein. In ähnlicher Weise konnte auch in den EA.hy926-Zellen eine kontinuierliche Zunahme der internalisierten B19V-Partikel ab einer Antikörper-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet werden. Hier war jedoch bereits bei einer Antikörper-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ eine weitgehende Sättigung zu beobachten. Durch höhere Konzentration konnte die B19V-Aufnahme allenfalls noch marginal gesteigert werden. Eine ebenfalls mögliche Reduktion der Virusaufnahme bei den höchsten Antikörperkonzentrationen, bedingt durch eventuelle neutralisierende Effekte der Antikörper, konnte jedoch in keiner der beiden Zelllinien beobachtet werden. In der primären Endothelzelle HCAEC kam es bis zur höchsten Konzentration von 800 $\mu\text{g/ml}$ zu einer kontinuierlichen Steigerung der Virusaufnahme. In der bereits erwähnten Studie zur ADE von B19V in den U937-Zellen wurde ebenfalls eine Konzentrationsanalyse durchgeführt, jedoch wurde hier bereits bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ der stärkste Effekt beobachtet, während bei 100 $\mu\text{g/ml}$ wieder eine deutliche Abschwächung der ADE detektiert wurde. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Art bzw. die Beschaffenheit der Antikörper sein. So wurde bereits beschrieben, dass das Ausmaß der ADE stark von den verwendeten Antikörpern abhängt [185]. Diese bestehen aus einem Gemisch aus neutralisierenden, verstärkenden und weder neutralisierend noch verstärkend wirkenden Antikörpern. Deren jeweiliger Anteil und ihre Aktivität sind ausschlaggebend dafür, ob das Gesamtgemisch bei einer Virusinfektion neutralisierend wirkt oder aber zu einer Verstärkung der Virusaufnahme führt. Neutralisierende Effekte können beispielsweise durch eine Blockierung der viralen Oberflächenstrukturen für den(die) zellulären Rezeptor(en) oder *in vivo* auch durch eine Aktivierung des Komplementsystems vermittelt werden [185]. Für eine Verstärkung sind ebenfalls

verschiedene Mechanismen, wie die Beteiligung von Fc-Rezeptoren [174, 177] oder Faktoren des Komplementsystems [184, 186] sowie die Aktivierung viraler Proteine [214] oder die Suppression antiviraler zellulärer Mechanismen auf transkriptioneller Ebene [204, 205], beschrieben. Diese Zusammensetzung der spezifischen Antikörper ist abhängig vom Virus aber auch dem immunologischen Zustand des Wirts sowie dem Infektionsort. Welche Funktion die individuellen Antikörper ausüben, hängt stark von ihren jeweiligen Bindungs-Epitopen für das Virus ab. So haben Antikörper, deren Epitope nahe einer Rezeptor-Bindestelle eines viralen Oberflächenmoleküls liegen, oft eine neutralisierende Wirkung. Binden Antikörper spezifisch an Fusionsdomänen für virale Proteine oder Domänen, die zu einer Konformationsänderung von viralen Proteinen führen, sind sie neutralisierend. Das Vorkommen von Antikörper, die mit Fc-Rezeptoren oder dem Komplementfaktor C1q interagieren und somit verstärkend wirken, ist abhängig von den Ig-Isotypen, den Fc-Rezeptor-Typen sowie von der Beschaffenheit der Antikörper-Virusprotein-Komplexe [185]. So ist es z.B. möglich, dass Antikörper, die für ein Virus neutralisierend sind, für einen anderen Subtypen des Virus eine verstärkende Wirkung haben [215, 216].

Auch die Konzentration der Antikörper spielt eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung der Virusaufnahme. So konnte gezeigt werden, dass bei hohen Antikörperkonzentrationen diese eher neutralisierend wirken, während bei niedrigeren Konzentrationen eine verstärkte Aufnahme der Viren zu beobachten war [214, 216]

Ein weiterer wichtiger Aspekt für neutralisierende oder verstärkende Eigenschaften von Antikörpern ist das Vorhandensein und die Menge zellulärer Oberflächenrezeptoren. Je nach Expressionsmuster dieser Rezeptoren können Viren über unterschiedliche Wege in die Zelle aufgenommen werden [217-219].

In der Literatur werden mehrere Formen der ADE beschrieben. So konnte dargelegt werden, dass das Dengue-Virus, welches zur Familie der *Flaviviridae* gehört, in der Lage ist, über die Interaktion des Fc-Teils des Virus-gebundenen Antikörpers mit den spezifischen Fc-Rezeptoren in die Zielzelle gelangt [176]. Ein weiterer Mechanismus der ADE, der ebenfalls bei Flaviviren entdeckt wurde, ist die Antikörper-vermittelte Virusaufnahme über die Aktivierung des Komplementsystems. Dabei ist das C1q, als initiale Komplement-Komponente, am Fc-Teil des Antikörpers gebunden und bewirkt nach der Bindung an das Virus über zusätzliche Komplementkomponenten eine Aktivierung des C3-Fragments. So können die Viren anschließend über den Komplement-Rezeptor C3 in die Zelle aufgenommen werden [184]. Beide Formen der ADE wurden auch für das

Humane Immundefizienz-Virus (HIV) beschrieben [187]. Eine dritte Form der ADE wurde bei Studien über das Ebolavirus identifiziert. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine ADE mit Beteiligung des Komplementsystems. In diesem Fall wird jedoch nicht die klassische Komplementkaskade aktiviert, sondern es findet eine direkte Wechselwirkung der C1q-Komponente mit dem zellulären C1q-Rezeptor statt [190-192].

Zur Identifizierung des Mechanismus der ADE für B19V in Endothelzellen wurde zunächst der Fc-Teil von den Fab-Fragmenten getrennt und die B19V-Infektion in Anwesenheit der aufgereinigten Fab-Fragmente in den EAhy926 und den HCAEC durchgeführt. Als Referenz diente auch hier wieder die Infektion in der monozytären Zelllinie U937. Im Vergleich zur Infektion mit vollständigen Antikörpern wurde der Effekt nach Abspaltung des Fc-Teils vollständig aufgehoben. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass der Fc-Teil des Antikörpers entscheidend ist für die Antikörper-vermittelte Aufnahme des Virus. Für mehrere in der Literatur beschriebene Mechanismen der ADE ist ebenfalls der Fc-Teil des Antikörpers von Bedeutung, daher gibt das erhaltene Ergebnis noch keinen endgültigen Hinweis auf den genauen Mechanismus. Bei vielen Viren wurde bereits die Aufnahme über spezifische Fc-Rezeptoren beschrieben. Auch in der monozytären Zelllinie U937 wurde diese Art der Virusaufnahme für B19V sowie AAV postuliert [209, 220]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Fc γ -Rezeptor-Expressionsstudien zeigten, dass die monozytäre Zelllinie U937, wie erwartet, sowohl den Fc γ -I als auch Fc γ -II-Rezeptor in größeren Mengen auf der Zelloberfläche exprimiert. Betrachtet man jedoch die Fc γ -Rezeptor-Expressionsprofile der untersuchten Endothelzellen, so stellt man fest, dass nur sehr geringe Mengen von Fc γ -I, -II und -III exprimiert werden. Dieses geringe Vorkommen von Fc-Rezeptoren auf der endothelialen Zelloberfläche erklärt jedoch nicht die starken ADE-Effekte in diesen Zellen. In den anschließenden Kompetitionsversuchen sowohl mit spezifischen Antikörpern gegen die Fc γ -Rezeptoren als auch mit unspezifischen Antikörpern konnte in allen getesteten Endothelzellen keine Reduktion, sondern sogar eine leichte Steigerung der B19V-Aufnahme in Anwesenheit von B19V-spezifischen Antikörpern beobachtet werden. Dieses Ergebnis stärkt die Hinweise, dass die ADE hier nicht über Fc-Rezeptoren vermittelt wird. Allerdings konnte auch in den U937-Zellen keine Kompetition durch spezifische Fc γ -R-Antikörper beobachtet werden, was im Widerspruch zu den Ergebnissen der Gruppe um Munakata steht [209]. Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzlichen Ergebnisse ist die Tatsache, dass die Zusammensetzung der verwendeten Antikörper eine große Rolle bei der ADE spielt. Da gezeigt werden konnte, dass die monozytäre Zelllinie U937 eine starke Fc-Rezeptoren-

Expression auf der Oberfläche aufweist, ist es möglich, dass in diesen Zellen sowohl der Mechanismus über Fc-Rezeptoren als auch eine Komplement-vermittelte Variante der ADE zum Tragen kommt. Auf diese Weise überwiegt je nach Bindungseigenschaften der Antikörper für Fc-Rezeptoren und Komplementfaktoren mal der eine und mal der andere Mechanismus.

Für die Endothelzellen gilt dies jedoch nicht, da sie nur eine sehr schwache Fc-Rezeptor-Expression zeigen. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die B19V-Aufnahme ausschließlich über einen Komplementsystem-beteiligten ADE-Mechanismus stattfindet. Um diese These zu bestätigen, wurden zunächst B19V-Infektionsversuche mit hitzevorbehandelten α -B19V-positiven und -negativen IgG-Fraktionen durchgeführt. Durch die Hitzebehandlung der IgG-Fraktionen sollten mögliche lösliche Proteine, die trotz Aufreinigung durch die HPLC in den jeweiligen Fraktionen verblieben waren, unter Erhalt der hitzestabilen Antikörper, zerstört werden, [211, 212]. Der ADE-Effekt wurde durch die Hitzebehandlung der Antikörper deutlich abgeschwächt. Insbesondere bei den Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC) konnte beobachtet werden, dass die Vorbehandlung der Zellen mit einem Überschuss an unspezifischen Antikörpern zu einer Verstärkung des ADE-Effekts führte. Setzte man jedoch eine hitzebehandelte unspezifische IgG-Fraktion zur Vorbehandlung der Zellen ein, so wurde diese Verstärkung wieder aufgehoben. Die erhaltenen Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass ein löslicher Faktor, der eng mit dem Fc-Teil assoziiert ist und durch Hitze beschädigt wird, an der ADE beteiligt ist. Auf der Grundlage der erhaltenen Ergebnisse und Literaturdaten zur ADE bei anderen Virusfamilien lag es nahe, die Mechanismen mit Komplementbeteiligung im Kontext der B19V-Infektion in Endothelzellen ausführlich zu untersuchen. In einem Schlüsselexperiment wurde der C1q-Rezeptor durch einen spezifischen Antikörper (α -CD93) während der B19V-Infektion mit α -B19V-positiven Antikörpern blockiert. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion des ADE-Effektes. Somit kann man mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass B19V ebenso wie das Ebolavirus über eine direkte Interaktion von C1q und dessen Rezeptor (CD93) über Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Durch einen parallelen Ansatz unter Zugabe von EGTA, welches das für die Aktivierung der gesamten Komplementkaskade benötigte Ca^{2+} komplexiert und damit die Aktivierung inhibiert, konnte der alternative, über den klassischen Komplementweg vermittelte Aufnahmemechanismus ausgeschlossen werden.

In verschiedenen Studien zur Expression von C1q-Rezeptoren wurde gezeigt, dass sowohl myeloide Zelllinien und Trombozyten als auch endotheliale Zellen den Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen [221, 222].

In den Untersuchungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte nur indirekt nachgewiesen werden, dass der Komplementfaktor C1q in der aufgereinigten IgG-Fraktion vorhanden sein muss. Doch aufgrund der bisherigen Ergebnisse sowie den Erkenntnissen aus der Literatur scheint es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem ADE-vermittelnden Faktor um das C1q handelt. So sind große Mengen (40-190 µg/ml) dieses Komplementfaktors im Serum oder Plasma vorhanden [223]. Desweiteren ist bekannt, dass der Komplex aus IgG und C1q sehr stabil ist und auch durch Puffer, die andere Protein-Protein-Interaktionen erheblich stören, nicht beeinflusst wird [224]. Da solche Puffersysteme auch bei der Aufreinigung der hier verwendeten IgG-Fraktionen benutzt wurden, ist davon auszugehen, dass sich der Komplementfaktor C1q ebenfalls mit in den Fraktionen befindet. Die Elution der Antikörper aus der Protein G-Säule erfolgt mit Hilfe eines sauren Puffers (pH 2,7). Ein solch saures Milieu ist in der Lage das C1q-Fragment vom Antikörper abzuspalten [224]. Damit lag nach der Elution in den Immunglobulin-Präparationen wahrscheinlich ein Gemisch aus C1q-assoziierten Antikörperkomplexen und freien C1q-Fragmenten vor. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die Verstärkung der ADE, durch die Vorbehandlung der Zellen mit IgG-Fraktionen von α -B19V-negativen Seren, welche ebenfalls freie C1q-Moleküle enthalten würden.

Meri et al. konnte zeigen, dass der Komplementfaktor C1q nicht nur an IgG sondern auch an das polymere IgM bindet und dies sogar mit einer höheren Affinität [225]. So wäre es vorstellbar, dass die während der Erstinfektion gebildeten IgM-Antikörper die Aufnahme des Virus in andere Gewebetypen, wie der Haut, den Gelenken oder den Endothelzellen des Herzens vermitteln. Aber auch durch die IgG-Antikörper könnte das Virus bei einer Zweitinfektion in diese Gewebetypen gelangen.

5.2. Infektionsverlauf von B19V nach Internalisierung über den alternativen Antikörper-vermittelten Mechanismus

Zusätzlich zum eigentlichen Aufnahmeschritt wurde auch der weitere Verlauf des B19V-Infektionszyklus in Gegenwart spezifischer α -B19V-Antikörper untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die aufgenommenen Viruspartikel effizient in den Zellkern transportiert wurden. Jedoch konnten nur sehr geringe Mengen von NS1-mRNA sowie

keine VP2- bzw. 11-kDa-Protein-Transkripte detektiert werden. Auch der Nachweis von replikativen B19V-Intermediaten blieb aus.

Eine mögliche Ursache für die fehlende virale Genexpression und Genom-Replikation in Endothelzellen, trotz der Detektion großer Mengen an B19V-DNA im Zellkern, könnte die Abwesenheit essentieller zellulärer Faktoren sein. Solche scheinen in B19V-permissiven Zellen die virale Genexpression auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene zu induzieren [18, 226]. Diese Annahme wird durch eine vorangegangene Studie unserer Arbeitsgruppe gestützt. In dieser wurde ein infektiöses B19V-Genom in Form einer doppelsträngigen, an den Flanken der B19V-ITR mit Restriktionsenzymen linearisierten Plasmid-DNA, in hoher Kopienzahl in die Endothelzellen eingebracht. Trotzdem konnte gegenüber einer B19V-Infektion, die wie in dieser Arbeit dargestellt in Abwesenheit von Antikörpern sehr stark durch den Internalisierungsschritt limitiert ist, keine verstärkte Synthese von B19V-Kapsidproteinen und die damit verbundene Bildung infektiöser Viruspartikel beobachtet werden [171]. Auch in anderen Studien konnten nach *in vitro*-Infektionen mit B19V in endothelialen Zellen zwar geringe Mengen an NS1- und VP1-mRNA nachgewiesen werden, jedoch wurde auch hier kein Hinweis auf Replikation gefunden [227].

Es wäre ebenfalls denkbar, dass die Synthese von viralen Proteinen sowie die B19V-Replikation in endothelialen Zellen nur unter bestimmten Umständen *in vivo*, wie z.B. unter Hypoxie oder nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren und Zytokinen, stattfinden. So konnte in einer Fallstudie, bei einer transplazentaren B19V-Übertragung und dem anschließenden intrauterinen Tod des Fetus, sowohl B19V-DNA als auch die B19V-Proteine NS1 und VP1/2 in den Endothelzellen der fetalen Kapillaren der plazentalen Zotten nachgewiesen werden [228]. Da diese Zellen kein P-Antigen auf der Oberfläche exprimieren [229], besteht die Möglichkeit, dass B19V in diesem Fall über den hier beschriebenen Antikörper-vermittelten Mechanismus aufgenommen wurde.

Zusätzliche äußere Faktoren, die zu einer Aktivierung der B19V-Genexpression und Genom-Replikation führen könnten, sind Ko-Infektionen mit anderen Viren. So konnte in einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die zusätzliche Infektion mit Adenoviren sowie die Transfektion mit frühen adenoviralen Funktionen zu einer Erhöhung der B19V-Genexpression und zur Ausbildung von replikativen B19V-Intermediaten in Endothelzellen führt [171]. Es gibt auch Hinweise darauf, dass andere Viren ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf die B19V-Replikation besitzen. In ersten Versuchen wurde gezeigt, dass die frühen Gene von CMV den p6-Promoter von B19V

positiv beeinflussen (unveröffentlichte Daten). Auch der gleichzeitige Nachweis von HHV-6 und B19V in endomyokardialen Biopsien deutet auf eine Aktivierung durch andere Viren hin [153].

Eine weitere Erklärung für das Ausbleiben der viralen Replikation nach der verstärkten B19V-Aufnahme über Antikörper könnte eine fehlende oder unvollständige Freisetzung der B19V-DNA aus den Kapsiden im Nukleus in Anwesenheit von Antikörpern sein. Eine detailliert Analyse dieser „Entpackung“ (*uncoating*) sollte daher eine Aufgabe für weiterführende Studien sein. Auch eine Verlängerung des zu beobachtenden Infektionszeitraums wäre ratsam, um eine möglicherweise stark verzögerte „Entpackung“ der B19V-DNA zu erfassen. Allerdings legt das Auftreten von monomeren, doppelsträngigen B19V-Replikationsintermediaten in der Replikationsanalyse (Abb.4.20) nahe, dass es zu einer „Entpackung“ der viralen DNA kommt. Denn in Abwesenheit von Replikation bilden sich solche Moleküle wahrscheinlich überwiegend durch die Hybridisierung von B19V-DNA-Genomen mit gegenläufiger Polarität, die in unterschiedliche Viruspartikel verpackt waren.

5.3. Physiologische Relevanz der über Antikörper-vermittelten B19V-Aufnahme in endothelialen Zellen

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in humanen Seren vorkommende spezifische α -B19V-Antikörper zu einer verstärkten B19V-Aufnahme in endothelialen Zellen führen. Der hier zugrundeliegende Mechanismus beruht auf einer Beteiligung des Komplementsystems. Bei diesem interagiert der Komplementfaktor C1q, welcher an den Fc-Teil des α -B19V-Antikörpers gebunden ist, direkt mit dem zellulären Rezeptor CD93 (C1qR). Somit reiht sich Parvovirus B19 in eine Vielzahl von verschiedenen Viren ein, die in der Lage sind, über spezifische Antikörper verstärkt in die Zielzelle aufgenommen zu werden [191, 192, 230].

Da die B19V-Aufnahme in Endothelzellen über spezifische Rezeptoren, wie dem P-Antigen, äußerst gering ist [208], bietet die Antikörper-vermittelte Aufnahme des Virus eine plausible Erklärung für den Nachweis der B19V-DNA-Kopien in den endomyokardialen Biopsieproben [137]. Da es jedoch so scheint, als würde B19V nach der Aufnahme über Antikörper in endothelialen Zellen latent persistieren, spielt es vermutlich bei der Entstehung von inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathien nur eine untergeordnete Rolle. Wenn sich B19V jedoch durch bestimmte Umstände *in vivo*, wie

z.B. durch Zytokinstimulation oder aber durch eine Ko-Infektion mit anderen Viren aktivieren lässt [171], so ist die Entstehung von endothelialen Dysfunktionen, die zu Folgeerkrankungen führen können, nicht auszuschließen. Auch die Tatsache, dass das C1q, welches an der Virusaufnahme beteiligt ist, bei vielen inflammatorischen, Prozessen in der Zelle eine wichtige Rolle spielt, lässt eine Beteiligung von B19V an entzündlichen Herzerkrankungen vermuten.

6. Zusammenfassung

Das Humane Parvovirus B19 ist ein autonom replizierendes, einzelsträngiges (ss) DNA-Virus und als Erreger der Ringelröteln (*Erythema infectiosum*), des *Hydrops fetalis*, aplastischer Anämien sowie Polyarthritiden bekannt. Aufgrund seines stark ausgeprägten Zell- und Gewebetropismus kann B19V ausschließlich in erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark und fetalen Leberzellen einen produktiven Infektionszyklus durchlaufen. Durch verbesserte Analysemethoden konnte B19V-DNA in den letzten Jahren zusätzlich in vielen andern Gewebe- und Zelltypen nachgewiesen werden. Aufgrund des Nachweises der B19V-DNA in Endothelzellen der intramyokardialen Arteriolen und der postkapillaren Venolen des Herzens wurde eine mögliche Assoziation zwischen einer B19V-Infektion und kardialen Erkrankungen wie der inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie (DCMi) postuliert. Jedoch konnte bislang keine Replikation des B19V-Genoms in den Endothelzellen nachgewiesen werden, sodass von einer latenten Infektion ausgegangen werden muss. Der Aufnahmemechanismus von B19V in Endothelzellen war bislang noch vollkommen ungeklärt.

Die Zielstellungen dieser Arbeit bestanden darin, den genauen Aufnahmemechanismus von B19V in Endothelzellen aufzuklären und den weiteren Infektionsverlauf nach der Virusaufnahme zu untersuchen.

Eine vorangegangene Studie zur klassischen Rezeptor-vermittelten B19V-Aufnahme in verschiedenen Endothelzellen hatte nur eine sehr geringe Aufnahme von Viruspartikel gezeigt, trotz der Expression des B19V-spezifischen Rezeptors und möglicher Ko-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse konnten die in endothelialen Zellen detektierten, teilweise erheblichen Mengen von B19V-DNA nur schwer erklären und ließen auf einen alternativen B19V-Aufnahmemechanismus schließen. Einen möglichen alternativen Mechanismus stellt die Antikörper-vermittelte Virusaufnahme dar, die bereits für B19V in der monozytären Zelllinie U937 beschrieben wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass spezifische α -B19V-Antikörper die Virusaufnahme bereits in geringen Konzentrationen stark erhöhen. In Bindungs- und Aufnahme-Studien wurde beobachtet, dass bei den getesteten Endothelzellen der Effekt der ADE praktisch ausschließlich auf der Ebene der Internalisierung vermittelt wird, während bei den monozytären U937-Zellen die Viruspartikel in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern bereits stärker an die Oberfläche gebunden wurden. Für die Aufklärung des Mechanismus der ADE in Endothelzellen erfolgte zunächst eine Analyse der Fc γ -

Rezeptor-Expression auf der Zelloberfläche, da für die U937-Zellen eine mögliche Beteiligung der Interaktion von B19V-Antikörpern mit Fc-Rezeptoren nachgewiesen worden war. Im Vergleich zu U937-Zellen werden jedoch auf der Oberfläche von endothelialen Zellen nur sehr geringe Mengen von Fc γ -Rezeptoren exprimiert. Auch die anschließenden Kompetitionsversuche, sowohl mit spezifischen Antikörpern gegen Fc γ -Rezeptoren als auch mit unspezifischen Antikörpern, wiesen darauf hin, dass es sich in Endothelzellen um einen Fc-Rezeptor-unabhängigen Mechanismus handelt. Da aus den Kompetitionsversuchen mit unspezifischen Antikörpern darüber hinaus auf eine mögliche Rolle von Antikörper-assoziierten Faktoren geschlossen werden konnte, wurden Komplementsystem-abhängige Mechanismen, wie sie bereits für andere Viren wie Ebola oder HIV nachgewiesen werden konnten, näher untersucht. Versuche mit hitzevorbehandelten IgG-Fraktionen verstärkten die Hinweise auf die Beteiligung von löslichen Komplement-Komponenten, welche durch ihre starke Bindung an den Fc-Teil der Antikörper bei der Aufreinigung der Seren nicht entfernt wurden, wie beispielsweise das C1q, die initialen Komponente des klassischen Komplementwegs. In einem Schlüsselexperiment in der primären Endothelzelle HCAEC wurde nach der Blockierung der C1q-Rezeptoren auf der Zelloberfläche während der Infektion mit B19V in Anwesenheit von α -B19V-Antikörpern eine deutliche Repression der B19V-Aufnahme beobachtet. Eine Behandlung der Zellen mit EGTA, welches das für die C1q-abhängige Aktivierung der klassischen Komplementkaskade benötigte Ca²⁺ komplexiert, hatte hingegen keine Auswirkungen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass dem ADE-Effekt von B19V ein sehr ähnlicher Mechanismus zu Grunde liegt, wie er für das Ebolavirus, ebenfalls in Endothelzellen, beschrieben wurde. Dieser beruht auf der direkten Interaktion von C1q, welches über den Fc-Teil des Antikörpers an die B19V/Antikörper-Komplexe gebunden ist, an seinen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche.

Untersuchungen zum weiteren Infektionsverlauf zeigten, dass die aufgenommenen Viruspartikel zwar sehr effizient in den Zellkern transportiert werden, es jedoch nur zu einer stark reduzierten Genexpression und keiner Genom-Replikation kommt. Somit scheint zunächst keine direkte Verbindung zwischen einer B19V-Infektion und einer Herzerkrankung mit endothelialer Dysfunktion zu bestehen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das latent vorliegende B19V *in vivo* durch zusätzliche exogene Stimuli, wie beispielsweise Zytokine oder eine Ko-Infektion mit anderen Viren, aktiviert wird. Auch die Tatsache, dass das am Aufnahmemechanismus beteiligte C1q eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von inflammatorischen, zellulären Prozessen spielt, kann von

entscheidender Bedeutung für die Assoziation zwischen B19V und der dilatativen Kardiomyopathie sein.

7. Summary

Human Parvovirus B19 (B19V) is an autonomously replicating single-strand (ss) DNA-virus and a causative agent for *erythema infectiosum*, hydrops fetalis, aplastic crisis and polyarthrititis. B19V possesses a specific cell and tissue tropism with productive infection limited to erythroid progenitor cells in the bone marrow and fetal liver cells. However amounts of B19V-DNA have also been detected in other cell types and tissues. A high prevalence of B19V-DNA in endothelial cells of the myocardium has been associated with acute and chronic inflammatory cardiomyopathies. So far, no evidence for replication of B19V-DNA in non-erythroid cells exists, strongly suggesting a rather latent state of B19V in these cells. The entry mechanisms of B19V in these non-permissive cells have also not been characterized yet.

The aims of the present study were the identification of the B19V uptake mechanism into endothelial cells and the investigation of the subsequent steps of the B19V infection cycle in these cells.

In a previous study addressing the classical receptor-mediated internalization of B19V in endothelial cells, we found a high surface expression of the well-characterized primary B19V receptor P antigen and the putative co-receptor $\alpha_5\beta_1$ integrin. Despite a similar receptor expression pattern and primary attachment level as in the UT7/Epo-S1 cell line, regarded as functional for B19V entry, however, internalization of the virus was strongly reduced. These results therefore cannot explain the considerable amounts of B19V-DNA detected in endomyocardial biopsies. In the monocytic U937 cell line, antibody dependent enhancement (ADE) could already be identified as an alternative uptake mechanism for B19V.

In our study we could show ADE in endothelial cells with an up to 4000-fold increase of B19V uptake in the presence of B19V-specific antibodies. Furthermore, ADE in endothelial cells was mediated almost exclusively at the level of virus internalization, in contrast to monocytes, where virus binding was also strongly stimulated by the presence of antibodies. Fc γ -receptor expression studies and blocking experiments against Fc-receptors in endothelial cells demonstrated that the enhancement is not mediated by interaction of the virus-antibody complexes with Fc receptors (FcR). Another possible mechanism of ADE, with the heat-sensitive complement factor C1q and its respective receptor CD93 as key components has been postulated for Ebolavirus infection of endothelial cells. Experiments involving heat-treated IgG fractions and blockage of the C1q-receptor (CD93)

demonstrated that B19V ADE in endothelial cells is most likely based on an analogous mechanism. The complement factor C1q bound to the B19V/antibody complexes directly interacting with CD93 without the requirement of activation of further complement factors. In following experiments an efficient translocation of the internalized B19V to the nucleus was demonstrated. However, even in the presence of antibodies, B19V infection of endothelial cells remained abortive with only low levels of the NS1 mRNA and no detectable VP2 and 11 kDa protein transcripts or DNA replication.

These findings offer a good explanation for the high prevalence of B19V in endothelial cells from cardiac tissues. Under consideration of previous data that B19V genome expression could be increased markedly by adenovirus co-infection, it is possible that under specialized conditions *in vivo* such as hypoxia, stimulation with growth factors and cytokines, or co-infections with other viruses, endothelial cells may support the synthesis of B19V proteins and viral replication.

Since C1q contributes to a number of inflammatory biological functions, an association of B19V-bound antibodies may also be involved in the inflammatory processes associated with some of the pathogenic effects of B19V such as rheumatoid arthritis or chronic inflammatory cardiomyopathies.

8. Literaturverzeichnis

1. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D: **Parvovirus-like particles in human sera.** *Lancet* 1975, **1**:72-73.
2. Summers J, Jones SE, Anderson MJ: **Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus.** *JGenVirol* 1983, **64 (Pt 11)**:2527-2532.
3. Shneerson JM, Mortimer PP, Vandervelde EM: **Febrile illness due to a parvovirus.** *BrMedJ* 1980, **280**:1580.
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, **1**:1378.
5. Fields BNK, David M.; Howley, Peter M.: *Fields virology* 1996.
6. Huser D, Weger S, Heilbronn R: **Kinetics and frequency of adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR.** *JVirol* 2002, **76**:7554-7559.
7. Fryer JF, Delwart E, Hecht FM, Bernardin F, Jones MS, Shah N, Baylis SA: **Frequent detection of the parvoviruses, PARV4 and PARV5, in plasma from blood donors and symptomatic individuals.** *Transfusion* 2007, **47**:1054-1061.
8. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B: **Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples.** *ProcNatlAcadSciUSA* 2005, **102**:12891-12896.
9. Büchen-Osmond CE: **B19 virus.** ICTVdB-The Universal Virus Database, version 3. 2003.
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, **61**:2627-2630.
11. Schwarz TF, Serke S, Von Brunn A, Hottentrager B, Huhn D, Deinhardt F, Roggendorf M: **Heat stability of parvovirus B19: kinetics of inactivation.** *Zentralbl Bakteriol* 1992, **277**:219-223.
12. Caillet-Fauquet P, Di Giambattista M, Draps ML, 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, **118**: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, **30**:125-133.
14. Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG: **The structure of human parvovirus B19.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:11628-11633.
15. Young NS: **B19 parvovirus.** *Baillieres Clin Haematol* 1995, **8**:25-56.

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, **175**:247-254.
17. 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, **82**:9951-9963.
18. Liu JM, Green SW, Shimada T, Young NS: **A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus.** *J Virol* 1992, **66**:4686-4692.
19. Ozawa K, Ayub J, Hao YS, Kurtzman G, Shimada T, Young N: **Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus.** *J Virol* 1987, **61**:2395-2406.
20. Yoto Y, Qiu J, Pintel DJ: **Identification and characterization of two internal cleavage and polyadenylation sites of parvovirus B19 RNA.** *J Virol* 2006, **80**:1604-1609.
21. Cotmore SF, McKie VC, Anderson LJ, Astell CR, Tattersall P: **Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments.** *J Virol* 1986, **60**:548-557.
22. Nüesch JP: *Regulation of non-structural protein functions by differential synthesis, modification and trafficking.* London: Edward Arnold Publishers Ltd. 2006:275-289; 2006.
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, **82**:1473-1480.
24. Tsay GJ, Zouali M: **Unscrambling the role of human parvovirus B19 signaling in systemic autoimmunity.** *Biochem Pharmacol* 2006, **72**: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, **76**:5395-5403.
26. 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, **72**:8477-8484.
27. Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, Niller HH, 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, **293**:86-93.
28. Christensen J, Cotmore SF, Tattersall P: **Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner.** *J Virol* 1995, **69**:5422-5430.

29. Christensen J, Cotmore SF, Tattersall P: **A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication.** *J Virol* 1997, **71**:1405-1416.
30. 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, **73**:8762-8770.
31. Duechting A, Tschöpe C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R, Böck CT: **Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells.** *J Virol* 2008, **82**:7942-7952.
32. 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, **80**:5941-5950.
33. Fan MM, Tamburic L, Shippam-Brett C, Zagrodny DB, Astell CR: **The small 11-kDa protein from B19 parvovirus binds growth factor receptor-binding protein 2 in vitro in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner.** *Virology* 2001, **291**:285-291.
34. Chen AY, Zhang EY, Guan W, Cheng F, Kleiboeker S, Yankee TM, Qiu J: **The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells.** *Blood* 2010, **115**:1070-1080.
35. 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, **58**:921-936.
36. 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, **80**:12017-12024.
37. 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, **89**:2023-2029.
38. 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, **67**:3004-3009.
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, **330**:1192-1196.
40. Cohen BJ, Brown KE: **Laboratory infection with human parvovirus B19.** *J Infect* 1992, **24**:113-114.

41. 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, **306**:25-32.
42. Rosenfeld SJ, Young NS, Alling D, Ayub J, Saxinger C: **Subunit interaction in B19 parvovirus empty capsids.** *Arch Virol* 1994, **136**:9-18.
43. Lupescu A, Bock CT, Lang PA, Aberle S, Kaiser H, Kandolf R, Lang F: **Phospholipase A2 activity-dependent stimulation of Ca²⁺ entry by human parvovirus B19 capsid protein VP1.** *J Virol* 2006, **80**:11370-11380.
44. Zadori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Garipey S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR, Tijssen P: **A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity.** *Dev Cell* 2001, **1**:291-302.
45. **The genus Erythrovirus.** In: Kerr J, Cotmore SF, Bloom ME, Linden RM, Parrish CR, eds. *Parvovirus*. London, United Kingdom: Hodder Arnold; 25-45
46. Brown KE, Anderson SM, Young NS: **Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus.** *Science* 1993, **262**:114-117.
47. 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, **60**:559-565.
48. 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, **63**:35-46.
49. 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, **106**:3449-3456.
50. 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, **75**:4110-4116.
51. 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, **102**:3927-3933.
52. Suehiro K, Gailit J, Plow EF: **Fibrinogen is a ligand for integrin alpha5beta1 on endothelial cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**:5360-5366.
53. Dejana E: **Endothelium, vessel injury and thrombosis.** *Haematologica* 1987, **72**:89-94.
54. 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, **75**:11-18.
55. 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, **306** (Pt 3):657-665.
56. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Chen L, Srivastava A: **Role of integrin cross-regulation in parvovirus B19 targeting.** *Hum Gene Ther* 2006, **17**:909-920.
57. Bos JL: **Linking Rap to cell adhesion.** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**:123-128.
58. Bos JL, de Bruyn K, Enserink J, Kuiperij B, Rangarajan S, Rehmann H, Riedl J, de Rooij J, van Mansfeld F, Zwartkruis F: **The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion.** *Biochem Soc Trans* 2003, **31**:83-86.
59. 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, **161**:417-427.
60. Weigel-Van Aken KA: **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, **20**:1665-1678.
61. 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, **109** (Pt 7):1937-1946.
62. 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, **9**:2147-2151.
63. Dalziel RG, Mendelson SC, Quinn JP: **The nuclear autoimmune antigen Ku is also present on the cell surface.** *Autoimmunity* 1992, **13**:265-267.
64. 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, **337**:503-511.
65. 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, **86**:1301-1305.
66. Tai YT, Podar K, Kraeft SK, 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, **30**:212-220.
67. Koike M: **Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins.** *J Radiat Res* 2002, **43**:223-236.
68. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J: **Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair.** *Nature* 2001, **412**:607-614.
69. 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, **89**:11920-11924.

70. Munoz 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, **18**:5797-5808.
71. Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, Taneja P, Huang NW, Simoncsits A, Susic S, Rahman K, Marusic L, Chen J, et al.: **Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen.** *EMBO J* 1994, **13**:4991-5001.
72. Cao QP, Pitt S, Leszyk J, Baril EF: **DNA-dependent ATPase from HeLa cells is related to human Ku autoantigen.** *Biochemistry* 1994, **33**:8548-8557.
73. 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, **280**:C897-911.
74. 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, **101**:1379-1388.
75. Cotmore SF, Tattersall P: **Parvoviral host range and cell entry mechanisms.** *Adv Virus Res* 2007, **70**:183-232.
76. Harbison CE, Chiorini JA, Parrish CR: **The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus.** *Trends Microbiol* 2008, **16**:208-214.
77. Vihinen-Ranta M, Suikkanen S, Parrish CR: **Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses.** *J Virol* 2004, **78**:6709-6714.
78. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ: **Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors.** *J Virol* 2000, **74**:2777-2785.
79. Basak S, Turner H: **Infectious entry pathway for canine parvovirus.** *Virology* 1992, **186**:368-376.
80. 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, **74**:1919-1930.
81. von Landenberg P, Lehmann HW, Modrow S: **Human parvovirus B19 infection and antiphospholipid antibodies.** *Autoimmun Rev* 2007, **6**:278-285.
82. Farr GA, Zhang LG, 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, **102**:17148-17153.
83. Suikkanen S, Antila M, Jaatinen A, Vihinen-Ranta M, Vuento M: **Release of canine parvovirus from endocytic vesicles.** *Virology* 2003, **316**:267-280.
84. Filippone C, Zhi N, Wong S, Lu J, Kajigaya S, Gallinella G, Kakkola L, Soderlund-Venermo M, Young NS, Brown KE: **VP1u phospholipase activity is**

- critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. *Virology* 2008, **374**:444-452.**
85. 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, **81**:5777-5787.
86. 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, **82**:1458-1464.
87. Urabe M, Ding C, Kotin RM: **Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors.** *Hum Gene Ther* 2002, **13**:1935-1943.
88. Doerig C, Hirt B, Antonietti JP, Beard P: **Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription.** *J Virol* 1990, **64**:387-396.
89. Morita E, Sugamura K: **Human parvovirus B19-induced cell cycle arrest and apoptosis.** *Springer Semin Immunopathol* 2002, **24**:187-199.
90. Brown KE, Mori J, Cohen BJ, Field AM: **In vitro propagation of parvovirus B19 in primary foetal liver culture.** *J Gen Virol* 1991, **72** (Pt 3):741-745.
91. Srivastava A, Lu L: **Replication of B19 parvovirus in highly enriched hematopoietic progenitor cells from normal human bone marrow.** *J Virol* 1988, **62**:3059-3063.
92. Chen AY, Guan W, Lou S, Liu Z, Kleiboeker S, Qiu J: **Role of erythropoietin receptor signaling in parvovirus B19 replication in human erythroid progenitor cells.** *J Virol* 2010, **84**:12385-12396.
93. Heegaard ED, Brown KE: **Human parvovirus B19.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:485-505.
94. Takahashi T, Ozawa K, Takahashi K, Asano S, Takaku F: **Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation.** *Blood* 1990, **75**:603-610.
95. Pallier C, Greco A, Le Junter J, Saib A, Vassias I, Morinet F: **The 3' untranslated region of the B19 parvovirus capsid protein mRNAs inhibits its own mRNA translation in nonpermissive cells.** *J Virol* 1997, **71**:9482-9489.
96. Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR: **Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:2825-2837.
97. Bonvicini F, Manaresi E, Di Furio F, De Falco L, Gallinella G: **Parvovirus b19 DNA CpG dinucleotide methylation and epigenetic regulation of viral expression.** *PLoS One* 2012, **7**:e33316.
98. 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, **172**:114-118.

99. Tsujimura M, Matsushita K, Shiraki H, Sato H, Okochi K, Maeda Y: **Human parvovirus B19 infection in blood donors.** *Vox Sang* 1995, **69**:206-212.
100. 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, **76**:9124-9134.
101. Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hubinger AM, et al: **Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:7450-7453.
102. Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain JP: **Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples.** *J Virol* 2004, **78**:12169-12178.
103. 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, **44**:604-606.
104. Rinckel LA, Buno BR, Gierman TM, Lee DC: **Discovery and analysis of a novel parvovirus B19 Genotype 3 isolate in the United States.** *Transfusion* 2009, **49**:1488-1492.
105. Corcoran C, Hardie D, Yeats J, Smuts H: **Genetic variants of human parvovirus B19 in South Africa: cocirculation of three genotypes and identification of a novel subtype of genotype 1.** *J Clin Microbiol* 2010, **48**:137-142.
106. Blumel J, Schmidt I, Effenberger W, Seitz H, Willkommen H, Brackmann HH, Lower J, Eis-Hubinger AM: **Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates.** *Transfusion* 2002, **42**:1473-1481.
107. Hayakawa F, Imada K, Towatari M, Saito H: **Life-threatening human parvovirus B19 infection transmitted by intravenous immune globulin.** *Br J Haematol* 2002, **118**:1187-1189.
108. Prowse C, Ludlam CA, Yap PL: **Human parvovirus B19 and blood products.** *Vox Sang* 1997, **72**:1-10.
109. Ozawa K, Kurtzman G, Young N: **Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures.** *Science* 1986, **233**:883-886.
110. Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M, Siegl G: **Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow.** *J Med Virol* 1997, **53**:229-232.
111. Lundqvist A, Tolfvenstam T, Bostic J, Soderlund M, Broliden K: **Clinical and laboratory findings in immunocompetent patients with persistent parvovirus B19 DNA in bone marrow.** *Scand J Infect Dis* 1999, **31**:11-16.
112. Nikkari S, Roivainen A, Hannonen P, Mottonen T, Luukkainen R, Yli-Jama T, Toivanen P: **Persistence of parvovirus B19 in synovial fluid and bone marrow.** *Ann Rheum Dis* 1995, **54**:597-600.

113. Cassinotti P, Siegl G: **Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, **19**:886-887.
114. Lefrere JJ, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, Lefrere F, Girot R, Allain JP, Laperche S: **Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety.** *Blood* 2005, **106**:2890-2895.
115. Youn NS, Brown, K.E.: **Parvovirus B19.** Massachusetts Medical Society; 2004.
116. Modrow SFDTU: *Molekulare Virologie.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin; 2003.
117. Woolf AD, Campion 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, **149**:1153-1156.
118. 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, **152**:257-265.
119. Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA, Eastmond CJ: **Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description.** *Lancet* 1985, **1**:422-425.
120. White DG, Woolf AD, Mortimer PP, Cohen BJ, Blake DR, Bacon PA: **Human parvovirus arthropathy.** *Lancet* 1985, **1**:419-421.
121. Nocton JJ, Miller LC, Tucker LB, Schaller JG: **Human parvovirus B19-associated arthritis in children.** *J Pediatr* 1993, **122**:186-190.
122. Joseph PR: **Fifth disease: the frequency of joint involvement in adults.** *N Y State J Med* 1986, **86**:560-563.
123. Beland SS, Daniel GK, Menard JC, Miller NM: **Aplastic crisis associated with parvovirus B19 in an adult with hereditary spherocytosis.** *J Ark Med Soc* 1997, **94**:163-164.
124. Serjeant GR, Topley JM, Mason K, Serjeant BE, Pattison JR, Jones SE, Mohamed R: **Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent.** *Lancet* 1981, **2**:595-597.
125. Brown KE, Young NS: **Parvoviruses and bone marrow failure.** *Stem Cells* 1996, **14**:151-163.
126. Liefeldt L, Plentz A, Klempa B, Kershaw O, Endres AS, Raab U, Neumayer HH, Meisel H, Modrow S: **Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3.** *J Med Virol* 2005, **75**:161-169.
127. Plentz A, Hahn J, Holler E, Jilg W, Modrow S: **Long-term parvovirus B19 viraemia associated with pure red cell aplasia after allogeneic bone marrow transplantation.** *J Clin Virol* 2004, **31**:16-19.

128. Brown T, Anand A, Ritchie LD, Clewley JP, Reid TM: **Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis.** *Lancet* 1984, **2**:1033-1034.
129. Enders M, Weidner A, Zoellner I, Searle K, Enders G: **Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases.** *Prenat Diagn* 2004, **24**:513-518.
130. Heegaard ED, Hornsleth A: **Parvovirus: the expanding spectrum of disease.** *Acta Paediatr* 1995, **84**:109-117.
131. Kinney JS, Anderson LJ, Farrar J, Strikas RA, Kumar ML, Kliegman RM, Sever JL, Hurwitz ES, Sikes RK: **Risk of adverse outcomes of pregnancy after human parvovirus B19 infection.** *J Infect Dis* 1988, **157**:663-667.
132. Miller E, Fairley CK, Cohen BJ, Seng C: **Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy.** *Br J Obstet Gynaecol* 1998, **105**:174-178.
133. Corcoran A, Doyle S: **Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19.** *J Med Microbiol* 2004, **53**:459-475.
134. Morey AL, Keeling JW, Porter HJ, Fleming KA: **Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus.** *Br J Obstet Gynaecol* 1992, **99**:566-574.
135. Sasidharan CK, Sugathan P, Mampilly N, Agarwal R, Khare S, Lal S, Jayaram Paniker CK: **Red baby syndrome a new disease due to parvovirus B-19 observed in Kerala.** *Indian J Pediatr* 2009, **76**:309-312.
136. Aslanidis S, Pырpasopoulou A, Kontotasios K, Doumas S, Zamboulis C: **Parvovirus B19 infection and systemic lupus erythematosus: Activation of an aberrant pathway?** *Eur J Intern Med* 2008, **19**:314-318.
137. Pankuweit S, Lamparter S, Schoppet M, Maisch B: **Parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimen.** *Circulation* 2004, **109**:e179.
138. Palmer P, Pallier C, Leruez-Ville M, Deplanche M, Morinet F: **Antibody response to human parvovirus B19 in patients with primary infection by immunoblot assay with recombinant proteins.** *Clin Diagn Lab Immunol* 1996, **3**:236-238.
139. Doyle S, Kerr S, O'Keeffe G, O'Carroll D, Daly P, Kilty C: **Detection of parvovirus B19 IgM by antibody capture enzyme immunoassay: receiver operating characteristic analysis.** *J Virol Methods* 2000, **90**:143-152.
140. Skjoldbrand-Sparre L, Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Wahren B, Broliden K, Nyman M: **Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death.** *BJOG* 2000, **107**:476-480.
141. Cassinotti P, Weitz M, Siegl G: **Human parvovirus B19 infections: routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay.** *J Med Virol* 1993, **40**:228-234.
142. Prowse CV: **Parvovirus B19 and blood products.** *Lancet* 1994, **343**:1101.

143. Harris JW: **Parvovirus B19 for the hematologist.** *Am J Hematol* 1992, **39**:119-130.
144. Frickhofen N, Abkowitz JL, Safford M, Berry JM, Antunez-de-Mayolo J, Astrow A, Cohen R, Halperin I, King L, Mintzer D, et al.: **Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS.** *Ann Intern Med* 1990, **113**:926-933.
145. Frickhofen N, Chen ZJ, Young NS, Cohen BJ, Heimpel H, Abkowitz JL: **Parvovirus B19 as a cause of acquired chronic pure red cell aplasia.** *Br J Haematol* 1994, **87**:818-824.
146. Koduri PR, Kumapley R, Valladares J, Teter C: **Chronic pure red cell aplasia caused by parvovirus B19 in AIDS: use of intravenous immunoglobulin--a report of eight patients.** *Am J Hematol* 1999, **61**:16-20.
147. Kurtzman G, Frickhofen N, Kimball J, Jenkins DW, Nienhuis AW, Young NS: **Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy.** *N Engl J Med* 1989, **321**:519-523.
148. 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, **29**:1089-1103.
149. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kuhl U, Maisch B, McKenna WJ, et al: **Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases.** *Eur Heart J* 2008, **29**:270-276.
150. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsfas I, et al: **Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies.** *Circulation* 1996, **93**:841-842.
151. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S: **Acute viral myocarditis.** *Eur Heart J* 2008, **29**:2073-2082.
152. Kandolf R, Bultmann B, Klingel K, Bock CT: **[Molecular mechanisms and consequences of cardiac viral infections].** *Pathologe* 2008, **29 Suppl 2**:112-117.
153. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP: **High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction.** *Circulation* 2005, **111**:887-893.
154. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, 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, **42**:466-472.

155. Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP: **Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction.** *Circulation* 2005, **112**:1965-1970.
156. Bultmann BD, Sotlar K, Klingel K: **Parvovirus B19.** *N Engl J Med* 2004, **350**:2006-2007; author reply 2006-2007.
157. Bultmann 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, **34**:92-95.
158. Kandolf R: **Virusätiologie der inflammatorischen Kardiomyopathie.** *Dtsch Med Wochenschr* 2004, **129 (41)**:S. 2187-2192.
159. Klingel K, Sauter M, Bock CT, Szalay G, Schnorr JJ, Kandolf R: **Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy.** *Med Microbiol Immunol* 2004, **193**:101-107.
160. Bock CT, Klingel K, Aberle S, Duechting A, Lupescu A, Lang F, Kandolf R: **Human parvovirus B19: a new emerging pathogen of inflammatory cardiomyopathy.** *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005, **52**:340-343.
161. Aaronson DS, Horvath CM: **A road map for those who don't know JAK-STAT.** *Science* 2002, **296**:1653-1655.
162. Keller TT, Mairuhu AT, de Kruif MD, Klein SK, Gerdes VE, ten Cate H, Brandjes DP, Levi M, van Gorp EC: **Infections and endothelial cells.** *Cardiovasc Res* 2003, **60**:40-48.
163. Kuhl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CP, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R: **Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction.** *Circulation* 2003, **108**:945-950.
164. Tschope C, Bock CT, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck PL, Pauschinger M, Poller WC, Kuhl U, Kandolf R, Schultheiss HP: **High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction.** *Circulation* 2005, **111**:879-886.
165. 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, **49**:1660-1666.
166. 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, **47**:106-110.
167. Kuhl U, Lassner D, Pauschinger M, Gross UM, Seeberg B, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP: **Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy.** *J Med Virol* 2008, **80**:1243-1251.
168. 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, **195**:1345-1352.

169. Eis-Hubinger AM, Reber U, Abdul-Nour T, Glatzel U, Lauschke H, Putz U: **Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults.** *J Med Virol* 2001, **65**:395-401.
170. Soderlund-Venermo M, Hokynar K, Nieminen J, Rautakorpi H, Hedman K: **Persistence of human parvovirus B19 in human tissues.** *Pathol Biol (Paris)* 2002, **50**:307-316.
171. 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, **411**:50-64.
172. Hawkes RA: **Enhancement of the Infectivity of Arboviruses by Specific Antisera Produced in Domestic Fowls.** *Aust J Exp Biol Med Sci* 1964, **42**:465-482.
173. Hawkes RA, Lafferty, K.J.: **The enhancement of virus infectivity by antibody.** *Virology* 1967, **33**:250-261.
174. Halstead SB, O'Rourke EJ: **Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes.** *Nature* 1977, **265**:739-741.
175. Halstead SB, Shotwell H, Casals J: **Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II. Clinical laboratory responses to heterologous infection.** *J Infect Dis* 1973, **128**:15-22.
176. Halstead SB, O'Rourke EJ, Allison AC: **Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection.** *J Exp Med* 1977, **146**:218-229.
177. Peiris JS, Gordon S, Unkeless JC, Porterfield JS: **Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages.** *Nature* 1981, **289**:189-191.
178. Peiris JS, Porterfield JS: **Antibody-mediated enhancement of Flavivirus replication in macrophage-like cell lines.** *Nature* 1979, **282**:509-511.
179. Schlesinger JJ, Brandriss MW: **Antibody-mediated infection of macrophages and macrophage-like cell lines with 17D-yellow fever virus.** *J Med Virol* 1981, **8**:103-117.
180. Schlesinger JJ, Brandriss MW: **17D yellow fever virus infection of P388D1 cells mediated by monoclonal antibodies: properties of the macrophage Fc receptor.** *J Gen Virol* 1983, **64 (Pt 6)**:1255-1262.
181. Fagbami AH, Halstead SB: **Antibody-mediated enhancement of Wesselsbron virus in P388D1 cells.** *Afr J Med Med Sci* 1986, **15**:103-107.
182. Cecilia D, Ghosh SN: **Antibody dependent plaque enhancement by monoclonal antibodies against Japanese encephalitis virus.** *Indian J Med Res* 1988, **87**:521-525.

183. Kimura-Kuroda J, Yasui K: **Protection of mice against Japanese encephalitis virus by passive administration with monoclonal antibodies.** *J Immunol* 1988, **141**:3606-3610.
184. Cardoso MJ, Porterfield JS, Gordon S: **Complement receptor mediates enhanced flavivirus replication in macrophages.** *J Exp Med* 1983, **158**:258-263.
185. Takada A, Kawaoka Y: **Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications.** *Rev Med Virol* 2003, **13**:387-398.
186. Robinson WE, Jr., Montefiori DC, Mitchell WM: **Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Lancet* 1988, **1**:790-794.
187. Takeda A, Tuazon CU, Ennis FA: **Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry.** *Science* 1988, **242**:580-583.
188. Sullivan N, Sun Y, Binley J, Lee J, Barbas CF, 3rd, Parren PW, Burton DR, Sodroski J: **Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein activation by soluble CD4 and monoclonal antibodies.** *J Virol* 1998, **72**:6332-6338.
189. Takada A, Watanabe S, Okazaki K, Kida H, Kawaoka Y: **Infectivity-enhancing antibodies to Ebola virus glycoprotein.** *J Virol* 2001, **75**:2324-2330.
190. Takada A, Feldmann H, Ksiazek TG, Kawaoka Y: **Antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection.** *J Virol* 2003, **77**:7539-7544.
191. Eggleton P, Reid KB, Tenner AJ: **C1q--how many functions? How many receptors?** *Trends Cell Biol* 1998, **8**:428-431.
192. Nicholson-Weller A, Klickstein LB: **C1q-binding proteins and C1q receptors.** *Curr Opin Immunol* 1999, **11**:42-46.
193. Ross GD: **Complement receptor type 1.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1992, **178**:31-44.
194. Gimenez HB, Keir HM, Cash P: **In vitro enhancement of respiratory syncytial virus infection of U937 cells by human sera.** *J Gen Virol* 1989, **70** (Pt 1):89-96.
195. Krilov LR, Anderson LJ, Marcoux L, Bonagura VR, Wedgwood JF: **Antibody-mediated enhancement of respiratory syncytial virus infection in two monocyte/macrophage cell lines.** *J Infect Dis* 1989, **160**:777-782.
196. Ochiai H, Kurokawa M, Hayashi K, Niwayama S: **Antibody-mediated growth of influenza A NWS virus in macrophagelike cell line P388D1.** *J Virol* 1988, **62**:20-26.
197. 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, **36**:217-221.

198. Yao JS, Kariwa H, Takashima I, Yoshimatsu K, Arikawa J, Hashimoto N: **Antibody-dependent enhancement of hantavirus infection in macrophage cell lines.** *Arch Virol* 1992, **122**:107-118.
199. Dworak LJ, Wolfinbarger JB, Bloom ME: **Aleutian mink disease parvovirus infection of K562 cells is antibody-dependent and is mediated via an Fc(gamma)RII receptor.** *Arch Virol* 1997, **142**:363-373.
200. Kanno H, Wolfinbarger 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, **67**:7017-7024.
201. Ghiasi H, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL: **Antibody-dependent enhancement of HSV-1 infection by anti-gK sera.** *Virus Res* 2000, **68**:137-144.
202. Inada T, Chong KT, Mims CA: **Enhancing antibodies, macrophages and virulence in mouse cytomegalovirus infection.** *J Gen Virol* 1985, **66** (Pt 4):871-878.
203. Sixbey JW, Yao QY: **Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism.** *Science* 1992, **255**:1578-1580.
204. Lidbury BA, Mahalingam S: **Specific ablation of antiviral gene expression in macrophages by antibody-dependent enhancement of Ross River virus infection.** *J Virol* 2000, **74**:8376-8381.
205. Mahalingam S, Lidbury BA: **Suppression of lipopolysaccharide-induced antiviral transcription factor (STAT-1 and NF-kappa B) complexes by antibody-dependent enhancement of macrophage infection by Ross River virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:13819-13824.
206. Davis D, Trischmann H, Stephens DM, Lachmann PJ: **Antibodies raised to short synthetic peptides with sequences derived from HIV-1 SF2 gp120 can both neutralize and enhance HIV-1 SF13: a later variant isolated from the same host.** *J Med Virol* 2001, **64**:207-216.
207. Morens DM, Halstead SB: **Measurement of antibody-dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies.** *J Gen Virol* 1990, **71** (Pt 12):2909-2914.
208. Pozzuto T: **Untersuchung des Rezeptor-vermittelten Aufnahmemechanismus von Parvovirus B19 bei der endothelialen Parvovirus B19-Infektion und Adenovirus-induzierte Reaktivierung von Parvovirus B19 in Endothelzellen** Dissertation edition; 2012.
209. 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, **345**:251-257.
210. Pan L, Kreisle RA, Shi Y: **Expression of endothelial cell IgG Fc receptors and markers on various cultures.** *Chin Med J (Engl)* 1999, **112**:157-161.
211. Jones FS: **The Effect of Heat on Antibodies.** *J Exp Med* 1927, **46**:291-301.

212. Vermeer AW, Norde W: **The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein.** *Biophys J* 2000, **78**:394-404.
213. 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, **86**:5099-5109.
214. Sullivan NJ: **Antibody-mediated enhancement of viral disease.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, **260**:145-169.
215. Morens DM: **Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease.** *Clin Infect Dis* 1994, **19**:500-512.
216. Porterfield JS: **Antibody-dependent enhancement of viral infectivity.** *Adv Virus Res* 1986, **31**:335-355.
217. Mason PW, Rieder E, Baxt B: **RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:1932-1936.
218. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG: **Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family.** *Cell* 1996, **87**:427-436.
219. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, et al: **CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5.** *Nature* 1996, **384**:179-183.
220. Mori S, Takeuchi T, Kanda T: **Antibody-dependent enhancement of adeno-associated virus infection of human monocytic cell lines.** *Virology* 2008, **375**:141-147.
221. Fonseca MI, Carpenter PM, Park M, Palmarini G, Nelson EL, Tenner AJ: **C1qR(P), a myeloid cell receptor in blood, is predominantly expressed on endothelial cells in human tissue.** *J Leukoc Biol* 2001, **70**:793-800.
222. Nepomuceno RR, Tenner AJ: **C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets.** *J Immunol* 1998, **160**:1929-1935.
223. Dillon SP, D'Souza A, Kurien BT, Scofield RH: **Systemic lupus erythematosus and C1q: A quantitative ELISA for determining C1q levels in serum.** *Biotechnol J* 2009, **4**:1210-1214.
224. Kaul M, Loos M: **Dissection of C1q capability of interacting with IgG. Time-dependent formation of a tight and only partly reversible association.** *J Biol Chem* 1997, **272**:33234-33244.
225. Meri S, and C.-H. von Bonsdorff.: *In I. Roitt and P. J. Delves (ed.), Encyclopedia of Immunology (Second edition).* Academic Press, San Diego, Calif.; 1998.

226. 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, **278**:361-367.
227. 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 Res* 2005, **114**:1-5.
228. Pasquinelli G, Bonvicini F, Foroni L, Salfi N, Gallinella G: **Placental endothelial cells can be productively infected by Parvovirus B19.** *J Clin Virol* 2009, **44**:33-38.
229. Broliden K, Tolfvenstam T, Norbeck O: **Clinical aspects of parvovirus B19 infection.** *J Intern Med* 2006, **260**:285-304.
230. Prohaszka Z, Nemes J, Hidvegi T, Toth FD, Kerekes K, Erdei A, Szabo J, Ujhelyi E, Thielens N, Dierich MP, et al: **Two parallel routes of the complement-mediated antibody-dependent enhancement of HIV-1 infection.** *AIDS* 1997, **11**:949-958.

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Celcius
AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
ADE	Antikörper-vermittelte Verstärkung der Virusinfektion (<i>Antibody Dependent Enhancement</i>)
A. bidest.	Aqua bidestillata
B19V	Parvovirus B19
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
d	Tag
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DCMi	inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	erythroide Vorläuferzelle (<i>erythroid progenitor cell</i>)
et al.	und alle (<i>et alii</i>)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calfserum</i>)
FPV	felines Panleukopenievirus
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>Forward Scatter</i>)
g	Gramm
HAoEC	humane Endothelzellen der Aorta
HCAEC	humane koronare Endothelzellen
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HPAEC	humane Endothelzellen der Pulmonalarterie
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnur
h	Stunde
HCL	Salzsäure (Chlorwasserstoffsäure)

IC	Isotypenkontrolle (<i>isotype control</i>)
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
ITR	<i>Inverted Terminal Repeat</i>
IU	internationale Units (<i>international units</i>)
kDa	Kilodalton
l	Liter
MCM-Komplex	<i>minichromosome maintenance complex</i>
ml	Milliliter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MVM	<i>Minute Virus of Mice</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ORF	offener Leserahmen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PLA2	Phospholipase 2
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	quantitative Real-Time PCR
s	Sekunden
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>Side Scatter</i>)
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor

trs	terminal resolution site
UV-C	Ultraviolett-C
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

10. Publikationsliste

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 Mar 1;411(1):50-64. doi: 10.1016/j.virol.2010.12.019. Epub 2011 Jan 13.

* gleichberechtigter Erstautor

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. doi: 10.1128/JVI.06991-11. Epub 2012 Feb 22.

Ogbomo H, Geiler J, Leutz A, **von Kietzell K**, Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J Jr.: Measurement of cytotoxic T lymphocyte activity of human cytomegalovirus seropositive individuals by a highly sensitive coupled luminescent method. *Med Microbiol Immunol*. 2009 Nov;198(4):257-62. doi: 10.1007/s00430-009-0126-5. Epub 2009 Oct 8.

Kongressbeiträge

Von Kietzell K., Pozzuto T., Zobel T., Schmidt-Lucke C., Fechner H., Weger S.: Role of Antibody-dependent-enhanced (ADE) Absorption in Parvovirus B19 Infection of Endothelial Cells (Präsentation) XIII Internationaler Parvovirus Workshop (Helsinki) vom 20-24.06.2010

Von Kietzell K., Pozzuto T., Zobel T., Schmidt-Lucke C., Fechner H., Weger S.: Role of Antibody-dependent-enhanced (ADE) Absorption in Parvovirus B19 Infection of Endothelial Cells (Poster) Statusseminar SFB Transregio 19 (Berlin) vom 04-05.02.2011

11. Lebenslauf

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

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