

Technische Universität München
Max-Planck-Institut für Biochemie

**Entwicklung eines anwendungssicheren Vakzine-Prototyps
auf Basis replikations-defizienter Sendai-Viren zur simultanen Expression
von Antigenen heterologer Viren**

Sabine Schlecht

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. Grill

Prüfer der Dissertation:

1. Apl. Prof. Dr. W. J. Neubert

2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 17.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 02.08.2004 angenommen.

Erklärung

Ich erkläre Eides statt, dass ich die der Fakultät
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

**Entwicklung eines anwendungssicheren Vakzine-Prototyps
auf Basis replikations-defizienter Sendai-Viren zur simultanen Expression
von Antigenen heterologer Viren**

am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung und Betreuung von Herrn
Prof. Dr. Wolfgang Neubert (MPI für Biochemie, Martinsried) und vertreten durch
Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl (TUM, Weihenstephan)
ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung
nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren
Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

INHALTSANGABE

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Anwendung replikations-defizienter SeVV im Vakzine-Bereich	4
2.2	Taxonomische Einordnung des Sendai-Virus	6
2.3	Medizinische Bedeutung der Paramyxoviridae	6
2.4	Aufbau und Morphologie des Sendai-Virus	7
2.5	Genomorganisation des Sendai-Virus	9
2.6	Replikationszyklus des Sendai-Virus	10
2.6.1	Viruseintritt in die Wirtszelle	10
2.6.2	Transkription des Genoms	10
2.6.3	Replikation des Genoms	12
2.6.4	Virusassembly und Virusausschleusung	12
2.7	Replikations-defiziente SeVV	13
2.7.1	Das N-Protein	14
2.7.2	Das P-Protein	15
2.7.2.1	Die Nichtstrukturproteine	18
2.7.2.1.1	Die Nichtstrukturproteine der C-Familie	19
2.7.2.1.2	Das Nichtstrukturprotein X	19
2.7.2.1.3	Die Nichtstrukturproteine V und W	20
2.7.3	Das L-Protein	21
2.8	Herstellung replikations-defizienter SeVV in Zellkultur	23
2.9	Zielsetzung der Arbeit	25
3	Ergebnisse	27
3.1	SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten	28
3.1.1	Herstellung des cDNA Konstruktes pSeV-X	29
3.1.2	Herstellung des cDNA-Konstruktes pSeV-X-X	31
3.1.3	Charakterisierung von SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten	33
3.1.3.1	Initiale Herstellung von SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten	33
3.1.3.2	Kinetik der Vermehrung von SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten	35
3.1.4	Basisvektor zur Herstellung der replikations-defizienten SeV Vektoren	37

3.2	Herstellung replikations-defizienter SeVV-eGFP-ΔX	38
3.2.1	Herstellung der cDNA-Konstrukte SeVV-eGFP-ΔX	39
3.2.1.1	Klonierung des cDNA-Konstruktes SeVV-eGFP-ΔN	40
3.2.1.2	Klonierungen der cDNA-Konstrukte SeVV-eGFP-ΔP und -ΔL	41
3.2.2	Herstellung der Virusmutanten SeVV-eGFP-ΔX	42
3.2.2.1	Initiale Herstellung von SeVV-eGFP-ΔX	42
3.2.2.2	Detektion initial hergestellter SeVV-eGFP-ΔN, -ΔP oder -ΔL	43
3.3	Vermehrung von SeVV-eGFP-ΔX	45
3.3.1	Nachweis der Vermehrbarkeit von SeVV-eGFP-ΔX	46
3.3.2	Bestimmung der erforderlichen Proteine zur Vermehrung von SeVV-eGFP-ΔX	48
3.3.3	Vermehrung von SeVV-eGFP-ΔX durch Helferzellen	51
3.3.3.1	Die Helferzelllinie H29	51
3.3.3.1.1	Synthese von SeV Proteinen in H29 Zellen	51
3.3.3.1.2	Sensitivität der H29 Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen	52
3.3.3.1.3	Infizierbarkeit der H29 Zellen	52
3.3.3.1.4	Virusproduktion in H29 Zellen	53
3.3.3.1.5	Expression von Nichtstrukturproteinen durch H29 Zellen	55
3.3.3.2	Unterstützung der Amplifikation von SeVV-eGFP-ΔX durch H29 Zellen	57
3.3.3.3	Vermehrung von SeVV-eGFP-ΔP in H29 Helferzellen	58
3.3.3.4	Wachstumskinetik von SeVV-eGFP-ΔP in H29 Helferzellen	59
3.3.4	Etablierung einer weiteren Helferzelle zur Vermehrung von SeVV-eGFP-ΔP	60
3.3.4.1	Bereitstellung der Ausgangszelllinie	61
3.3.4.2	Bereitstellung des Expressionsvektors	62
3.3.4.3	Transfektion von CHO-Zellen und Selektion resistenter Zellklone	63
3.3.4.4	Nachweis der Synthese des P-Proteins in CHO-Zellen	63
3.3.4.5	Untersuchung der Replikation von SeVV-eGFP-ΔP in CHO-P14 Helferzellen	65
3.4	Genexpression in SeVV-eGFP-ΔP infizierten Zielzellen	66
3.4.1	eGFP-Expression in SeVV-eGFP-ΔP infizierten Zielzellen	66
3.4.2	HN-Expression auf SeVV-eGFP-ΔP infizierten Zielzellen	67
3.4.3	Überlegung zur geringen Anzahl Transgen-exprimierender Zielzellen	69
3.5	Modifikationen von SeVV-eGFP-ΔP zur Steigerung der Expression in Zielzellen	70
3.5.1	Herstellung der drei modifizierten SeVV-eGFP-ΔP cDNA Konstrukte	72
3.5.2	Initiale Herstellung der drei modifizierten SeVV-eGFP-ΔP Vektoren	72

3.5.3	Detektion der Nichtstrukturproteine V oder W infizierten H29 Zellen.....	73
3.5.4	Wachstumsverhalten der drei modifizierten Δ P-Vektoren in H29 Zellen	75
3.5.5	Genexpression der drei modifizierten Δ P-Vektoren in infizierten Zielzellen.....	77
3.5.6	Replikations-Defizienz von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in der Zielzelle.....	79
3.6	Quantifizierung der Proteinsynthese in SeVV-eGFP-PΔ1-77 infizierten Zielzellen.....	81
3.6.1	Quantifizierung der eGFP-exprimierenden Zielzellen.....	81
3.6.2	Quantifizierung der eGFP-Expressionsstärke in infizierten Zielzellen	83
3.6.3	Abschätzung der HN-Expression in infizierten Zielzellen	85
3.6.4	Exprimiertes HN-Protein auf SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Zielzellen	86
4	<i>Diskussion</i>	89
4.1	Erweiterung der Kodierungskapazität von SeV durch zusätzliche Transgene	93
4.2	Anwendungssichere Vektoren durch Gen-Defizienz.....	95
4.3	Expression der Vektor-kodierten Transgene in der Zielzelle.....	100
4.4	Der Vektor SeVV-eGFP-PΔ1-77 ist replikations-defizient	103
4.5	Der Vektor SeVV-eGFP-PΔ1-77: Erreichtes Ziel und weiterführende Experimente .	107
5	<i>Material und Methoden</i>	108
5.1	Material und Bezugsquellen.....	108
5.1.1	Chemikalien	108
5.1.2	Enzyme.....	109
5.1.3	Nukleinsäuren und Plasmide.....	110
5.1.4	Bakterienstämme.....	110
5.1.5	Medien und Zusätze für Prokaryonten.....	110
5.1.6	Zelllinien	110
5.1.7	Medien und Zusätze für Eukaryonten.....	111
5.1.8	Antikörper	111
5.1.9	Transfektionsreagenzien	112
5.1.10	Nachweis- und Präparationssysteme.....	112
5.1.11	Viren.....	112
5.1.12	Liste der verwendeten Geräte	112
5.1.13	Sonstiges	113
5.2	Methoden	114
5.2.1	Zellbiologische Methoden	114

5.2.1.1	Allgemeine Zellkulturmethoden	114
5.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl in Suspension.....	115
5.2.1.3	Bestimmung der Hemmkonzentration für die Selektion von Zellklonen	115
5.2.1.4	Transfektion von eukaryontischen Zellen.....	115
5.2.1.5	Selektion von transfizierten, eukaryontischen Zellen.....	116
5.2.1.6	Monoklonalisierung von transfizierten Zellklonen.....	116
5.2.1.7	FACS-Analyse	116
5.2.2	Virologische Methoden.....	117
5.2.2.1	Vermehrung und Titrierung von Vaccinia Virus MVA-T7.....	117
5.2.2.2	Herstellung rekombinante Sendai-Viren.....	118
5.2.2.3	Infektion von Zellen mit virushaltigem Überstand.....	119
5.2.2.4	Vermehrung und Titrierung von rekombinantem Vaccinia Virus	120
5.2.2.5	HämadSORptionstest (HAD-Test)	120
5.2.2.6	Kulturinfektionsdosistest (KID-Test)	121
5.2.2.7	Zellinfektionsdosistest (ZID-Test).....	121
5.2.3	Molekularbiologische Methoden	122
5.2.3.1	Transformation von E.coli	122
5.2.3.2	Herstellung kompetenter E.coli-Zellen (XL-2 Blue).....	122
5.2.3.3	Präparative Isolierung von Plasmiden.....	123
5.2.3.4	Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen	123
5.2.3.5	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren.....	123
5.2.3.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	123
5.2.3.7	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme.....	124
5.2.3.8	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	124
5.2.3.9	Ligation von DNA-Fragmenten	124
5.2.3.10	Agarose-Gelelektrophorese.....	124
5.2.3.11	Nachweis von Nukleinsäuren im Agarosegel.....	125
5.2.3.12	Isolierung von DNA-Fragmenten (< 10 kb) aus Agarosegelen	125
5.2.3.13	Isolierung von DNA-Fragmenten (≥ 10 kb) aus Agarosegelen	125
5.2.3.14	Aufstellung der verwendeten DNA-Oligonukleotide	126
5.2.3.15	Polymerase-Kettenreaktion.....	127
5.2.3.16	Reinigung von PCR-Produkten.....	128
5.2.3.17	Fusions-PCR Reaktion.....	128
5.2.3.18	Sequenzierung	129
5.2.3.19	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	129

5.2.4	Proteinchemische Methoden.....	130
5.2.4.1	Proteinisolierung aus eukaryontischen Virus-infizierten Zellen.....	130
5.2.4.2	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	131
5.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	132
5.2.4.4	Proteintransfer auf Membran (Western Blot).....	133
5.2.4.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	133
5.2.4.6	Lösen einer Ag-Ak-Komplexierung von einer PVDF- Membran.....	134
5.2.4.7	Nachweis von lacZ-Expression.....	134
5.2.5	Computerprogramme.....	135
5.2.6	Sicherheitsbestimmungen.....	135
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	136

Abkürzungen

Danksagung

Lebenslauf

1 Zusammenfassung

Mit Hilfe rekombinanter Techniken ist es möglich geworden, Negativstrang-RNA-Viren, zu denen auch das Sendai-Virus (SeV) gehört, als Prototyp für den Bereich der Impfstoffentwicklung zielgerichtet zu modifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde ein anwendungssicherer Vakzine-Prototyp mit der Fähigkeit zur simultanen Expression virusfremder Antigene auf Basis von replikations-defizienten SeV entwickelt.

Zunächst wurden für die Expression virusfremder Antigene eine bzw. zwei zusätzliche Transgenkassetten rekombinant in den 3'-Bereich des vollständigen SeV Genoms eingebaut. Diese Transgenkassetten enthalten singuläre Restriktionsschnittstellen für den Einbau variabler Leserahmen und wurden für die Untersuchungen in Zellkultur mit Leserahmen von fluoreszierenden Proteinen ausgestattet (SeV-eGFP, SeV-eGFP-DsRed). Das rekombinante SeV-eGFP wurde für die Etablierung der replikations-defizienten SeV Vektoren (SeVV) herangezogen.

Da der Vakzine-Prototyp unter anderem für die Impfung von Säuglingen eingesetzt werden sollte, musste zur Erhöhung der Anwendungssicherheit die virale Replikation in der Zielzelle unterbunden werden. Zunächst wurden in drei verschiedenen cDNA Konstrukten die Leserahmen der für den viralen Replikations-Modus verantwortlichen Proteine N, P und L einzeln deletiert. Entsprechende virale Vektoren SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P, - Δ L konnten über transkomplementierende T7-Expression der Proteine N, P und L initial in Zellkultur mit einer Effizienz von 56 % (Δ N), 27 % (Δ P) und < 5 % (Δ L) im Vergleich zu rekombinanten SeV hergestellt werden. Die biologische Funktionalität der viralen Vektoren wurde durch Amplifikation in Gegenwart von SeV Wildtyp sichergestellt.

Für die weitere Amplifikation der drei SeV Vektoren SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L stand bereits die in vorangegangenen Arbeiten etablierte Helferzelllinie H29 zur Verfügung, welche die viralen Proteine N, P und L stabil in einem Anteil von 5:10:<5 im Vergleich zu SeV infizierten Zellen exprimiert. Mittels der H29 Helferzellen konnte die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P mit einer 40%-igen Effizienz im Vergleich zu SeV-eGFP erreicht werden. Da H29 Zellen Sendai-Viren generell nicht optimal in ihrer Vermehrung unterstützen, sollte eine zusätzliche Helferzelllinie zur Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ P etabliert werden. Um zu bestimmen, welche der drei SeV Proteine N, P und L für eine Vermehrung der Deletionsmutante SeVV-eGFP- Δ P auf zellulärer Ebene bereit gestellt werden müssen, wurden rekombinante Vaccinia Viren eingesetzt, welche die SeV Proteine N, P oder L einzeln synthetisieren. Durch Koinfektionsversuche konnte ermittelt werden, dass SeVV-eGFP- Δ P durch die alleinige Expression des P-Proteins vermehrt werden kann. Für die Herstellung einer neuen Helferzelllinie wurden CHO-Zellen ausgewählt, die SeV etwa 7 Mal effizienter freisetzen als H29

Zellen und dem GMP-Standard entsprechen. CHO-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pcDI18-P, welches als wesentliches Verstärkungselement das Intron A enthält, transfiziert und stabil P-Protein exprimierende Zellklone selektioniert. Der Zellklon CHO-P14, der das SeV P-Protein in vergleichbarer Menge wie H29 Zellen exprimiert, war jedoch nicht in der Lage, SeVV-eGFP- Δ P zu vermehren. Da mit Hilfe der H29 Zellen ausreichende Mengen an SeVV-eGFP- Δ P für diese Arbeit und für weiterführende Tierversuche hergestellt werden konnten, wurde von weiteren Versuchen zur Etablierung effizienter Helferzellen abgesehen.

Nach Infektion von Verozellen (Zielzellen) mit dem Vektor SeVV-eGFP- Δ P zeigte sich nur bei einem kleinen Teil der infizierten Zellen eine deutliche Transgenexpression. Um den Anteil stark exprimierender Zellen zu vergrößern, wurden zwei Wege eingeschlagen: Es wurden die Leserahmen von fünf der sieben SeV Nichtstrukturproteine, kodiert durch die Leserahmen der Proteine V oder auch W in SeVV-eGFP- Δ P eingesetzt (SeVV-eGFP- Δ P-V, SeVV-eGFP- Δ P-W). Hierdurch sollten mögliche positive Einflüsse dieser Nichtstrukturproteine auf die virale Transkription in der Zielzelle ausgenutzt werden. Gleichzeitig sollten nach getrennter Expression der Nichtstrukturproteine V oder W erstmals deren Funktion unabhängig voneinander und unabhängig vom P-Gen untersucht werden.

Weiterhin wurde der Leserahmen eines N-terminal um 77 Aminosäuren verkürzten P-Proteins in den Vektor SeVV-eGFP- Δ P eingefügt (SeVV-eGFP-P Δ 1-77). Aus *in vitro*-Analysen ist bekannt, dass eine Deletion dieser funktionellen Domäne zur Expression eines P-Proteins führt, welches die RNA-Synthese in infizierten Zellen unterstützt, nicht mehr aber eine Verpackung von neuen RNA-Genomen. Alle drei viralen Vektoren SeVV-eGFP- Δ P-V, SeVV-eGFP- Δ P-W und SeVV-eGFP-P Δ 1-77 konnten initial im Zellkultursystem hergestellt und mit Hilfe der H29 Helferzellen vermehrt werden. Eine Transgenexpression in SeVV-eGFP- Δ P-V oder SeVV-eGFP- Δ P-W infizierten Zielzellen konnte nicht erreicht werden. Nach Infektion von Zielzellen mit SeVV-eGFP-P Δ 1-77 konnte eine Expression des Transgens eGFP und des viralen HN-Gens durch unterschiedliche Nachweisverfahren und virologische Tests bis mehrere Tage nach Infektion gezeigt werden. Mittels Western-Blot Analysen konnte in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Zielzellen die Synthese der Virus-kodierten Gene auf etwa 10 % im Vergleich zu Wildtyp infizierten Zellen abgeschätzt werden. Gleichzeitig konnte die Replikations-Defizienz des Vektors SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in infizierten Zielzellen durch virologische Tests eindeutig bestätigt werden.

Somit wurde erstmals ein viraler Vektor auf Basis des SeV entwickelt, der sich wegen der Deletion einer funktionellen Domäne des P-Proteins durch Replikations-defizientes Verhalten auszeichnet und zugleich eine stabile Transgenexpression über mehrere Tage erbringt.

Dieser anwendungssichere Vakzine-Prototyp kann mit Antigenen verschiedener Paramyxoviren ausgestattet werden, deren Expression in Zielzellen eine antivirale Immunantwort auslösen sollte.

2 Einleitung

Das Sendai-Virus (SeV) gehört zur Familie der *Paramyxoviridae* und besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Orientierung. Für die rekombinante Herstellung von SeV kann auf ein etabliertes Zellkultursystem zurückgegriffen werden. Die Verwendung genomischer SeV cDNA ermöglicht dabei die gezielte Veränderung des viralen Genoms, bevor die cDNA zur Herstellung von rekombinanten Viren in das Zellkultursystem eingebracht wird. SeV kann somit für den Einsatz im medizinischen Bereich, sowie für die Beantwortung spezifischer Fragestellungen im Bereich der Grundlagenforschung modifiziert werden.

Während der langjährigen Erforschung der Biologie der *Paramyxoviridae* wurden einige vorteilhafte Eigenschaften für die Anwendung im Bereich der Entwicklung von Lebendimpfstoffen deutlich: Dem Virus wurde bis heute kein humanpathogenes Potential zugeschrieben, das SeV Genom kann um ein zusätzliches Fremdgen erweitert werden, auch können SeV Oberflächenproteine rekombinant gegen Oberflächenproteine anderer Parainfluenzaviren ausgetauscht werden, wodurch Vektoren für die Immunisierung gegen verschiedene Virusinfektionen bereitgestellt werden könnten. So ist es für Paramyxoviren gelungen, rekombinante Viren mit Oberflächenproteinen verschiedener Virustypen herzustellen und diese als Vakzine in Tierversuchen einzusetzen (Schmidt et al., 2001): Durch den rekombinanten Einbau von F- und HN-Protein des humanen Parainfluenzavirus Typ 3 (hPIV3) und des G- oder F-Proteins des Respiratorischen Syncytial Virus (RSV) in einen Vektor auf Basis des bovinen Parainfluenza Virus Typ 3 (bPIV3) konnte nach Applikation in Hamstern eine mukosale Immunantwort gegen hPIV3 und RSV nachgewiesen werden. Eine bivalente Antigenität dieses im Tierversuch getesteten Lebendimpfstoffes ist somit bereits erreicht.

Beim Einsatz von Viren als Lebendimpfstoff hat der Sicherheitsaspekt oberste Priorität. Bei Applikation eines Lebendimpfstoffes ergibt sich in vielen Fällen das Problem, dass eingesetzte Viren eine unzureichende Attenuierung aufweisen, was zu irreparablen Impfschäden führen kann. Meist wird versucht, die Virulenz eines Lebendimpfstoffes durch die Verwendung kaltadaptierter Mutanten oder durch die Verwendung von Erregern mit rekombinant eingebauten Oberflächenproteinen anderer Virustypen zu erreichen. Das bovine Parainfluenza Virus mit humanen PIV3- und RSV-Oberflächenantigenen soll laut Schmidt und Mitarbeitern wegen der Überschreitung der Speziesbarriere für eine sichere Anwendung im Humanbereich ausreichend attenuiert sein. Reversionen zum Wildtyp sind nicht zu erwarten, da komplette Gene für virale Oberflächenproteine ausgetauscht wurden. Da der Erreger aber replikations-kompetent ist, kommt es im Impfling zu einer Vermehrung, deren Intensität durch die Modifikation des Virus zwar abgeschwächt, aber nicht vollständig ausgeschaltet ist. Die Stärke einer zu erwartenden Virämie und damit die Belastung des

Impflings hängen dabei von individuellen Faktoren ab. Diese sind gerade bei der Anwendung abgeschwächter Viren zur Vakzinierung von Säuglingen oder älteren Menschen sehr unterschiedlich.

Ein Weg, eine Gefährdung des Impflings bei einer viralen Lebendvakzinierung zu minimieren, wäre die Bereitstellung eines replikations-defizienten Vektors, der nach Applikation für eine ausreichende Zeit kodierte Antigene exprimiert, aber wegen fehlender Replikationsfähigkeit zu keiner Virämie und damit zu keiner Schädigung führen sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein replikations-defizienter Sendai-Virus Vektor als Prototyp für den Bereich der Lebendimpfstoffe entwickelt werden. Dieses modifizierte SeV wird im Folgenden als SeV Vektor (V) und damit als SeVV bezeichnet. Der zu etablierende SeVV sollte nach Infektion einer Zielzelle ein replikations-defizientes Verhalten zeigen. Zugleich sollte er die Entwicklung von mindestens bivalenten Vakzinen zulassen. Um die Voraussetzungen für eine Bivalenz in einem replikations-defizienten SeVV zu schaffen, müssen eine oder mehrere zusätzliche Transkriptionskassetten im SeV Genom an solchen Positionen integriert werden, welche eine hohe Transgenexpression mit sich bringen. Dabei sollten die Transkriptionskassetten so konzipiert werden, dass kodierende Leserahmen problemlos eingesetzt werden können. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Leserahmen von fluoreszierenden Proteinen in die Transkriptionskassetten integriert, um die virale Transkription und Replikation leicht verfolgen zu können. Anschließend können die Transkriptionskassetten mit Leserahmen spezifischer Antigene anderer Viren gefüllt werden, welche in Versuchstieren eine Immunantwort auslösen sollten.

Im folgenden Abschnitt soll ein Einblick gegeben werden, welche Anwendungsmöglichkeiten sich durch die Bereitstellung eines solchen replikations-defizienten SeVV ergeben könnten.

2.1 Anwendung replikations-defizienter SeVV im Vakzine-Bereich

Im Folgenden sollen die drei zentralen Aspekte Wirksamkeit, Sicherheit und Anwendbarkeit eines Vakzine-Prototyps auf Basis replikations-defizienter SeV Vektoren (SeVV) diskutiert werden.

Replikations-defiziente SeVV, die nach Infektion von Zellen in der Lage wären, eine Expression von Antigenen verschiedener Virustypen zu gewährleisten, könnten den Prototypen für die Entwicklung von modernen, bivalenten Lebendimpfstoffen darstellen. Das Genom des Sendai-Virus kann um zusätzliche Transgenkassetten erweitert werden, wodurch Antigene verschiedener Virustypen exprimiert werden könnten. Für das SeV wurde bis heute keine große Ausbreitung im Humanbereich nachgewiesen, weshalb keine bestehende Immunantwort in der Population zu erwarten ist. Darüber hinaus könnten anstelle der SeV Gene der Oberflächenproteine F oder HN, analog zu der Arbeit von Schmidt (Schmidt et al., 2001), Oberflächengene anderer Paramyxoviren rekombinant in den SeVV-Prototypen eingebaut werden: Es wäre möglich, Gene der Oberflächenproteine des humanen

Parainfluenzavirus Typ 3 (hPIV3), des humanen Respiratorischen Syncytial Virus (hRSV), des Masern- oder Mumpsvirus rekombinant in das Genom eines replikations-defizienten SeVV zu integrieren. Bei einer derartigen Anwendung könnte der Impfling gleichzeitig gegen mehrere Virustypen immunisiert werden.

Bei der Entwicklung von Vakzinen für Säuglinge und ältere Menschen muss der sicherheitstechnische Aspekt genauestens überprüft werden. Replikations-kompetente Viren können sich nach Applikation im Impfling je nach Immunkompetenz vermehren und es kann durch eine Virämie zu schwerwiegenden Schädigungen kommen. Könnte ein SeVV konzipiert werden, der nach Infektion von Zellen nicht in der Lage ist, zu replizieren, würden unerwünschte Schädigungen des Organismus, die durch unkontrollierte Ausbreitung des als Lebendimpfstoff eingesetzten Virus zustande kommen könnten, unterbunden werden. Des Weiteren wäre eine mögliche Übertragung auf andere Menschen auszuschließen.

Für die Anwendbarkeit der geplanten Vakzine lassen sich folgende Überlegungen anstellen: Primäre humane Lungenepithelzellen können mit hoher Effizienz von SeV infiziert werden (Pinkenburg et al., 2004). Diese gute Infizierbarkeit mukosaler Zellen könnte mit der Verabreichung der SeVV-Vakzine in Form eines Nasensprays kombiniert werden. Hierzu liegen im Bereich der Entwicklung von Influenza-Vakzinen auf Virosomenbasis bereits Erfahrungen vor, ein Präparat ist bereits lizenziert (<http://www.bernabiotech.com/products/index.html>). Auch im Bereich von Lebendimpfstoffen gegen humane Influenzaviren setzt man auf die Verabreichung des Präparates in Form von Nasenspray. Hier sollen attenuierte, kälteadaptierte Influenza Viren appliziert werden, um eine kurzzeitige, subklinische verlaufende Infektion im oberen Nasen-Rachenraum hervorzurufen. Diese Applikation reicht aus, um eine hocheffiziente Immunantwort auszulösen. Vorteil gegenüber den herkömmlichen intramuskulär verabreichten Influenza-Impfungen ist, dass die Immunantwort genau dort induziert wird, wo natürliche Influenza-Infektionen beginnen. Es werden vornehmlich auf den Schleimhäuten des Nasen-Rachenraumes lokalisierte Antikörper von Typ A gebildet (www.paul-ehrlich-institut.de/themen/impf/influenza.htm). Aber auch die hier beschriebenen Influenza-Viren können trotz eines attenuierten Replikationsverhaltens bei unkontrollierter Ausbreitung im Gewebe schwere Impfschäden hervorrufen, was vor allem bei Kleinstkindern schwere Schäden hervorrufen könnte.

Ein replikations-defizienter SeVV wäre zu keiner unkontrollierten Ausbreitung in der Lage und würde bei Applikation in Form eines Nasensprays leicht anwendbar sein.

Nachfolgend soll das Sendai-Virus genauer vorgestellt werden. Dabei wird detailliert auf seine Klassifizierung, seinen Aufbau und sein Infektions- und Replikationsverhalten eingegangen. Anschließend werden die drei für die Transkription und Replikation verantwortlichen Proteine des viralen Polymerase-Komplexes (N, P, L) vorgestellt und mögliche Strategien für die Herstellung eines bivalenten, replikations-defizienten SeVV erläutert.

2.2 Taxonomische Einordnung des Sendai-Virus

Das Sendai-Virus gehört zu der Familie der *Paramyxoviridae*, die ein einzelsträngiges RNA-Genom mit Negativorientierung besitzen und zu der Ordnung der *Mononegavirales* zählen. Weitere Virusfamilien dieser Ordnung sind die *Rhabdo-* und die *Filo-* und *Bunyaviridae*. Die *Paramyxoviridae* bestehen aus zwei Unterfamilien, den *Paramyxovirinae* und den *Pneumovirinae*, die ihrerseits noch weiter unterteilt werden in folgende Gattungen und Arten (Fields, 2001):

Unterfamilie	Genus	Vertreter
<i>Paramyxovirinae</i>	Respirovirus	Sendai-Virus Humanes Parainfluenza Virus Typ 1 und 3
	Rubulavirus	Mumps Virus Humanes Parainfluenza Virus Typ 2, 4a und 4b Newcastle Disease Virus
	Morbillivirus	Masernvirus
	<i>Pneumovirinae</i>	Pneumovirus
Metapneumovirus		Avian Pneumovirus

Das Sendai-Virus wurde erstmals 1952 isoliert, als Kuroya und seine Mitarbeiter an der Universität der Stadt Sendai in Japan Mäuse mit Proben eines an Pneumonie verstorbenen Kindes infizierten (Kuroya et al., 1953). Aufgrund der Tatsache, dass der Erreger aus einem Menschen isoliert wurde, hielt man das Virus damals für humanpathogen. Später stellte sich jedoch heraus, dass dieses Virus häufig Mäuse infiziert, beim Menschen jedoch selten Erkrankungen verursacht (Modrow et al., 2003). Es erhielt die Bezeichnung „Sendai-Virus D52“, da es damals in die Gruppe der *Myxoviren* Typ D eingeteilt wurde (Jensen et al., 1955). 1962 entdeckte man unter den *Myxoviren* morphologische Unterschiede und unterteilte sie in die Genera der *Ortho-* und *Paramyxoviren* (Waterson, 1962).

2.3 Medizinische Bedeutung der Paramyxoviridae

Parainfluenzaviren vom Typ 1 und 3 können bei Säuglingen schwere Atemwegserkrankungen hervorrufen, die, vorwiegend in den Entwicklungsländern, eine der Haupttodesursachen bei Kindern bis zum 6. Lebensalter darstellen.

Als Erreger von Erkrankungen des Respirationstraktes von Kindern hat vor allem das 1955 erstmals isolierte Pseudokrapp verursachende Parainfluenzavirus Typ 2 große Bedeutung (Modrow et al.,

2003). Es erzeugt Atemwegserkrankungen bei Kindern im Vorschulalter, wobei das Virus primär die oberen Atemwege befällt, sich in der Kehlkopfregion ausbreitet und dann die oberen Bereiche der Luftröhre befällt. Das Parainfluenzavirus Typ 3 gilt als zweithäufigste Ursache von Pneumonie und Bronchiolitis (Glezen et al., 1989)

Das Respiratorische Syncytial Virus ist aus der Gattung der Pneumoviren der häufigste Verursacher schwerer Erkrankungen der Luftwege bei Kleinkindern. Das Mumpsvirus verursacht die bekannte Kinderkrankheit Mumps und tritt vereinzelt als Sekundärinfektion in Form von Enzephalitiden auf (Rautenberg & Ullmann, 1986). Das bekannteste und häufig verbreitete humanpathogene Morbillivirus, das Masernvirus, verursacht im Kleinkindesalter die Masern-Krankheit. Auch bei dieser Erkrankung kommt es bei einem niedrigen Anteil der Patienten zu Enzephalitiden, die zu $\frac{1}{7}$ tödlich verlaufen und zu $\frac{1}{4}$ zu anhaltenden neurologischen Schäden führen. Des Weiteren können durch Parainfluenzaviren Infektionen des ZNS auftreten und diese sowohl in persistierender als auch in akuter Form. Bisher konnten gegen humane Parainfluenzaviren weder Vakzine, noch antivirale Therapien auf den Markt gebracht werden, während gegen Masern- und Mumpsinfektionen Impfstoffe existieren. Die weitere Forschung im Bereich der Parainfluenzaviren und die damit verbundenen tiefergehenden Erkenntnisse zur Biologie dieser Viren können zur Entwicklung von Vakzinen beitragen.

2.4 Aufbau und Morphologie des Sendai-Virus

Das Sendai-Virus ist ein behülltes Virus mit helikalem Nukleokapsid (Abb.1). Die durchschnittliche Größe des Sendai-Virus beträgt 150 nm (Fields, 2001). Die Hülle besteht aus einer Lipidmembran, welche von der Plasmamembran der Wirtszelle stammt, aus welcher das Virus freigesetzt wurde (Klenk et al., 1969; Klenk et al., 1970). In die virale Hülle sind zwei transmembrane Glykoproteine verankert. Das Fusionsprotein (F) besitzt in seiner aktiven Form die Eigenschaft Membranen zu fusionieren. Das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN) trägt eine hämagglutinierende Eigenschaft zur Rezeptorbindung und eine Neuraminidase-Aktivität zur Virusfreisetzung. Das Matrixprotein (M) kleidet die Innenseite der Membran aus und hat eine Vermittlerrolle zwischen Nukleokapsid und Oberflächenproteinen (Stricker et al., 1994).

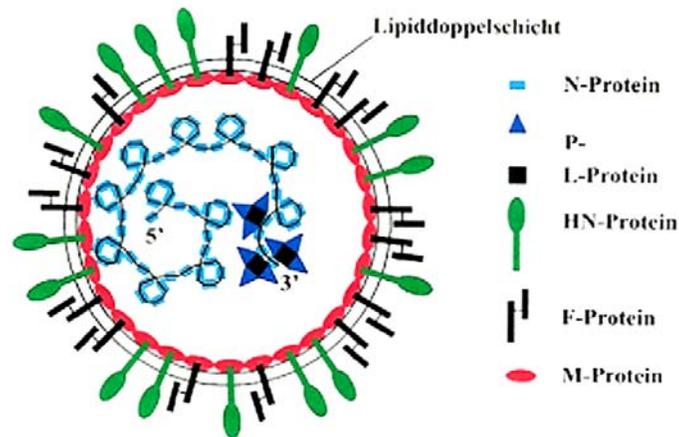


Abb. 1: Morphologie des Sendai-Virus (aus Fields, 2001)

Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA, die mit den N-, P- und L-Proteinen zu einem helikalen Nukleokapsid interagiert. Das Nukleokapsid ist von einer Membranhülle umgeben, in welche die HN-Proteine und die F-Proteine (aus je einer F₁- und F₂- Untereinheit) eingelagert sind. Mit der Innenseite der Membran ist das M-Protein assoziiert, das gleichzeitig auch in Bindung mit den Nukleokapsidkomponenten vorliegt.

Die einzelsträngige RNA des SeV Wildtyp (wt) liegt im Komplex mit Nukleoproteinen (N) als linksorientierte Helix vor. Je 6 Nukleotide werden von einem N-Protein gebunden. Jede Windung der Nukleokapsidhelix besteht aus 13 N-Proteinen, bzw. 78 Nukleotiden. Bei der Herstellung von rekombinanten Viren stellte man fest, dass es nur zu einer effizienten Replikation von Genomen kommt, wenn die Anzahl an Nukleotiden einem Vielfachen von Sechs entspricht (Calain & Roux, 1993). Diese so genannte "rule of six" beruht auf der Tatsache, dass immer genau sechs Nukleotide von dem 5'-Ende der wachsenden RNA-Kette mit einem N-Protein assoziiert werden. Die Effizienz des Promotors am 3'-Ende beruht dann wahrscheinlich auf der exakten Verpackung der *cis*-aktiven Sequenzen mit den N-Untereinheiten, d.h. sie ist nur dann gewährleistet, wenn sich die Anzahl an Nukleotiden durch sechs teilen lässt, da sonst einige Nukleotide unverpackt und damit schutzlos im Zytoplasma der infizierten Zelle einem Abbau durch zelluläre Komponenten ausgesetzt wären.

Zusammen mit etwa 300 Phosphoproteinen (P) und 50 *Large*-Proteinen (L) bildet der RNA-Nukleoprotein-Komplex das Nukleokapsid (NC), und erst durch diese Einheit ist eine virale Transkription und Replikation möglich (Buchholz et al., 1994).

2.5 Genomorganisation des Sendai-Virus

Das einzelsträngige, negativorientierte RNA-Genom des SeV Wildtyp (wt) besteht aus 15.384 Nukleotiden (nt). Die Gene der sechs Strukturproteine liegen darauf in der Reihenfolge 3'-N-P/C-M-F-HN-L-5' vor (Abb.2). Zwischen den Genen liegen Übergänge aus 50 – 80 Nukleotiden, die jeweils eine stark konservierte Region von 22 Nukleotiden beinhalten. Diese Sequenz lässt sich wiederum in drei Abschnitte unterteilen. Die ersten neun Nukleotide stellen das Terminationssignal des vorangegangenen Gens dar. Die nachfolgenden drei Nukleotide, entweder 3'-GAA oder 3'-GGG, bilden die so genannte intergenische Sequenz (IR) und werden nicht transkribiert. Die letzten 10 Nukleotide fungieren als Startsignal für das folgende Gen (Gupta and Kingsbury, 1984). Jedes Gen enthält also flankierende Konsensussequenzen, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Nagai et al., 1999). Eine Einheit aus Startsignal, open reading frame (ORF) und Terminationssignal wird als Transkriptionskassette bezeichnet. Vor dem N-Gen befindet sich eine 55 Nukleotide lange *leader*-Sequenz, die zwar transkribiert, allerdings nicht translatiert wird. Von der 54 Nukleotide langen *trailer*-Sequenz wird in einigen Arbeiten angenommen, dass sie ebenfalls transkribiert wird, aber nicht translatiert (Fields, 2001). Die *leader*- und *trailer*- Region fungieren als genomische und antigenomische Promotoren für die Replikation von Genom bzw. Antigenom (Vulliemoz & Roux, 2002). Die mRNAs sind mit Ausnahme der P/C-RNA monocistronisch.

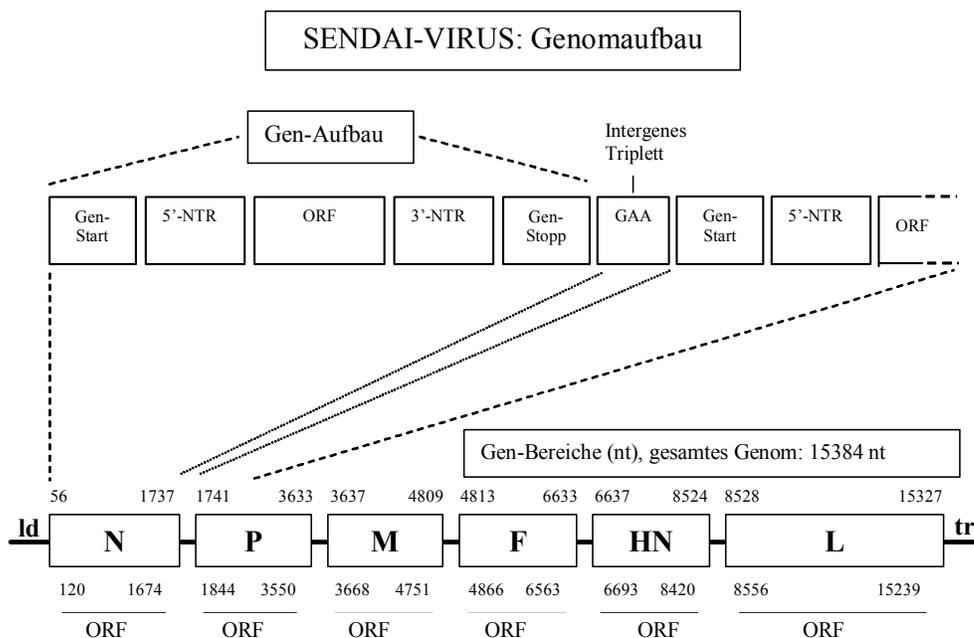


Abb.2: Genomaufbau des Sendai-Virus.

Schematische Darstellung aller vorhandenen Abschnitte des Genoms. Angabe aller vorhandenen Open Reading Frames (ORF) mit zugehörigen Positionen der Nukleotide. Darstellung des Gen-Aufbaus anhand eines Genomausschnitts.

Das P/C-Gen codiert für insgesamt 8 Proteine (P, C, C', Y1, Y2, X, V, W). Es handelt sich um das strukturelle Phosphoprotein (P) und alle bisher bekannten Nichtstrukturproteine. Die Ursache für das Auftreten verschiedener Proteine liegt in der Verwendung verschiedener Start-Codons und der dadurch entstehenden unterschiedlichen Leserahmen innerhalb des P/C-Gens (Curran & Kolakofsky, 1988; 1989). Die mRNAs der Proteine V und W entstehen durch den Mechanismus des „RNA-Editings“, welcher einen Wechsel des Leserahmens durch Insertion zusätzlicher Guanylat-Moleküle in einem Teil der Transkripte vom P-Gen (Vidal et al., 1990) bewirkt (siehe 2.7.2.1).

2.6 Replikationszyklus des Sendai-Virus

Der Replikationszyklus des SeV gliedert sich in die Bereiche Eintritt in die Wirtszelle, Transkription und Translation, Replikation und Reifung mit anschließender Ausschleusung neu produzierter Viren.

2.6.1 Viruseintritt in die Wirtszelle

Das virale Nukleokapsid wird nach Adsorption des infektiösen Virus an die Wirtszelle und nach Fusion der Zell- und Virusmembran ins Zytoplasma eingeschleust (Penetration). Voraussetzung für die Adsorption ist ein Sialinsäure-haltiger Rezeptor (Sialorezeptor) an der Zelloberfläche, an den das Virus über das HN-Protein bindet. Für die Fusion mit der Zellmembran muss das F₀-Protein auf der Virushülle durch extrazelluläre Proteasen in die Untereinheiten F₁ und F₂ gespalten worden sein (Ohuchi & Homma, 1976). Im Anschluss kann der hydrophobe Teil der F₁-Untereinheit mit der Zellmembran interagieren und die Fusion einleiten. Es konnte neben dem von extrazellulären Proteasen abhängigen F-Protein ein so genanntes F_{mut}-Protein identifiziert werden, welches nicht von der Anwesenheit gewebespezifischer Proteasen abhängig ist, sondern eine ubiquitäre Spaltstelle für die Aktivierung des F-Proteins trägt. Durch den rekombinanten Einbau dieses F_{mut}-Proteins kann die Aktivierung durch jede beliebige zelluläre Protease durchgeführt werden.

2.6.2 Transkription des Genoms

Die Synthese der viralen Komponenten erfolgt im Zytoplasma der infizierten Zelle. Am Vorgang der Transkription sind vor allem die Proteine N, P und L beteiligt, wobei L die virale RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRp) mit allen katalytischen Aktivitäten darstellt (Abb. 3). Da das Genom des SeV in Negativstrangorientierung vorliegt, kann die virale RNA nicht direkt in Proteine übersetzt werden. Zunächst erfolgt eine primäre Transkription zu mRNAs durch die RdRp, die mit dem

Nukleokapsid assoziiert in die Zelle gebracht wird. Beginnend am 3'-Ende des Genoms im Bereich der *leader*-Sequenz erfolgt zuerst die Transkription einer zum *leader* komplementären RNA. Diese endet noch vor dem N-Gen. Die RdRp setzt für die Transkription des N-Gens erneut an, wobei der Polymerase-Komplex mit dem Virusgenom assoziiert bleiben muss. Die Transkription des N-Gens wird an der N-Genstopp-Sequenz am 5'-Ende beendet und der Transkriptionskomplex überspringt die intergenischen Nukleotide, um an der Genstart-Sequenz des nachfolgenden P-Gens mit der Transkription fortzufahren. Auf diese Weise werden alle sechs viralen Gene und die Nichtstrukturgene in mRNA transkribiert, mit einer 5'-Cap-Struktur versehen und am 3'-Ende polyadenyliert.

Während der Transkription des Genoms und dem Ablauf von Transkriptionsstopp, Überspringen der intergenischen Sequenz und Transkriptionsneustart kann der Transkriptionskomplex dissoziieren. Da dieser Vorgang für die später transkribierten Bereiche Richtung 5'-Ende wahrscheinlicher wird, entsteht ein Transkriptionsgradient; vom N-Gen wird am meisten mRNA gebildet und vom letzten Gen, dem L-Gen, am wenigsten. Daher ist es von Vorteil, ein therapeutisches Gen, das maximal exprimiert werden soll, im 3'-proximalen Bereich vor dem viralen Genom zu platzieren. Neben diesem Mechanismus kann die Transkription viraler Gene noch in geringem Ausmaß über bestimmte Konsensussequenzen und über den Mechanismus des *Phasings* reguliert werden (Glazier et al., 1977; Homann et al., 1990). Für das zwischen den Genen liegende intergene Triplet und die folgende Genstart-Sequenz existieren hochkonservierte Konsensussequenzen. Abweichungen von dieser Sequenz, wie sie in der Start-Sequenz des F-Gens und sowohl im intergenen Triplet als auch in der Start-Sequenz des L-Gens vorkommen, führen zu einer verringerten Transkriptionsrate dieser Gene (Kato et al., 1999).

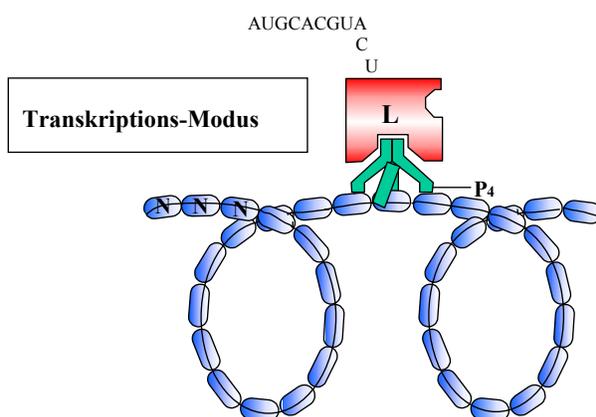


Abb. 3: Schematische Darstellung des SeV Transkriptions-Modus.

Der Polymerase-Komplex, bestehend aus einem L-Protein und einem Homotetramer aus P-Proteinen wandert auf der mit N-Proteinen verpackten RNA in Richtung 5'-Ende entlang. Dabei wird die genetische Information auf der genomischen RNA abgelesen und in mRNA übersetzt.

2.6.3 Replikation des Genoms

Um neue Virusgenome mit negativer Polarität herzustellen, werden zunächst Antigenome (AG) gebildet, die dann als Matrizen für die Bildung der Genome dienen. Da die Genomreplikation wie die Transkription am 3'-Ende des Genoms beginnt, muss es einen Mechanismus geben, der für das Umschalten in den Replikations-Modus verantwortlich ist. Dieser wird von der Menge an freiem N-Protein in der Zelle bestimmt. Erst wenn ausreichend N-Proteine über mRNAs gebildet worden sind, können diese mit dem Transkript der *leader*-RNA interagieren und verhindern so einen Abbruch der Transkription an den Regulationssequenzen (Vidal & Kolakofsky, 1989). Nachdem ein AG, das über seine ganze Länge mit N-Protein komplexiert ist, vorliegt, kann dieses als Matrize zur Herstellung von Genomäquivalenten dienen. Diese werden ebenfalls direkt mit N-Proteinen verpackt. Für den Prozess der Replikation sind wiederum die Proteine N, P und L verantwortlich (Abb.4), die in Kombination den viralen RNA-Polymerase-Komplex bilden (Hamaguchi et al., 1985).

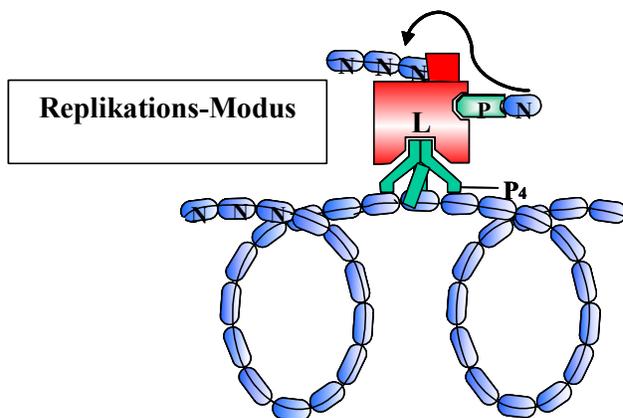


Abb. 4: Schematische Darstellung des SeV Replikations-Modus.

Im Replikations-Modus interagieren vorhandene N-Proteine mit der *leader*-RNA und verhindern den Stopp der Transkription an den intergenischen Sequenzen. Durch diesen Vorgang der Antitermination entstehen mit N-Protein verpackte RNA-Genome vollständiger Länge.

2.6.4 Virusassembly und Virusausschleusung

Während der Virusreplikation werden durch die steigende Anzahl an mRNAs auch zunehmend virale Proteine synthetisiert. Die Bindung von Nukleokapsiden an virale Oberflächenproteine erfolgt wohl bereits an der intrazellulären Membran des Golgi-Apparates (Sanderson et al., 1993). Die viralen

Transmembranproteine HN und F, die während ihrer Glykosylierung über das Endoplasmatische Retikulum zum Golgi-Apparat gelangen, interagieren über die zytoplasmatische Domäne mit dem M-Protein. Das M-Protein wiederum bindet Nukleokapside über das N-Protein und fungiert so als Mediator zwischen den viralen Glykoproteinen und dem Nukleokapsid (Stricker et al., 1994). Man nimmt an, dass das M-Protein einen entscheidenden Einfluss auf die gleichmäßige Verteilung der gesamten viralen Proteinkomplexe in der Membran hat und dass der Komplex aus Nukleokapsid und viralen Proteinen, in Form eines sekretorischen Vesikels dem exocytotischen Weg folgend, zur Membran transportiert wird (Doms et al., 1993). Dort kommt es zur Ausstülpung der Zellmembran und zur Knospung der Viren. Allerdings ist der Vorgang der Virusfreisetzung im Detail noch weitgehend ungeklärt. Auf der Zelloberfläche sind Sialinsäuren durch die Neuraminidase-Aktivität des HN-Proteins von den Rezeptoren abgespalten, wodurch eine Reinfektion der Zelle durch das Sendai-Virus verhindert wird. Somit kann sich das Virus, ohne von Sialorezeptoren gebunden zu werden, von der Zelle ablösen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Sendai-Virus (SeV) durch Deletion der Gene des Polymerase-Komplexes oder deren funktionellen Domänen in einen SeV Vektor (SeVV) umgewandelt werden, der nach Infektion einer Zelle nicht mehr in der Lage ist, zu replizieren. Dieser SeVV sollte mit Hilfe einer transkomplementierenden Helferzelle vermehrt werden. In einer infizierten Zielzelle sollte eine Expression der kodierten Transgene in ausreichender Menge stattfinden, um bei der Anwendung als Vakzin eine humorale Immunantwort zu induzieren.

Nachfolgend soll auf die Proteine N, P und L, die für die Ausbildung eines funktionellen Polymerase-Komplexes, und damit für die virale Transkription und Replikation, verantwortlich sind, ausführlich eingegangen werden.

2.7 Replikations-defiziente SeVV

Die RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRp) des Sendai-Virus setzt sich aus den Proteinen Phosphoprotein (P) und Large-Protein (L) zusammen. Im funktionellen Polymerase-Komplex liegt die RNA mit N-Protein verpackt vor, diese Konformation bezeichnet man als Ribonukleoprotein (RNP) oder Template der RdRp (Hamaguchi et al., 1985). Das Nukleoprotein (N) sorgt dabei für die Komplexierung zwischen RdRp und Template und ist somit ebenso für eine funktionelle Transkription und Replikation verantwortlich (Lamb et al., 2001).

Um SeV-Mutanten für sichere Lebendimpfstoffe zu entwickeln, sollte ein SeV Vektor (SeVV) konzipiert werden, der durch Deletion einer funktionellen Domäne oder eines vollständigen Gens eines der Proteine des Polymerase-Komplexes replikations-defizient ist (SeVV- Δ N, - Δ P, - Δ L). Replikations-

defiziente SeV werden im Folgenden als Vektoren (SeVV) bezeichnet, wohingegen replikationskompetente Viren als SeV betitelt werden.

Gleichzeitig sollte versucht werden, Voraussetzungen für die Entwicklung einer bivalenten Vakzine zu schaffen. Dazu sollten eine oder mehrere Transkriptionskassetten in das virale Genom integriert werden, in die für spätere Anwendungen Leserahmen verschiedener Antigene integriert werden können. Für die Amplifikation eines solchen viralen Vektors sollte zunächst die bereits etablierte Helferzelllinie H29, welche die SeV Proteine N, P und L stabil exprimiert, eingesetzt werden (Willenbrink & Neubert, 1994). Mit dieser Helferzelle sollte die Vermehrung der viralen Vektoren SeVV- Δ N, - Δ P und - Δ L durch zelluläre Transkomplementation geprüft werden. Falls erforderlich, sollte eine verbesserte Helferzelllinie zur Unterstützung der Vermehrung der replikations-defizienten SeVV etabliert werden.

Nachfolgend soll detailliert auf die funktionellen Domänen der Proteine N, P und L eingegangen werden. Dabei soll erörtert werden, welche Konstrukte denkbar wären, bei denen Replikations-Defizienz und zugleich ausreichende Antigen-Expression zu erwarten wären.

2.7.1 Das N-Protein

Das Nukleoprotein (N-Protein) verpackt die einzelsträngige RNA von SeV, indem ein N-Protein jeweils sechs Nukleotide der RNA umhüllt (Calain et Roux, 1993; Kolakofsky et al., 1998). Durch diese Interaktion mit der viralen RNA entsteht die Ausbildung der linksgewundenen helikalen Struktur des Ribonukleoproteins (RNP). Das N-Protein bindet an den phosphorylierten Zuckeranteil der RNA, präsentiert während der viralen Transkription und Replikation die Nukleotidbasen und moduliert die in der RNA kodierten Transkriptionsfaktoren (Iseni et al., 2002). Der als RNP bezeichnete Komplex fungiert als Template für die RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRp), die aus dem Phosphoproteinen (P) und dem *Large*-Protein (L) zusammengesetzt ist. Voraussetzung für eine virale Genomreplikation ist die Komplexbildung von freiem N-Protein mit P-Protein (N^0 :P-Komplex), um die kotranskriptionelle Verpackung der neusynthetisierten RNA zu gewährleisten.

Bisher konnten zwei konservierte Domänen mit ihren zugehörigen Aminosäure (As) Bereichen im N-Protein identifiziert werden.

Domäne I (As 1-385) ist verantwortlich für die stabile Bindung des N-Proteins an die RNA (RNP-Bildung) und ebenso für die Komplexierung benachbarter N-Proteine auf dem RNP. In *in vitro*-Untersuchungen führt ein Aminosäureaustausch an Position 324 in Domäne I zum Ausbleiben der Verpackung neuer viraler Genomstränge, was mit einer fehlenden N:N-Komplexierung begründet wurde (Myers & Moyer., 1997a). Zwischen As 114 und 129 konnte des Weiteren in Domäne I ein

Bereich identifiziert werden, der verantwortlich ist für die Funktionalität des Nukleokapsid als Template bei der viralen Genomreplikation (Myers & Moyer, 1997b).

Die C-terminale Domäne II (As 424 - 524) des N-Proteins beinhaltet die Bindedomäne für das P-Protein. N⁰:P-Komplexe sind eine notwendige Voraussetzung für die Verpackung neu synthetisierter Genome während der Replikation (Horikami & Moyer, 1995). Dadurch wird der Domäne II *in vivo* eine essentielle Funktion bei der Genomsynthese zugeschrieben. Das N-Protein ist folglich zwar enzymatisch nicht aktiv, seine wesentliche Beteiligung an viraler Transkription und Replikation konnte aber eindeutig belegt werden (Modrow et al., 2003).

Die Herstellung der Deletionsmutante SeVV-ΔN ist ein Erfolg versprechender Weg zur Entwicklung eines replikations-defizienten SeVV, da bei fehlender N-Proteinsynthese auch keine N⁰:P-Komplexe entstehen können. Nach seiner initialen Herstellung müsste ein N-defizienter SeV Vektor (SeVV-ΔN) zunächst in einer N-Protein exprimierenden Helferzelle, z.B. der H29 Helferzelle, vermehrt werden. Nach Infektion einer Zielzelle mit SeVV-ΔN sollte durch die transferierten Nukleokapside die Transkription der RNA möglich sein. Neben der Transkription von Antigen-Genen sollten auch die viralen Gene exprimiert werden und somit auch neue P:L-Komplexe hergestellt werden. Diese neu synthetisierten P:L-Komplexe könnten fortlaufend die Transkription unterstützen. Umgekehrt wäre eine Genomreplikation ohne die Bereitstellung neuer N⁰:P-Komplexe für die Verpackung von genomischer RNA nicht zu erwarten. Die beiden Zielsetzungen, primäre Transkription und Replikations-Defizienz in der Zielzelle, könnten somit durch SeVV-ΔN erfüllt werden.

Neben dem N-Protein ist auch das P-Protein über den N⁰:P-Komplex an der Genomreplikation beteiligt. Im Folgenden werden die funktionellen Domänen des P-Proteins vorgestellt und analysiert, ob auch durch Herstellung einer SeVV-ΔP Deletionsmutante die gesteckten Ziele erreicht werden könnten.

2.7.2 Das P-Protein

Das Phosphoprotein (P-Protein), zusammengesetzt aus 568 Aminosäuren, gliedert sich in eine 319 Aminosäuren lange N-terminale Domäne (PNT) und eine C-terminale Domäne (PCT) (Abb. 5). In der PNT befindet sich ein hochkonservierter Bereich (As 33-41), durch den neu synthetisiertes N-Protein (N⁰-Protein) gebunden wird und somit dessen Bindung an nicht-virale RNA in der infizierten Zelle verhindert wird (Chaperonfunktion). In einem *in vitro*-System konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der As 1 – 77 des P-Proteins die Genomreplikation inhibiert, wobei die virale Transkription aktiv bleibt (Curran et al., 1994).

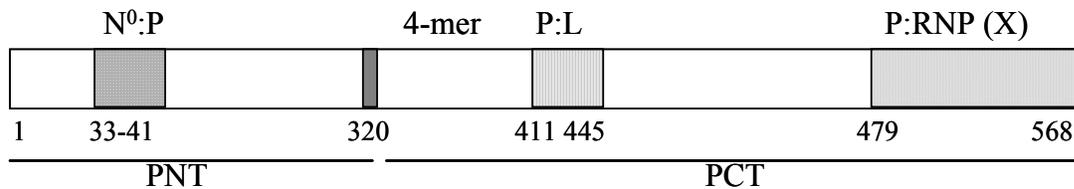


Abb. 5: Die Domänen des SeV P-Proteins.

Schematische Darstellung des P-Proteins mit seinen N- und C-terminalen Domänen (PNT, PCT), der Tetramerisierungsdomäne (As 320-446), der P:L-Bindedomäne (As 411-445) und der P:RNP-Bindedomäne (As 479-568), welche auch als X-Domäne bezeichnet wird.

Die C-terminale Domäne des P-Proteins (PCT) ist unter anderem für die Ausbildung des für die virale Transkription und Replikation essentiellen P-Tetramers verantwortlich. Röntgenstrukturanalysen ergaben für die Oligomerisierungsdomäne (As 320 – 433) eine helikale Tetramerstruktur der SeV P-Proteine (Tarbouriech et al., 2000). Die L-Bindedomäne (As 411-445), die einen Teil der Oligomerisationsdomäne darstellt, und die RNP-Bindedomäne (As 479-568) (Curran et al., 1995) sind involviert in die RNA-Synthese (Tuckis et al., 2002) während des viralen Transkriptions- (Abb. 6a) und Replikationsprozesses (Abb. 6b). Es wird angenommen, dass das P-Protein im Komplex mit dem L-Protein seine Lokalisation auf dem Nukleokapsid verändern kann und wandert, weshalb es die Bezeichnung „mobiles“ Protein erhalten hat.

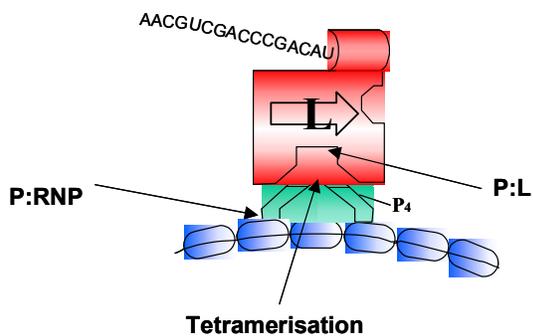


Abb. 6a: P-Protein Interaktionsstellen während der RNA-Transkription.

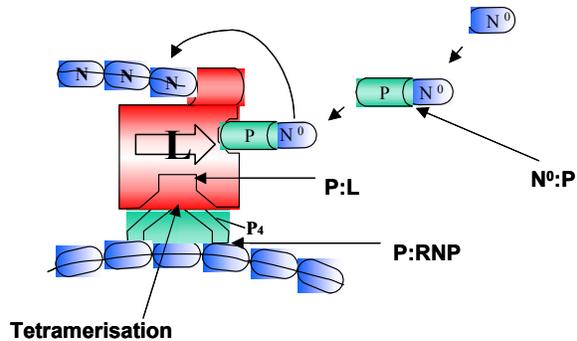


Abb. 6b: P-Protein Interaktionsstellen während der RNA-Replikation.

Ein P-defizienter SeV Vektor (SeVV- Δ P) sollte ebenfalls in der H29 Helforzelle, die das SeV P-Protein zur Verfügung stellt, vermehrt werden können. Nach Infektion einer Zielzelle mit SeVV- Δ P könnte eine primäre Transkription durch die auf dem Nukleokapsid mitgeführten P:L-Komplexe stattfinden. Dadurch könnte das kodierte Antigen bzw. Transgen exprimiert werden.

Eine Vermehrung von SeVV- Δ P in der Zelle sollte ausgeschlossen sein: Nach der Infektion einer Zelle mit SeVV- Δ P könnte aufgrund des fehlenden P-Proteins der für den Replikations-Modus erforderliche N⁰:P-Komplex nicht ausgebildet werden. Somit können keine neuen Genome in der Zelle synthetisiert werden.

Neben der Herstellung von SeVV- Δ P wäre ein weiterer Ansatz denkbar, bei dem nur ein Teilbereich des P-ORFs deletiert ist: Die Domäne I des P-Proteins (As 1 – 77) konnte durch *in vitro*-Untersuchungen für die Ausbildung des N⁰:P-Komplexes verantwortlich gemacht, welcher für die kotranskriptionale Verpackung neuer RNA-Stränge bei der Replikation essentiell ist (Abb. 6b). Durch den Einbau eines N-terminal um 77 Aminosäuren verkürzten P-Proteins (P Δ 1-77) in SeVV- Δ P würde ein viraler Vektor zur Verfügung gestellt, der nach Infektion einer Zelle ein verkürztes P-Protein synthetisiert. Dieses verkürzte P Δ 1-77-Protein könnte diejenigen funktionellen Domänen bereitstellen, die für die Transkription essentiell sind, eine Verpackung viraler Genomstränge könnte aber wegen der fehlenden Bindefähigkeit von P Δ 1-77 zu N-Protein nicht mehr stattfinden. Mit diesem Ansatz könnten die von Curran und Mitarbeitern vorliegenden *in vitro*-Daten durch *in vivo*-Untersuchungen überprüft werden. Da die Bestimmung der funktionellen Domänen im P-Protein auf *in vitro*-Daten basiert und sichergestellt werden musste, dass eine SeVV- Δ P Deletionsmutante initial herstellbar und vermehrbar ist, sollte dieser Ansatz zunächst zurückgestellt werden. Vorrangig sollte nach Herstellung von SeVV- Δ P untersucht werden, ob es nach Infektion mit einer solchen Mutante in der Zielzelle zu einer viralen Transkription kommt.

Bei der Herstellung von SeVV- Δ P würde der P-Leserahmen aus dem viralen Genom entfernt. Damit würden gleichzeitig die Leserahmen der sieben Nichtstrukturgene C, C', Y1, Y2, X, V und W deletiert.

2.7.2.1 Die Nichtstrukturproteine

Eine Besonderheit stellt die Gensequenz des P-Proteins dar, in der außer dem Leserahmen des P- Gens noch Open Reading Frames (ORF) für weitere Gene kodiert sind (siehe Abb. 7). Es handelt sich um die Leserahmen der sieben Nichtstrukturproteine C, C', Y1, Y2, X, V und W.

Die Verwendung verschiedener Start-Codons auf dem +1-Leserahmen begründet die Entstehung der Proteine der C-Familie. Das X-Protein besteht aus dem C-terminalen Fünftel der Aminosäuresequenz des P-Proteins. Die Proteine V und W entstehen durch den Mechanismus des „RNA-Editings“.

Würde SeVV- Δ P in der H29 Helferzelle vermehrt werden, sollten die Proteine C, C', Y1, Y2 und X durch zelluläre Expression von der Helferzelle zur Verfügung gestellt werden. Die Proteine V und W könnten aber weder viral noch zellulär exprimiert werden. Auf die Funktionen der Nichtstrukturproteine soll im Folgenden eingegangen werden.

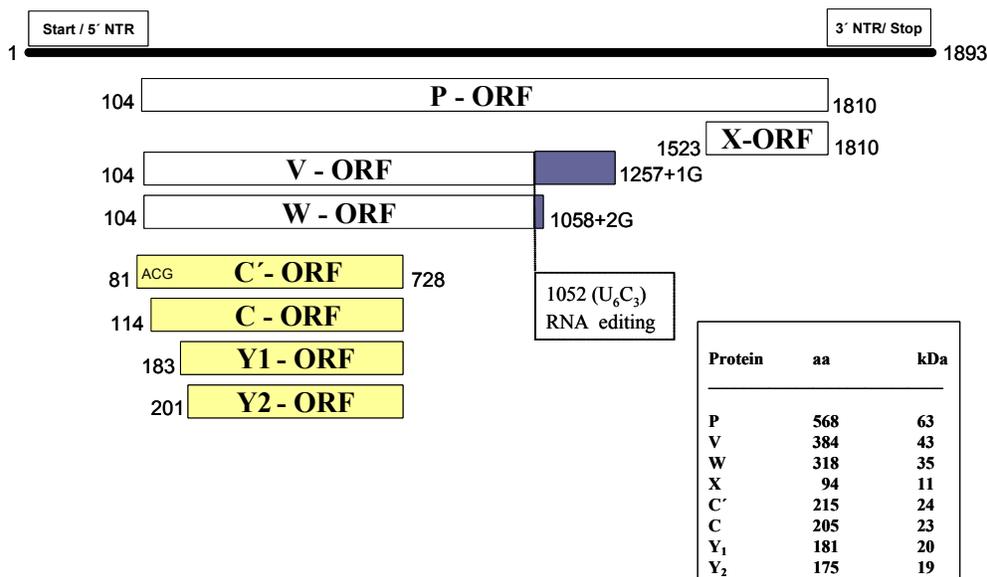


Abb. 7: Lage der multiplen Leserahmen im P-Gen.

Schematische Darstellung aller vorhandenen Leserahmen des P-Gen im RNA-Genom. Angabe aller Open Reading Frames (ORF) mit Translationsstart- und Translationsstopp-Nukleotidpositionen und der Nukleotidposition der RNA-Editingsequenz. Angabe aller resultierenden Proteine mit Aminosäuren (As) und errechnetem Molekulargewicht (kDa).

Die Proteine C, C', Y1 und Y2 werden als Nichtstrukturproteine der C-Familie zusammengefasst.

2.7.2.1.1 Die Nichtstrukturproteine der C-Familie

Die Verwendung verschiedener Start-Codons auf dem +1-Leserahmen begründet die Entstehung der Proteine der C-Familie (C, C', Y1, Y2). Durch den Gebrauch von überlappenden Leserahmen werden die Proteine der C-Familie (C', C, Y1 und Y2) kodiert (Abb. 7).

Die Translation von C' startet an Nukleotidposition 81 bezogen auf das P-Gen durch das alternative Start-Codon ACG. Dadurch bleibt das Start-Codon des P-Proteins erstes AUG im P-Gen und die Translationsrate von C' mRNA ist im Vergleich zu der von C, Y1 und Y2 abgeschwächt.

Die Translation der mRNA von C, Y1 und Y2 startet an den Positionen 114, 183 oder 201 (Gupta & Patwardhan, 1988). Alle vier C-Proteine haben auf RNA-Ebene ein gemeinsames Stopp-Codon an Position 726.

Die Proteine der C-Familie werden intrazellulär in hoher Zahl gefunden, wobei aber keine starke Assoziation mit viralen Nukleokapsiden in SeV infizierten Zellen festzustellen ist. Durch *pulse-chase*-Untersuchungen konnte den Proteinen der C-Familie *in vitro* eine inhibierende Wirkung auf die RNA Synthese zugeordnet werden (Horikami et al, 1997). Ob sich diese inhibierende Wirkung auch auf die primäre Transkription auswirkt, ist bisher nicht bekannt. Versuche mit Deletionsmutanten brachten weiterhin die Erkenntnis, dass die Familie der C-Proteine *in vitro* vor allem bei der Interferon-vermittelten Immunantwort eine Rolle spielt: Jedes der vier Nichtstruktur-Proteine C, C', Y1 und Y2 kann die Interferon-vermittelte Immunantwort im infizierten Wirtsorganismus unterdrücken (Latorre et al., 1998).

Neben der genetischen Information für die Proteine der C-Familie wird durch den P-ORF das Nichtstrukturprotein X exprimiert.

2.7.2.1.2 Das Nichtstrukturprotein X

Für die Synthese des X-Proteins von SeV wird der Leserahmen des P-Proteins benutzt. Dabei befindet sich das X-Start-Codon an Position 1523 bezogen auf das P-Gen. Das X-Protein besteht aus den 94 C-terminalen Aminosäuren des P-Proteins und trägt auf Aminosäureebene die Primärsequenz der P:RNP-Bindedomäne (Curran, 1998). Das X-Protein wurde erstmals 1988 detektiert und dessen Struktur durch NMR-Spektroskopie ermittelt (Curran & Kolakofsky, 1988). Auch die Struktur des X-Proteins der Masernviren konnte ermittelt werden (Johansson et al., 2003). Der Bereich des X-Proteins ist stark konserviert und hat im C-Terminus drei gebündelte α -Helices, diese Strukturen scheinen in allen Paramyxoviren vorhanden zu sein (Curran et al., 1995a). Bis heute konnte dem X-Protein keine spezifische Funktion zugeordnet werden.

Bei der Vermehrung von SeVV- Δ P mit Hilfe der Helferzelle H29 oder einer anderen Helferzelle, die das P-Protein exprimiert, würde das Nichtstrukturprotein X auf zellulärer Ebene kodiert werden.

Neben den Proteinen der C-Familie und dem X-Protein kodiert das P-Gen für die Nichtstrukturproteine V und W.

2.7.2.1.3 Die Nichtstrukturproteine V und W

Die Regelung der Genexpression durch paramyxovirale Polymerasen erfolgt durch cis-aktive Sequenzen. An einer bestimmten Sequenzabfolge im Genom, dem so genannten RNA-*Editing* Motiv (U₆C₃) im P-Gen, kommt es überdies zum Vorgang des RNA-*Editing*, d. h. der Insertion eines oder mehrerer Guanylate in das mRNA Transkript (Thomas et al., 1988). Hierdurch werden zwei zusätzliche mRNAs für die Synthese von Nichtstrukturproteinen bereitgestellt: Während der P-Gen Transkription inserieren SV5-Viren oder Mumpsviren 2 Guanylat-Moleküle, um so den ORF für das V-Protein zu translatieren. Das SV5 V-Protein bindet zu geringen Anteilen an das virale Nukleokapsid (Paterson et al., 1995). Masernvirus inseriert vorwiegend ein Guanylat, das humane PIV3 Virus inseriert ein bis sechs Guanylate mit statistisch gleicher Wahrscheinlichkeit. In allen Fällen führt die Insertion von Guanylat-Molekülen zum Umschalten in einen anderen Leserahmens. Durch den Mechanismus des „RNA-*Editings*“ werden auch die SeV Proteine V und W synthetisiert: Das Start-Codon für die Translation der V und W mRNA entspricht dem der P mRNA (Abb. 7). Eine bestimmte Sequenzabfolge im SeV wt Genom an Position 1052 im P-Gen (U₆ C₃) bewirkt einen Wechsel des ursprünglichen Leserahmens durch Insertion zusätzlicher Guanylate in die mRNA-Transkripte, wobei der Einschub eines Nukleotides die Synthese der mRNA des V-Proteins bewirkt. Werden zwei Nukleotide eingefügt, entsteht die mRNA des W-Proteins. Der kotranskriptionelle Einschub von einem oder mehreren Guanylaten erfolgt bei SeV nach dem Zufallsprinzip mit abnehmender Wahrscheinlichkeit, wobei ein Mengenverhältnis von synthetisierter mRNA P:V:W von 70:25:5 ermittelt werden konnte (Delenda et al., 1998). Das W-Protein besteht aus 318 Aminosäuren, nach dem Leserahmenwechsel werden zwei Aminosäuren angehängt, dann folgt das Stopp-Codon. Das V-Protein besteht aus 384 Aminosäuren, davon 68 nach der *Editing*-Stelle, wobei sich der C-Terminus durch einen hohen Anteil an Cysteinresten auszeichnet. Dieser Bereich des V-Proteins ist bei allen Paramyxoviren stark konserviert und formt ein Zinkfinger-Motiv (Huang et al., 2000).

In Funktionsanalysen durch reverse Genetik konnte gezeigt werden, dass ein rekombinantes SeV, dessen RNA-*Editing* Motiv (UUUUUCCC) durch 2 Punktmutationen (UUUCUUCC) deletiert worden war, das V- und das W-Protein nicht mehr synthetisiert, dieses rekombinante SeV wird als V(-) SeV bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass V(-) SeV in Zellkultur gegenüber dem wt Virus ein leicht verstärktes Replikationsverhalten und eine gesteigerte Genexpression aufweist, in Mäusen aber ein stark attenuiertes Replikationsverhalten mit sich bringt (Kato et al., 1997a). Es scheint also, dass das V-Protein oder das W-Protein, auch wenn sie als Nichtstrukturproteine bezeichnet werden, eine Funktion innehaben, die für die systemische Ausbreitung des Virus entscheidend ist. In einer

weiteren Studie von Kato (Kato et al., 1997b) konnte folgendes gezeigt werden: Es wurde eine weitere V-Gen-defiziente SeV Mutante hergestellt ($V_{\Delta C}$), in die ein Stopp-Codon kurz nach dem RNA-Editing Motiv eingefügt wurde, so dass das rekombinante Virus den N-terminalen Bereich des V-Proteins, der fast dem gesamten W-Protein entspricht, synthetisiert, nicht aber den C-Terminus. Die *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften des $V_{\Delta C}$ Virus wurden mit denen von V(-)SeV und rekombinantem wt SeV verglichen. Das $V_{\Delta C}$ Virus verhielt sich *in vitro* wie das SeV wt Virus, im Tiermodell konnte wie bei V(-)SeV ein attenuierter Phänotyp nachgewiesen werden. Daher konnte die infektionserhaltende Determinante des V-Proteins dem C-terminalen Bereich von V zugewiesen werden. Eine gesteigerte Genexpression der V(-) Variante wurde von Yu und Mitarbeitern in einer weiteren Studie bestätigt (Yu et al., 1997): In V(-) Viren wurde das Gen des HIV-1 Hüllproteins gp120 mit Hilfe einer zusätzlichen Transgenkassette in die 3'-Position des viralen Genom kloniert und es konnte gezeigt werden, dass gp120 in infizierten Zellen 2,7-fach stärker exprimiert wurde als durch ein rekombinantes wt SeV mit gleicher Transgenkassette an dieser Position. Auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ergaben, dass durch die Abwesenheit des V-Proteins die Transkriptionseffizienz von SeV gesteigert wird (Fukahara et al., 2002; Sakaguchi et al., 2003). Von der Synthese des P-Proteins unabhängige *In vivo*-Funktionsanalysen der Nichtstrukturproteine V und W konnten bis dato nicht durchgeführt werden, da eine Expression von V oder W unabhängig vom P-Protein nicht möglich gewesen war.

Bei der Vermehrung von SeVV- ΔP würde es weder viral, noch zellulär zur Expression des V- und W-Proteins kommen.

Im folgenden Abschnitt soll auf die dritte Komponente des Polymerase-Komplexes, das L-Protein, eingegangen und die Herstellung eines L-defizienten Vektors SeVV- ΔL diskutiert werden.

2.7.3 Das L-Protein

Das L-Protein ist mit 2228 Aminosäuren (As) das größte Protein des Polymerase-Komplexes. Für seine stabile Komplexierung muss es mit dem P-Protein interagieren, wobei letzteres die korrekte Faltung des L-Proteins unterstützt (Horikami et al., 1992). Die RNA-abhängige-RNA-Polymerase-Aktivität konnte dem L-Protein eindeutig zugewiesen werden (Horikami et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass enzymatische Aktivitäten wie die Polyadenylierung, die Methyltransferase-Funktion und die Protein-Kinaseaktivität mit der Anwesenheit des L-Proteins in Verbindung stehen.

Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen Negativstrang-RNA-Viren führten zur Identifikation von sechs konservierten Domänen (Poch et al. 1997). Die Charakterisierung von L-Mutationen in den sechs Domänen zeigte, dass mehrere Domänen gleichzeitig an den verschiedenen Reaktionen der viralen RNA-Synthese beteiligt sein müssen, da verschiedene Mutationen in unterschiedlichen

Domänen oft zum selben defektiven Phänotyp führten (Chandirka et al., 1995, Cortese et al., 2000, Feller et al., 2000)

Domäne I (As 1-350) konnte die Formation des (P:L)-Polymerase-Komplexes zugewiesen werden, welche sowohl für die Transkription als auch die Replikation essentiell ist (Holmes and Moyer, 2002 PMID: 11861877). Domäne II (As 503-607) ist durch ihre α -helikale Struktur einem RNA-Bindungsmotiv zuzuordnen und für die Template-Erkennung essentiell. Domäne III (635 – 876) und enthält ein konserviertes Motiv, welches das katalytische Zentrum bei der Nukleotid-Polymerisation darstellt (Graef, 1995). Region IV (As 927-1128) enthält ein ATPase-Motiv, welches ebenfalls für die RNA-Synthese von Bedeutung ist. Von Einberger konnte gezeigt werden, dass das gereinigte L-Protein in ATP-abhängiger Reaktion die viralen Proteine N und P phosphoryliert (Einberger et al., 1990). Die Funktion der Domäne V (As 1129-1378) ist nicht eindeutig geklärt, Domäne VI (As 1770-1847) enthält vermutlich ein Nukleotidbindungsmotiv.

Eine Deletionsmutante SeVV- Δ L musste nach initialer Herstellung mit Hilfe einer geeigneten Helferszelle amplifiziert werden. Aus vorangegangenen *in vitro*-Analysen war bekannt, dass isoliert exprimiertes L-Protein instabil ist, dagegen steigert die simultane Expression von P-Protein die Stabilität des L-Proteins durch die Bildung von stabilen P:L-Komplexen (Horikami et al., 1997). Wenn die *in vitro*-Daten auf die Anforderungen einer Helferszelle zur Vermehrung von SeVV- Δ L übertragen werden können, sollte diese, wie die Helferszelle H 29, die Proteine P und L simultan exprimieren.

Nach Infektion einer Zielzelle mit SeVV- Δ L sollte es zur primären Transkription durch die transferierten Nukleokapside kommen. Da die Synthese des L-Protein unterbunden ist, können höchstens die mit den Nukleokapsiden transferierten L-Proteine bei der Bildung einiger weniger neuer Nukleokapside zur Verfügung stehen. Somit würde sich SeVV- Δ L schnell ausverdünnen. Demnach sollte durch die Herstellung von SeVV- Δ L ebenfalls ein replikations-defizienter SeVV bereit gestellt werden können.

Nach diesen Vorüberlegungen sollten alle drei Konstrukte SeVV- Δ N, - Δ P und - Δ L das Kriterium der Replikations-Defizienz erfüllen. Eine Auswahl sollte sich dann aufgrund der folgenden Kriterien ergeben:

- 1) Initiale Herstellbarkeit im HeLa-System
- 2) Effiziente Vermehrung in einem zellulären Helfersystem (z.B. H29)
- 3) Maximale Expression kodierter Antigene in der Zielzelle

Um eine maximale Expression der kodierten Antigene zu erzielen, sollten eine oder mehrere Transkriptionskassetten (X) in den 3'-Bereich des Genoms eingebaut werden (SeV-X, SeV-X-X). Die Transkriptionskassetten sollten dabei so konzipiert werden, dass es durch die Verwendung einer

singulären Restriktionsschnittstelle auf cDNA Ebene möglich ist an dieser Position *open reading frames* (ORFs) einzusetzen. Für die vorliegenden Untersuchungen sollten zunächst ORFs von fluoreszierenden Proteinen in die viralen Vektoren eingebaut werden (SeV-eGFP, SeV-eGFP-DsRed), später sollten diese gegen ORFs der gewünschten Antigene ersetzt werden.

Im Folgenden soll auf die die Herstellung und die Vermehrung der zu etablierenden replikations-defizienten Vektoren SeVV-eGFP- Δ N, Δ P und Δ L in Zellkultur eingegangen werden.

2.8 Herstellung replikations-defizienter SeVV in Zellkultur

1995 wurde ein System etabliert, mit dem rekombinante, infektiöse SeV aus Plasmid-kodierter viraler cDNA hergestellt werden konnten (Garcin et al., 1995) und dieses System wurde in den Folgejahren entscheidend verbessert (Leyrer et al., 1998). Das Prinzip des Systems beruht auf der Transkription des viralen Genoms, sowie auf der simultanen Expression der Gene, die für den viralen Polymerase-Komplex (N, P, L) kodieren.

Die Strategie zur initialen Herstellung replikations-defizienter SeVV soll am Beispiel von SeVV-eGFP- Δ N für alle drei Vektoren verdeutlicht werden (Abb.8).

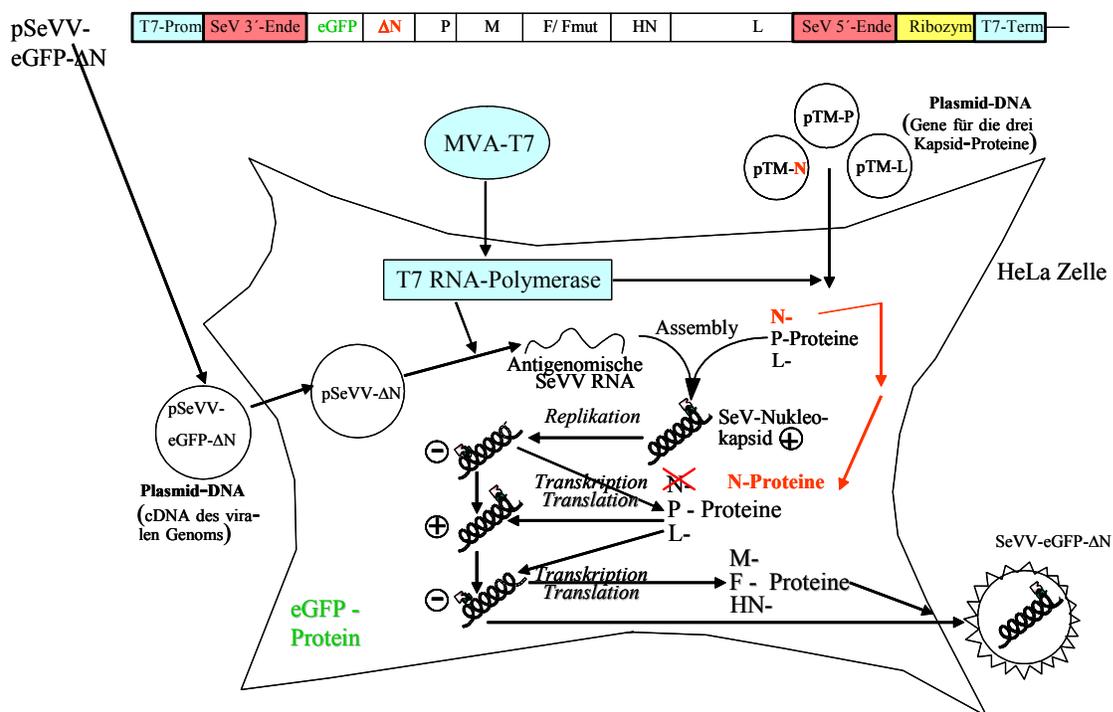


Abb. 8: Herstellung replikations-defizienter SeVV-eGFP- Δ N im MVA-T7 –System.

HeLa-Zellen werden mit der Plasmid-kodierten cDNA des N-deletierten, viralen Genoms (pSeVV-eGFP- Δ N) und den auf separaten Plasmiden kodierten SeV Genen N, P und L transfiziert (pTM -N, -P, -L), wobei die Expression des viralen Genoms sowie der Kapsid-Proteine N, P und L, unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen. Um die T7-Polymerase in den Zellen bereitzustellen, werden diese noch vor der Transfektion mit einem rekombinanten Vaccinia Virus (MVA-T7) infiziert, das für dieses Enzym kodiert. An den in die Zellen eingebrachten Plasmiden, kann die exprimierte T7-Polymerase ein virales Antigenom und die Gene N, P und L transkribieren. Das korrekte 5'-Ende der antigenomischen RNA wird dadurch hergestellt, dass die Polymerase exakt an dem ersten Nukleotid des viralen Genoms mit der Transkription beginnt. Eine genau am Ende des viralen Genoms in die cDNA eingefügte Ribozymsequenz erzeugt eine exakte virale Genomlänge, die ein Vielfaches von Sechs darstellen muss, indem sich das Ribozym autokatalytisch von der transkribierten RNA abschneidet. Nun verpackt das über pTM bereitgestellte N-Protein die virale RNA zum Nukleokapsid-Core. Nach Assoziation von P- und L-Proteinen entsteht ein funktioneller Replikationskomplex, über den minussträngige Nukleokapside hergestellt werden. An diesen kann im Anschluss die Transkription der Virus-kodierten Proteine erfolgen.

Bei der Herstellung von SeV mit vollständigem Genom kommt es neben der Synthese des N-Proteins durch pTM-N auch zur Transkription des viral kodierten N-Gens. Damit kann die Replikation des Virus selbstständig ablaufen. Bei einer initialen Herstellung von SeVV-eGFP- Δ N erfolgt aber keine virale Synthese des N-Proteins. Das N-Protein muss während des gesamten Herstellungsprozesses über das pTM-N Plasmid zur Verfügung gestellt werden. Alle weiteren Prozesse sollten analog zur Wildtyp-Situation ablaufen: Die in der HeLa-Zelle synthetisierte RNA müsste funktionell mit N-Protein verpackt werden und mit viral synthetisierten P:L-Komplexen ausgestattet werden. Mit Hilfe der ebenfalls viral kodierten Proteine M, F und HN könnten die entstandenen Nukleokapside zu vollständigen Viruspartikeln verpackt und ausgeschleust werden. Analog würde die Herstellung von SeVV-eGFP- Δ P und SeVV-eGFP- Δ L erfolgen, P-Protein müsste dabei durch pTM-P und L-Protein durch pTM-L bereitgestellt werden.

Könnten SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L in Anlehnung an das standardisierte Verfahren in Zellkultur hergestellt werden, sollte die biologische Funktionalität der viralen Vektoren durch Amplifikation mit Sendai-Virus Wildtyp überprüft werden. Die viralen Vektoren müssten anschließend mit Hilfe geeigneter Helferzellen, die die fehlenden Proteine *in trans* zur Verfügung stellen, amplifiziert werden. Für erste Versuche zur Vermehrung der Deletionsmutanten steht die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Helferzelle H29 zur Verfügung, die die SeV Proteine N, P und L stabil synthetisiert. Die Helferzelllinie H29 wurde bis jetzt nicht eingehend charakterisiert: Es sollten daher deren Eigenschaften in Zellkultur untersucht werden, etwa, wie gut sich replikations-kompetente SeV mit

Hilfe dieser Zelllinie vermehren lassen können. Die Ergebnisse der Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf die Effizienz der Vermehrbarkeit eines der replikations-defizienten SeVV zulassen.

Um im Hinblick auf die Etablierung einer Helferzelle zu untersuchen, welche der drei SeV Proteine für die Vermehrung der Deletionsmutanten SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P, - Δ L auf zellulärer Ebene bereit gestellt werden müssen, könnten die viralen Vektoren mit Hilfe rekombinanter Vaccinia Viren, die die SeV-Proteine N, P oder L synthetisieren, vermehrt werden. Gegebenenfalls sollte eine weitere Helferzelle bereitgestellt werden, damit die Produktion der viralen Vektoren verbessert werden würde.

Die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L mit Hilfe einer Helferzelllinie sollte im Bezug auf Replikationsverhalten vergleichend zum SeV Wildtyp (wt) charakterisiert werden. Anschließend musste die Fähigkeit zur Transkription in einer Zielzelle untersucht werden. Sollte SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L nach Infektion einer Zielzelle nicht in der Lage sein, eingebaute Transgene kurzzeitig zu exprimieren, musste untersucht werden, ob der Einbau verkürzter Formen des deletierten Gens zu einer Steigerung der Expressionsrate führen könnte. Bei der Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P könnte durch zusätzlichen Einbau des ORF der Nichtstrukturproteine V und W der Einfluss der Expression dieser Nichtstrukturproteine auf die virale Transkription und Replikation in H29 Zellen untersucht werden.

2.9 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines bivalenten, replikations-defizienten SeV Vektors (SeVV) als Prototyp für eine Anwendung im Bereich der Lebendimpfstoffentwicklung.

Die maximale Transkription zusätzlicher Antigene sollte durch den Einbau einer oder mehrerer Transkriptionskassette(n) im 3'-Bereich des viralen Genoms erreicht werden. Die Replikations-Defizienz sollte durch Deletion funktioneller Domänen oder ganzer Gene der für die Replikation verantwortlichen Gene N, P oder L erlangt werden. Nach der initialen Herstellung sollte die biologische Funktionalität der replikations-defizienten SeVV anhand der Vermehrung durch virale Transkomplementation mit SeV Wildtyp (wt) untersucht werden. Durch Vermehrung der Deletionsmutanten mit rekombinanten Vaccinia Viren, die die SeV Proteine N, P oder L exprimieren (VV-N, -P, -L) sollten die für eine zelluläre Transkomplementation notwendigen Proteine ermittelt werden. Für die Amplifikation durch zelluläre Transkomplementation stand bereits die Helferzelllinie H29 zur Verfügung. Falls die Helferzelle H29 keine zufrieden stellende Unterstützung der Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L erbringt, sollte eine weitere Helferzelle etabliert werden. Nach Charakterisierung des Amplifikationsverhaltens der Deletionsmutanten sollte durch Infektion von Zielzellen die Expression kodierter Transgene mittels geeigneter Testverfahren

nachgewiesen werden. Ebenso sollte mittels sensitiver Nachweisverfahren die Replikations-Defizienz des viralen Vektors in der Zielzelle bestätigt werden.

Für die Erfüllung dieser Zielvorgabe waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

- Herstellung und Charakterisierung von SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassette(n) im 3'-Bereich (SeV-eGFP; SeV-eGFP-DsRed) für die Etablierung eines replikations-defizienten SeVV mit Fähigkeit zur simultanen Expression von Antigenen heterologer Viren;
- Herstellung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L (SeVV-eGFP- Δ X) auf Basis des SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassette(n) und Verifizierung der Vermehrbarkeit durch Koinfektion von Zellen mit einer Deletionsmutante und SeV wt;
- Identifikation der für die zelluläre Transkomplementation notwendigen Proteine durch Verifizierung der Vermehrbarkeit der Deletionsmutanten mittels Koinfektion von Zellen mit einer Deletionsmutante und SeV N-, P- oder L-Protein exprimierenden rekombinanten Vaccinia Viren (VV-N, -P, -L);
- Untersuchung der Amplifikationsfähigkeit von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L durch die etablierte, stabil SeV N-, P- und L-Protein exprimierende Helferzelllinie H29;
- Gegebenenfalls Herstellung einer weiteren Helferzelllinie zur Optimierung der Produktion des replikations-defizienten SeV Vektors;
- Charakterisierung des Replikationsverhaltens in dem zur Verfügung stehenden zellulären Transkomplementationssystemen;
- Überprüfung und Charakterisierung der Transgenexpression in SeVV-eGFP- Δ X infizierten Zielzellen;
- Gegebenenfalls Optimierung der Transgenexpression durch rekombinanten Einbau verkürzter Formen des deletierten Gens;
- Bestätigung der Replikations-Defizienz des SeVV in der Zielzelle.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines Vakzine-Prototypen auf Basis replikations-defizienter Sendai-Viren. Der virale Vektor sollte nach Infektion von Zellen in der Lage sein, Antigene beliebiger Virustypen effizient zu exprimieren.

Um die gewünschte hohe Expression von Antigenen in der Zelle zu erzielen, sollten als Vorarbeit replikations-kompetente Sendai-Viren (SeV) mit einer bzw. zwei zusätzlichen Transkriptionskassetten im 3'-Bereich des Genoms nach dem viralen Promotor bereitgestellt werden. Die Transkriptionskassetten wurden dabei so konzipiert, dass der Einbau beliebiger offener Leserahmen im späteren Verlauf durch singuläre Klonierung möglich sein wird. In die Transkriptionskassetten sollten für die vorliegenden Untersuchungen zunächst Leserahmen von Genen fluoreszierenden Proteinen eingefügt, um die Vermehrung solcher SeV schnell und einfach mit Hilfe des Mikroskops detektieren zu können.

Für spätere Anwendungen im medizinischen Bereich sollten in diese Transkriptionskassetten spezifische Antigene eingebracht werden: Durch den Einbau zweier Antigene in die Transkriptionskassetten können durch den viralen Vektor zwei heterologe Antigene exprimiert werden, durch den Einbau eines Antigens in beide Transkriptionskassetten könnte bei Bedarf die Effizienz der Expression eines Antigens verstärkt werden. Die Gene für die beiden SeV Oberflächenproteine F und HN sollten in späteren Arbeiten gegen entsprechende Gene eines impf-relevanten Virus ausgetauscht werden.

SeV mit einem vollständigen Genom und einer oder zwei zusätzlicher Transkriptionskassette(n) im 3'-Bereich sollten zunächst rekombinant in Zellkultur hergestellt werden und die Auswirkungen des Einbaus dieser Transkriptionskassetten auf die Effizienz der Herstellbarkeit und des Replikationsverhaltens der Viren charakterisiert werden. Da bei gleichzeitiger Replikations-Defizienz der Vektoren eine möglichst hohe Transgenexpression, aber auch eine effiziente Herstellbarkeit und eine gute Vermehrbarkeit gefordert wurde, sollte durch diese Charakterisierungen entschieden werden, ob SeV mit einer Transkriptionskassette oder mit zwei Transkriptionskassetten als Basis für die Etablierung des replikations-defizienten SeVV dienen sollte.

Der wesentliche Sicherheitsaspekt der viralen Vektoren, die Replikations-Defizienz, sollte durch Deletion der Gene N, P oder L des Polymerase-Komplexes erreicht werden (SeVV- Δ N, Δ P, Δ L). Aus den Plasmid-kodierten cDNA Konstrukten sollten in Zellkultur replikations-defiziente Vektoren hergestellt werden und diese nach initialer Herstellung in Zellkultur zunächst durch homologe Transkomplementation mit SeV wt vermehrt werden und somit auf ihre biologische Intaktheit überprüft werden.

Für die Vermehrung von SeVV- Δ N, - Δ P oder - Δ L durch zelluläre Transkomplementation sollte zunächst eine die SeV Proteine N, P und L stabil exprimierende Helferzelllinie namens H29 verwendet werden. Gegebenenfalls sollte eine weitere Helferzelle etabliert werden, da die Helferzelle H29 noch nicht für vergleichbare Arbeiten eingesetzt worden war. Bei erfolgreicher Amplifikation einer oder mehrerer der Deletionsmutanten mit Hilfe der Helferzelllinie H29 sollte die Expression der eingebauten Transgene nach Infektion einer Nicht-Helferzelle (= Zielzelle) untersucht werden. Falls die durch den replikations-defizienten, viralen Vektor hervorgerufene Expression in der Zielzelle nicht ausreichend sein sollte, sollte untersucht werden, ob eventuell der Einbau funktioneller Domänen des deletierten Gens eine Verbesserung der Transgenexpression in der Zielzelle erbringen könnte.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Plasmid-kodierten cDNA Konstrukte wurden neben der Wildtyp (wt) Version pSeV(V)_F auch in der Variante pSeV(V)_{Fmut} hergestellt, um bei der späteren Erzeugung und Vermehrung in Zellkultur durch den Verzicht von Acetyl-Trypsin (AcT) zur Aktivierung des F-Proteins die Kultivierung von Zellen in FKS-haltigem Medium zu ermöglichen. Alle replikations-kompetenten Sendai-Viren werden als SeV abgekürzt, alle replikations-defizienten Mutanten als SeV Vektoren (SeVV).

Um eine maximale Expression des zusätzlichen Transgens mit den geplanten replikations-defizienten viralen Vektor später erreichen zu können, sollten zunächst verschiedene replikations-kompetente SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten im 3'-Bereich des Genoms hergestellt und charakterisiert werden.

Im Nachfolgenden soll die Herstellung dieser SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten vorgestellt werden.

3.1 SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten

Der Einbau von Transkriptionskassetten in den 3'-Bereich des viralen SeV Genoms diene als Vorarbeit für die Konzipierung der replikations-defizienten Vektoren SeVV. Es sollten eine und zwei Transkriptionskassetten in den 3'-Bereich der cDNA-Konstrukte von SeV integriert werden. Die Transkriptionskassetten sollten so konzipiert werden, dass ein unkompliziertes Auswechseln von kodierenden Leserahmen möglich ist. Für die geplanten Untersuchungen sollten zur einfachen Detektion der Viren in infizierten Zellen Gene von fluoreszierenden Proteinen in die Transkriptionskassetten integriert werden. In den replikations-defizienten Vektoren sollten diese zusätzlichen Transkriptionskassetten später dazu dienen, zwei Antigene von impf-relevanten Viren zu kodieren (Multivalenz) oder aber durch Einbau eines zusätzlichen Antigens in beide Transkriptionskassetten dieses mit maximaler Effizienz zu exprimieren.

In einer 2002 veröffentlichten Studie wurde bereits die Herstellung und Vermehrung rekombinanter SeV beschrieben, welche neben den sechs viralen Genen mit einer zusätzlichen Transkriptionskassette im 3'-proximalen Bereich ausgestattet sind. Vergleichende Untersuchungen zur Expressionsstärke eines Reportergens zeigten, dass es durch dessen Integration an Position 1 nach der *leader*-Sequenz zur höchstmöglichen Synthese des Reporterproteins kommt. Neben der optimalen Transgenexpression wurde bei diesen SeV-Mutanten eine verlangsamte Replikation beobachtet. Diese verlangsamte Replikation wird mit einer Verschiebung des natürlichen Transkriptionsgradienten der viralen Gene durch den Einbau eines Gens an Position 1 in Zusammenhang gebracht (Tokusumi et al., 2002).

Da in unserer Arbeitsgruppe bis dato kein cDNA-Konstrukt mit einer zusätzlichen Transkriptionskassette im 3'-Bereich zur Verfügung stand, sollte ein solches SeV Konstrukt mit nur einer singulären Transkriptionskassette hergestellt werden. Zum anderen sollte untersucht werden, wie sich der Einbau einer zweiten Transkriptionskassetten im 3'-Bereich auf die Genexpression auswirkt und ob sich die Effizienz der initialen Herstellung und der Replikation der Virusmutanten verändert. Hierfür gab es in der Literatur noch keine Vorgaben.

Eine Transkriptionseinheit besteht bei SeV aus der Genstartsequenz, dem 5'- nicht translatierten Bereich (5'-NTR), einer Restriktionsschnittstelle, in die der ORF (*open reading frame*) eines Transgens eingebaut werden kann, dem 3'-nicht translatierten Bereich (3'-NTR) und der Genstoppsequenz.

Zunächst sollten eine (pSeV-X) oder zwei (pSeV-X-X) Transkriptionseinheiten als nicht-kodierende, d.h. leere Kassetten (X) in den 3'-Bereich der Plasmid-kodierten SeV cDNA eingebaut werden. Anschließend sollten in die nicht-kodierenden Transkriptionskassetten die Leserahmen der Gene von fluoreszierenden Proteinen eingefügt werden (pSeV-eGFP, pSeV-eGFP-DsRed) mit deren Hilfe die Herstellbarkeit, Vermehrung und Genexpression der rekombinanten Viren verfolgt werden kann. Für später geplante Anwendungen im medizinischen Bereich können durch die singulären Restriktionsschnittstellen in die Transkriptionskassetten leicht kodierende Sequenzen viraler Antigene eingesetzt werden.

Zunächst soll die Klonierung der genomischen cDNA von rekombinanter SeV mit nur einer Transkriptionskassette im 3'-Bereich erläutert werden.

3.1.1 Herstellung des cDNA Konstruktes pSeV-X

Die Integration einer kodierenden Transkriptionskassette im 3'-Bereich von SeV führt laut Veröffentlichungen zu einer maximalen Expression eingebauter Repotergene (Hasan et al., 1997; Tokusumi et al., 2002). Um ein entsprechendes cDNA-Konstrukt auf Basis des in unserem Labor

verwendeten SeV Stammes Fushimi (F) zur Verfügung zu stellen, sollte die Integration einer entsprechenden Transkriptionskassette in die cDNA von SeV durchgeführt werden.

Ausgehend von der als Template verwendeten cDNA pSeV wurden zwei PCR-Fragmente PCR X I und PCR X II für die Herstellung von pSeV-X bereitgestellt (Abb. 9).

PCR X I (370 bp) besteht aus der Sequenz des T7-Promotors (T7-Prom.), der *leader* (ld)-Sequenz, dem N-Genstart mit 5'-NTR bis vor das Start-Codon des N-ORF (Open Reading Frame). Über den *reverse*-Primer der X I (+) wurden eine singuläre *Not I*-Restriktionsschnittstelle und 24 Nukleotide der N-Genstoppsequenz angefügt (siehe rote Markierung). Die 24 Nukleotide der N-Genstoppsequenz von PCR X I, eingefügt durch den mutagenen Primer X I (+) dienen im darauf folgenden Fusionsschritt als der mit PCR X II überlappende Bereich.

PCR X II (970 bp) besteht aus der Sequenz des N-Genstarts und des ersten Drittel des N-ORF. Über den *forward*-Primer der PCR X II wurde die Sequenz der 3'-NTR-N und die Genstopp-Sequenz von N, wie auch die intergene Region (IR) angefügt (siehe rote Markierung). PCR X I war im 3'-Bereich komplementär zum 5'-Bereich von PCR X II. Durch diesen überlappenden Bereich (rote Markierung) konnten die beiden PCR-Fragmente X I und X II fusioniert werden. Nach erfolgter PCR konnte das Fusions-Produkt (1310 bp) durch Restriktionsspaltung mit den Enzymen *Mlu I* und *Sph I* in den ebenfalls mit *Mlu I* und *Sph I* behandelten Vektor pSeV eingefügt werden. Aus den erhaltenen Klonen wurde durch Plasmid-Mini-Präparation Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf die korrekte Insertion der Transkriptionskassette überprüft. Es stand somit das cDNA Konstrukt pSeV-X zur Verfügung.

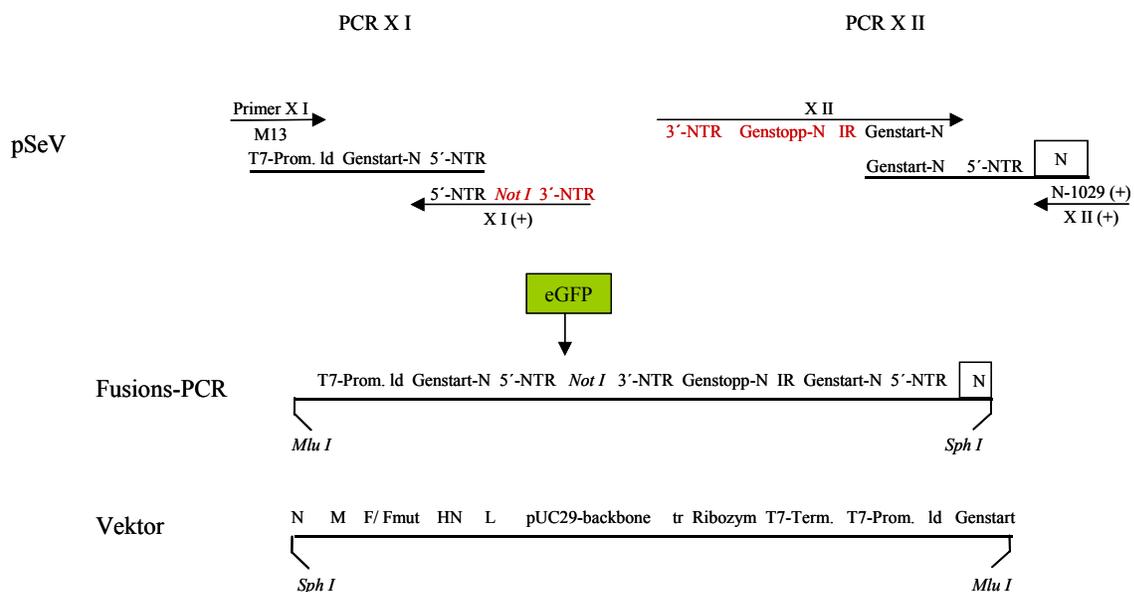


Abb. 9: Einführung einer Transkriptionskassette in den 3'-Bereich des SeV Genoms.

Um die Erzeugung von rekombinanten Viren leicht verfolgen zu können, wurde nun das Gen für das Fluoreszenzprotein *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) in die leere Kassetten von pSeV-X eingefügt. Der eGFP-ORF wurde durch PCR-Reaktion aus dem Expressionsplasmid pcDNA3-eGFP amplifiziert, wobei durch mutagene Primer die Einhaltung der „*rule of six*“ und das Anfügen von zwei *Not I*-Schnittstellen erreicht wurde. Das entstandene 720 bp große PCR-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *Not I* gespalten und ein 702 bp großes Fragment durch Gelelektion isoliert, das über die *Not I*-Schnittstelle von pSeV-X in die freie Transkriptionskassette pSeV-X eingesetzt wurde. Nach Transformation von *E.coli*, Plasmid-Präparation und anschließender Sequenzierung des über PCR eingefügten eGFP-Leserahmens stand das cDNA Konstrukt pSeV-eGFP zur Verfügung.

Neben der Integration einer einzelnen Transkriptionskassette an 3'-Position des SeV Genoms, sollte eine weitere Kassetten an dieser Position eingebracht werden. Im Hinblick auf die Verwendung replikations-defizienter SeV Vektoren im Vakzinierungsbereich sollte dadurch entweder die Expression eines weiteren Antigens ermöglicht werden oder aber die Expression eines zusätzlichen Antigens bei Bedarf weiter gesteigert werden. Dazu wurde neben dem Konstrukt pSeV-eGFP (pSeV-X) die genomische cDNA pSeV-X-X hergestellt, in welche zwei Transgene eingebaut werden können.

3.1.2 Herstellung des cDNA-Konstruktes pSeV-X-X

Durch das Konstrukt pSeV-X-X sollten zwei zusätzliche Transkriptionskassetten zur Verfügung gestellt werden. Die Verwendung von pSeV-X-X als Basisvektor für die Herstellung der replikations-defizienten Vektoren sollte es ermöglichen, den Vektor mit trivalenten Eigenschaften auszustatten. pSeV-X-X wurde über eine PCR-Reaktion hergestellt, bei der pSeV-X als Template diente (Abb. 10). Der Primer *XX-forward* hybridisiert mit pSeV-X im Bereich der *Not I*-Schnittstelle und dem 3'-NTR der zu integrierenden, zweiten Transkriptionskassette. Eine singuläre *SgrA I*-Restriktionsschnittstelle wurde mit Hilfe des *XX-forward* Primers zwischen der *Not I*-Schnittstelle und dem 3'-NTR eingeführt. Sie dient als singuläre Restriktionsschnittstelle für die spätere Insertion des ORFs eines Transgens. Im PCR-Produkt XX folgen Genstopp, intergene Region (IR), Genstart und 5'-NTR. Durch den Primer *XX (+)*, der mit dem 5'-NTR hybridisiert, wurden die singulären Restriktionsschnittstellen *Fse I* und *Nru I* eingefügt. Die *Fse I*-Schnittstelle dient dem Einbau des ORFs eines zweiten Transgens. Die singuläre *Nru I*-Schnittstelle wurde vorausschauend einkloniert, um bei Bedarf eine dritte Transkriptionskassette integrieren zu können. Der Primer *XX (+)* hybridisiert im 3'-Bereich mit der Sequenz der *Not I*-Schnittstelle von pSeV-X. Das PCR-Produkt XX (220 bp) wurde mit dem Restriktionsenzym *Not I* behandelt und ein Fragment von 205 bp durch Gelelektion isoliert. Dieses Fragment, konzipiert unter Einhaltung der „*rule of six*“, konnte dann in das ebenfalls mit *Not I*-

behandelte Plasmid pSeV-X eingebaut werden. Nach Überprüfung der korrekten Orientierung des *Not I* PCR-Fragments XX und Verifizierung der Sequenz stand das Plasmid pSeV-X-X bereit. In die singulären Schnittstellen *SgrA I* und *Fse I* können beliebige Transgene integriert werden.

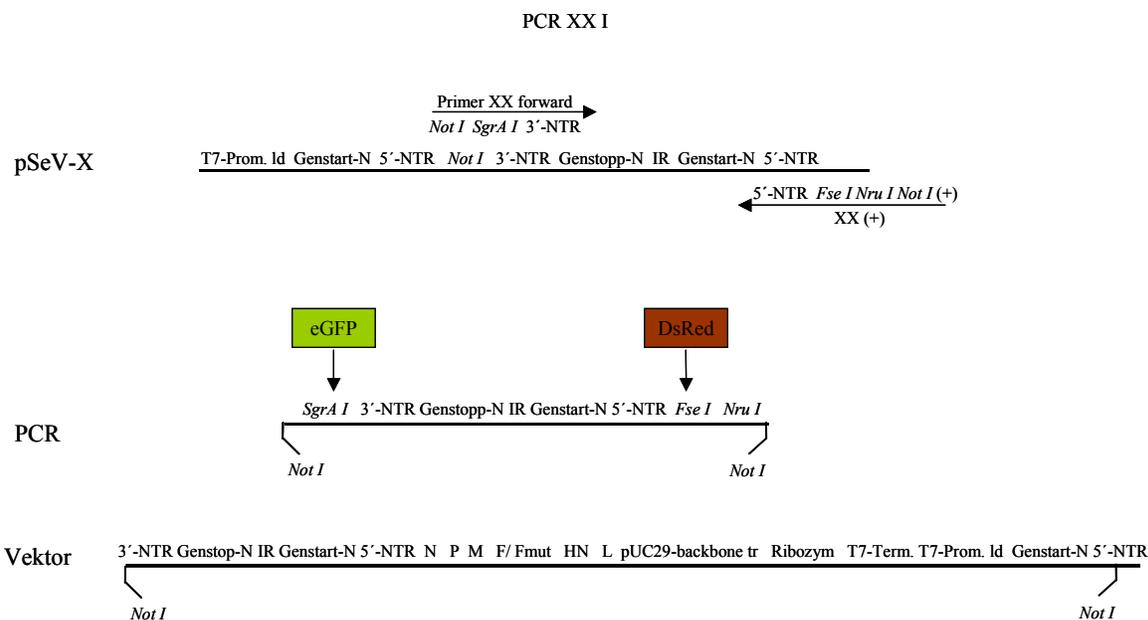


Abb. 10: Einführung von zwei Transkriptionskassetten in den 3'-Bereich des SeV Genoms.

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die beiden Transkriptionskassetten (X) von pSeV-X-X mit Leserahmen von zwei verschiedenen fluoreszierenden Proteinen versehen. Zum einen wurde der Leserahmen für das fluoreszierende Protein eGFP aus dem Expressionsplasmid pcDNA3-eGFP durch PCR-Reaktion unter Einhaltung der „rule of six“ amplifiziert, wobei mit Hilfe mutagener Primer zwei *SgrA I*-Schnittstellen angefügt wurden. Nach Restriktionsspaltung mit *SgrA I* und Gelelektion konnte das etwa 0,7 kb große Fragment in die erste Transkriptionskassette von pSeV-X-X eingebaut werden (pSeV-eGFP-X). Auf gleiche Weise wurde zum anderen der ORF des fluoreszierenden Proteins DsRed unter Einhaltung der „rule of six“ über PCR-Reaktion mit den Restriktionsschnittstellen von *Fse I* versehen, die DNA gespalten, gelelekt und dieses eluierte Fragment anschließend in die zweite Transkriptionskassette im 3'-Bereich von pSeV-eGFP-X inkloniert. Es entstand das genomische SeV cDNA Konstrukt pSeV-eGFP-DsRed.

Durch die Herstellung der Plasmid-DNA Konstrukte pSeV-eGFP und pSeV-eGFP-DsRed standen SeV cDNA Konstrukte mit einer oder zwei kodierenden Transkriptionskassette(n) im 3'-Bereich zur Verfügung.

Aus den genomischen cDNA Konstrukten pSeV-eGFP und pSeV-eGFP-DsRed sollten nun in Zellkultur rekombinante SeV hergestellt werden. In einer nachfolgenden Charakterisierung sollte die

Effizienz der Herstellbarkeit und des Replikationsverhalten dieser SeV mit einer oder zwei zusätzlichen Transkriptionskassetten überprüft werden und diese Ergebnisse sollten in die Überlegungen zur Konzeption des replikations-defizienten viralen Vektors einbezogen werden.

3.1.3 Charakterisierung von SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten

Um die Auswirkungen von kodierenden Transkriptionskassetten im 3'-Bereich des viralen SeV Genoms auf die initiale Herstellung und die Vermehrung der Viren untersuchen zu können, sollten aus den cDNA Konstrukten pSeV-eGFP und pSeV-eGFP-DsRed in Zellkultur rekombinante SeV hergestellt werden. Als Kontrolle diente ein rekombinant hergestelltes SeV Wildtyp (SeV wt).

Zunächst sollte analysiert werden, wie viele SeV-eGFP bzw. SeV-eGFP-DsRed bei der initialen Herstellung aus HeLa-Zellen freigesetzt werden, um daraus abzuleiten, inwieweit die Verlängerung des Genoms und der Eingriff in den natürlichen Transkriptionsgradienten die Effizienz der Virusherstellung beeinflusst.

Weiterhin sollte die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Produktion von Nachkommenviren in infizierten Zellen (Kinetik) darüber Aufschluss geben, ob der Einbau von einer oder zwei kodierenden Transkriptionskassetten die Amplifikation der Viren behindert.

Diese Ergebnisse sollten in die Konzeption der geplanten replikations-defizienten viralen Vektoren einbezogen werden, bei welchen zum einen eine möglichst hohe Expression weiterer Antigene gewünscht ist, zum anderen die spätere Herstellung der replikations-defizienten Vektoren mit optimaler Effizienz ablaufen soll.

Zunächst sollten die Sendai-Viren SeV-eGFP und SeV-eGFP-DsRed zusammen mit dem Kontrollvirus SeV wt rekombinant in Zellkultur hergestellt werden.

3.1.3.1 Initiale Herstellung von SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten

Die Effizienz des Systems zur Herstellung rekombinanter SeV hängt unter anderem von der Genomgröße und dem Genomaufbau der eingesetzten SeV cDNA ab: Die im rescue-System aus cDNA hergestellte virale RNA, welche das SeV Antigenom kodiert, muss mit SeV N-Protein verpackt werden, welches initial über die Expression von pTM-N zur Verfügung steht. Je länger der synthetisierte, antigenomische RNA-Strang ist, desto mehr N-Protein wird für dessen Verpackung benötigt. Zusätzlich müssen P:L-Komplexe, ebenfalls initial über die Expression aus pTM-P und pTM-L synthetisiert, an den korrekt mit N-Protein verpackten antigenomischen RNA-Strang binden. Erst dann kann die Synthese von genomischen Nukleokapsiden erfolgen, welche in der HeLa-Zelle zur viralen Transkription und weiterhin Replikation fähig sind.

Der Einbau weiterer Transkriptionskassetten im 3'-Bereich des viralen SeV Genoms sollte zur Folge haben, dass der natürliche Transkriptionsgradient verschoben wird, so dass die viralen, vom 3'-Bereich weiter entfernt liegenden Gene schwächer exprimiert werden als bei rekombinanten Wildtyp (wt) Viren. Daher könnte es zu einer reduzierten Produktion von initial hergestellten SeV kommen und auch deren weitere Amplifikation könnte negativ beeinflusst werden.

Die initiale Herstellung (rescue) von SeV-eGFP, SeV-eGFP-DsRed und rekombinantem SeV wt wurde nach Standardprotokollangaben, wie unter 0 beschrieben, in HeLa-Zellen durchgeführt. Jede SeV Variante wurde in drei parallelen Ansätzen hergestellt und bei der Bestimmung initial hergestellter SeV der Mittelwert der drei Ansätze verwendet, um eine möglichst präzise Aussage über die Anzahl an Initialviren zu erhalten. SeV-eGFP bzw. SeV-eGFP-DsRed infizierte Zellen hätten über die sichtbare Fluoreszenz detektiert werden können. Da aber ein Abgleich mit dem SeV wt Virus vorgenommen werden sollte, diente die Fluoreszenz nur als sekundäres Nachweissystem, primär wurde der Hämadsorptionstest (HAD-Test) verwendet, um initial hergestellte Viruspartikel mittels infizierter und damit Erythrozyten-bindender Zellen zu identifizieren (5.2.2.5).

HeLa-Zellen mit einem 80% konfluenten Zellrasen (8×10^5 Zellen pro 6-well-Kulturschale) wurden mit dem Vaccinia Virus MVA-T7 mit einer MOI von 10 infiziert. Nach einer einstündigen Adsorptionsphase wurden die Zellen mit den genomischen cDNA-Konstrukten pSeV-eGFP, pSeV-eGFP-DsRed und pSeV wt und mit standardisierten Mengen an Expressionsplasmiden für die N-, P- und L-Proteine transfiziert (siehe 0). Für die Transfektion wurde das Reagenz LipofectACE verwendet. Die Zellen wurden 16-18 h in 1 ml OptiMEM und anschließend in 1 ml DMEM ohne FKS weitere 30 h bei 33 °C inkubiert. Nun wurden die initialen Überstände (1 ml), in denen sich rekombinant hergestellte Viruspartikel befinden sollten, für die Passage 1 auf Verozellen gegeben. Nach einer einstündigen Adsorption bei 33 °C erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM + 10 % FKS. Die Ansätze wurden 48 h inkubiert. Durch den HAD-Test konnte die Anzahl initial hergestellter Viruspartikel durch infizierte und damit HAD-positive Zellen ermittelt werden. Die über den HAD-Test ermittelte Anzahl initial hergestellter Viruspartikel ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Zusätzlich sind die Genomgrößen der hergestellten SeV in Nukleotiden (nt) angegeben.

Tabelle 1: Anzahl initial hergestellter Viruspartikel und Genomgröße der SeV Mutanten.

SeV	hergestellter Viruspartikel (*)	Genomgröße (nt §)
SeV Wildtyp (wt)	1800	15 384
SeV-eGFP	1330	16 242
SeV-eGFP-DsRed	190	17 082

§ nt: Nukleotide / * : über HAD-Test bestimmt

In 8×10^5 infizierten und transfizierten HeLa-Zellen werden $1,8 \times 10^3$ SeV Wildtyp Viren hergestellt (Tab. 1). Dieser Wert entspricht sehr gut der Zahl von $1,5 \times 10^3$ initial hergestellten Viren, die unter optimalen Bedingungen in unserer Arbeitsgruppe erreicht wird (Leyrer, 1998).

Aus der gleichen Anzahl infizierter und transfizierter HeLa-Zellen können durchschnittlich $1,33 \times 10^3$ SeV-eGFP gewonnen werden; bei SeV-eGFP-DsRed dagegen sinkt die Zahl freigesetzter SeV auf $1,9 \times 10^2$ Viren ab.

Der Einbau von nur einer zusätzlichen kodierenden Transkriptionskassette im 3'-Bereich (SeV-eGFP) wirkt sich, verglichen mit SeV wt, kaum auf die Anzahl initial hergestellter Viruspartikel aus; die Effizienz der Herstellung von SeV-eGFP sinkt im Vergleich zu SeV wt nur auf 75 % ab.

Die Integration einer zweiten, kodierenden Transkriptionskassette führt bei SeV-eGFP-DsRed dagegen zu einer deutlichen Abnahme der Effizienz der initialen Herstellung. Im Vergleich zu SeV wt ($1,8 \times 10^3$ Viruspartikel) konnten von SeV-eGFP-DsRed nur $1,9 \times 10^2$ Viren hergestellt werden. Das entspricht einer Verminderung an initial hergestellten Viren auf 10 %.

Die Untersuchungen zeigen, dass primär der Einbau einer zweiten kodierenden Transkriptionskassetten im 3'-Bereich von SeV die Effizienz der Herstellung rekombinanter Viren beeinflusst: Der Einbau einer zweiten Kassette in SeV bringt eine Reduktion um 90 % mit sich. Diese Reduktion der Effizienz der Initialherstellung der rekombinanten Viren kann zwei Ursachen haben: Entweder führt die Länge der Fremdgeninsertion zu einer Verschlechterung des Systems oder aber die zwei kodierenden Transkriptionskassetten beeinflussen den viralen Transkriptionsgradienten erheblich, führen zu einer verminderten Expression der Virusgene und demzufolge zu einer verminderten Ausschleusung von SeV-eGFP-DsRed. Beiden Argumentationslinien sollen im Diskussionsteil eingehend erläutert werden (4.1).

Neben der initialen Herstellbarkeit von SeV-eGFP und SeV-eGFP-DsRed mussten aber auch deren Replikationseigenschaften untersucht werden, um zu überprüfen, ob sich die bei SeV-eGFP-DsRed beobachtete erschwerte Herstellung auch bei der Replikation fortsetzt.

3.1.3.2 Kinetik der Vermehrung von SeV mit zusätzlichen Transkriptionskassetten

Kinetische Untersuchungen zum Replikationsverhalten von SeV-eGFP und SeV-eGFP-DsRed sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit der Einbau von ein oder zwei weiteren Transgenen das virale Replikationsverhalten beeinflusst. Für die später geplante Herstellung von replikations-defizienten SeV Vektoren sollten maximale Transgenexpression und gute Replikations-Effizienz kombiniert werden. Auch für diese Untersuchungen wurde als Positivkontrolle das rekombinant hergestellte SeV wt Virus herangezogen.

Nach ihrer initialen Herstellung sollten die rekombinanten SeV-eGFP und SeV-eGFP-DsRed nun in ihrem Replikationsverhalten analysiert werden. Hierfür wurden die Viren zunächst auf Verozellen passagiert (5.2.2.3). Verozellen eignen sich für die Amplifikation von SeV besonders, da sie sich gut infizieren lassen und eine hohe Anzahl an Nachkommenviren freisetzen. Es wurden fünf aufeinander folgende Viruspassagen durchgeführt, die letzte, präparative Passage erfolgte in T75-Zellkulturflaschen mit etwa 2×10^7 Verozellen, um eine große Ausbeute der verschiedenen SeV für den Einsatz in nachfolgenden Versuchen zu erhalten. Alle abgenommenen Überstände wurden für die Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit FKS versetzt und in Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Für die Bestimmung der Virusreplikation wurden in 12-Loch-Zellkulturschalen 5×10^5 Verozellen jeweils mit Überständen von SeV-eGFP, SeV-eGFP-DsRed und SeV wt mit einer MOI von 3 infiziert. Nach einer einstündigen Adsorptionsphase wurden die Zellen gewaschen und anschließend in 1ml DMEM mit 10 % FKS bei $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Überstände der Zellkulturen wurden durch den KID-Test für 5 Tage in 24 h Abständen auf die Produktion von Nachkommenviren untersucht. Die Bestimmung der Virusvermehrung erfolgte mit jedem Aliquot in zwei parallelen KID-Testreihen (5.2.2.6), um eine möglichst zuverlässige Titerbestimmung zu erhalten. Aus diesen Ergebnissen konnte die Vermehrungsgeschwindigkeit der einzelnen SeV-Varianten bestimmt werden.

Die Ergebnisse der KID-Testreihen sind in Abb. 11 grafisch so dargestellt, dass der zeitliche Verlauf der Produktion von Nachkommenviren in 24 h Intervallen gezeigt wird.

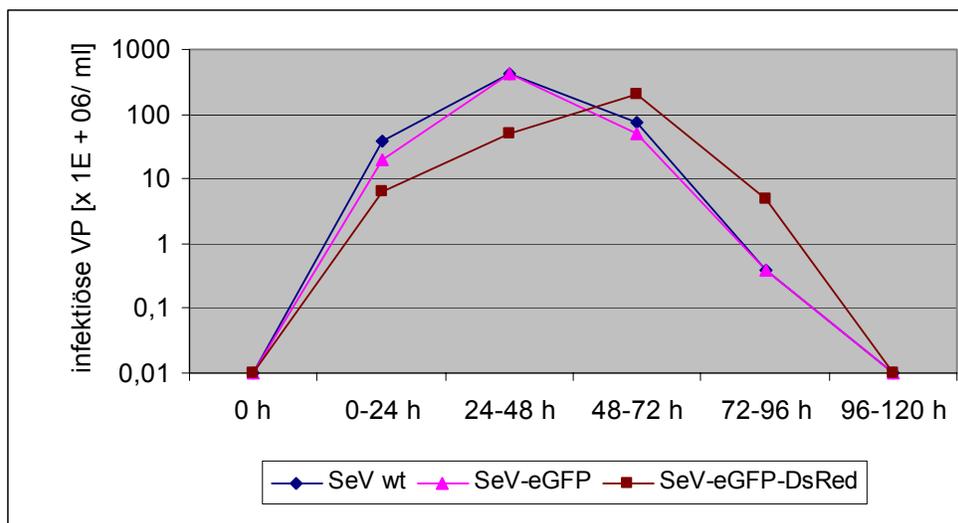


Abb. 11: Produktion infektiöser Nachkommenviren verschiedener SeV-Varianten in Verozellen.

5×10^5 Verozellen wurden mit einer MOI von 3 infiziert. Über einen Zeitraum von 120 h wurden die Zellkulturüberstände im Abstand von 24 h mittels KID-Test auf freigesetzte Viren untersucht. Die Menge an Nachkommenviren ist als infektiöse Viruspartikel pro ml angegeben.

Die Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Freisetzung infektiöser Viruspartikel (Abb. 11) aus infizierten Verozellen ergaben Unterschiede bei der Anzahl produzierter Nachkommenviren und im zeitlichen Verlauf der Replikation: SeV wt und SeV-eGFP zeigten einen ähnlichen zeitlichen Verlauf mit einem Maximum der Virusproduktion im Zeitraum von 24 – 48 h und anschließender Abnahme der Virusproduktion bei 72 – 96 h. 96 – 120 h wurde nur noch eine vernachlässigbare Menge an SeV wt und SeV-eGFP aus infizierten Verozellen freigesetzt. Die Gesamtzahl produzierter rekombinanter SeV erwies sich für SeV-eGFP mit 480×10^6 Partikeln im Vergleich zu SeV wt mit 525×10^6 Partikeln mit über 91 % als sehr effizient. Der Einbau eines Transgens von etwa 0,7 kb im 3'-Bereich des Genoms führt demnach zu keiner Abnahme der Effizienz der viralen Replikation.

Anders verhält es sich bei SeV-eGFP-DsRed: Im Vergleich zu SeV-eGFP und SeV wt zeigt sich bei SeV-eGFP-DsRed eine deutliche zeitliche Verzögerung der Nachkommenproduktion. Die Virusproduktion in SeV-eGFP-DsRed infizierten Zellen ist im Zeitraum von 0 bis 48 h im Vergleich zu SeV wt verlangsamt und erreicht ihren Maximalwert erst im Zeitfenster von 48 – 72 h. Die Virusproduktion im Zeitraum von 72 – 96 h ist dann im Vergleich zu SeV-eGFP effizienter, geht nach einer 120-stündigen Inkubation aber ebenso wie die beiden anderen rekombinanten SeV gegen Null. Die Gesamtzahl an produzierten Viren liegt für SeV-eGFP-DsRed mit 267×10^6 bei knapp über der Hälfte im Vergleich zu SeV wt.

Durch die Analyse der Virusfreisetzung aus Verozellen, die mit SeV-eGFP oder SeV-eGFP-DsRed infiziert worden waren, kann festgestellt werden, dass der Einbau einer zweiten Transgenkassette (SeV-eGFP-DsRed) und damit einer Fremdgeninsertion von etwa 1,6 kb im Vergleich zu einer Transgenkassette (SeV-eGFP) mit 0,7 kb eine ineffizientere und verlangsamte Virusproduktion mit sich bringt.

Die aus den unter 3.1.3.1 und 3.1.3.2 beschriebenen Untersuchungen resultierenden Schlussfolgerungen für die Konzipierung von replikations-defizienten, transkriptionsfähigen viralen Vektoren sollen zusammenfassend unter Punkt 3.1.4 erörtert werden.

3.1.4 Basisvektor zur Herstellung der replikations-defizienten SeV Vektoren

Als Basisvektor für die Herstellung von replikations-defizienten SeV Vektoren (SeVV) standen nun die Konstrukte pSeV-eGFP (pSeV-X), mit einer zusätzlichen Transkriptionskassette, und pSeV-eGFP-DsRed (pSeV-X-X), mit zwei zusätzlichen Transkriptionskassetten, zur Verfügung. Beide Virusvarianten sind initial herstellbar und vermehrbar. Würde pSeV-X als Basiskonstrukt für die Herstellung der replikations-defizienten SeVV gewählt werden, könnte somit bei späteren Anwendungen zunächst ein weiteres Transgen (Antigen) exprimiert werden und der Vektor hätte

bivalente Eigenschaften, wohingegen der Einbau von zwei Transkriptionskassetten durch die X-X-Kassette von pSeV-X-X, einen Vektor ergeben würde, welcher in der Lage ist, zwei zusätzliche Transgene (Antigene) zu exprimieren. Die Effizienz der initialen Herstellung von SeV-eGFP-DsRed ist im Vergleich zu SeV-eGFP um etwa 90 % geringer, aber dennoch möglich. Weiter zeigte sich, dass SeV-eGFP eine um 56 % höhere Virusproduktion und eine im zeitlichen Verlauf schnellere Virusfreisetzung hervorruft als SeV-eGFP-DsRed.

Die neu zu etablierenden SeV Vektoren sollen sich durch Replikations-Inkompetenz auszeichnen (daher die Bezeichnung „Vektor“ anstelle von „Virus“), um bei ihrer Anwendung im Vakzinierungsbereich die geforderten Sicherheitsstandards zu erfüllen. Eine Replikations-Defizienz dieser viralen Vektoren soll durch Deletion eines der Gene N, P oder L hervorgerufen werden. Daraus ergibt sich, dass solche replikations-defizienten SeVV- Δ X nur mit Hilfe eines zellulären Helfersystems vermehrt werden können.

SeV-eGFP lässt sich besser initial herstellen und auch besser vermehren als SeV-eGFP-DsRed. Das Entfernen eines der Gene N, P oder L, ein notwendiger Schritt für die Herstellung von replikations-defizienten Vektoren, ist wahrscheinlich mit einer verschlechterten Initialherstellung gekoppelt. Durch die Deletion eines der Gene N, P oder L ist vermutlich ebenso bei der weiteren Vermehrung der Vektoren auf Helferzellen mit einer Verminderung der Effizienz zu rechnen. Daher sollte zunächst pSeV-eGFP als Basisvektor für die Konzipierung der replikations-defizienten Vektoren (SeVV-eGFP- Δ X) dienen.

Nach erfolgreicher Herstellung und Vermehrung von replikations-defizienten SeVV könnte dann die zweite Transkriptionskassette zusätzlich eingefügt werden, um Anwendungsmöglichkeiten des Vektors dadurch weiter zu verbessern.

3.2 Herstellung replikations-defizienter SeVV-eGFP- Δ X

Als wesentliches Sicherheitsmerkmal der zu entwickelnden Vektoren sollte die Replikation von SeVV in der Zielzelle unterdrückt werden. Dabei sollte die virale Transkription zugleich möglichst effizient erfolgen.

Die Replikation von SeV findet mit Hilfe funktioneller Polymerase-Komplexe statt, die sich aus den Proteinen P und L und der mit N-Protein verpackten RNA (RNP) zusammensetzen.

Auf Basis von pSeV-eGFP sollten nun replikations-defiziente SeV Vektoren (SeVV) konzipiert werden, indem aus der cDNA von SeV der kodierende Bereich jeweils eines Gens der Proteine N, P oder L entfernt wird (pSeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L). Aus den cDNA Konstrukten, allgemein als pSeV-eGFP- Δ X bezeichnet, sollten in Zellkultur replikations-defiziente SeVV hergestellt werden.

Die Strategie zur Klonierung von pSeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L erfolgte nach einem einheitlichen Prinzip, welches im nächsten Abschnitt allgemein erläutert wird.

3.2.1 Herstellung der cDNA-Konstrukte SeVV-eGFP- Δ X

Um die cDNA Konstrukte pSeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L herzustellen, musste unter Einhaltung der *rule of six* jeweils ein Leserahmen (ORF) der Gene N, P oder L deletiert werden, wobei eine nicht-kodierende Transkriptionskassette an der entsprechenden Position erhalten bleiben sollte (Abb. 12).

Durch Einbau einer Restriktionsschnittstelle anstelle des deletierten ORF sollte in jedem cDNA Konstrukt pSeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L für spätere Anwendungen eine weitere funktionelle Transkriptionskassette zur Verfügung stehen, in die bei Bedarf ein weiteres Transgen eingesetzt werden kann.

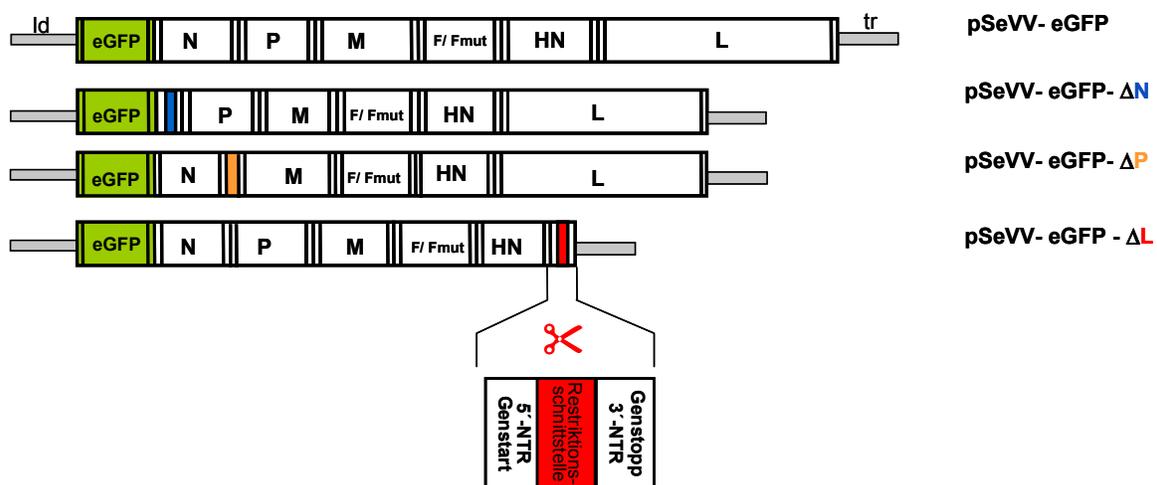


Abb. 12: Genomorganisation von pSeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L im Vergleich zu pSeV-eGFP.

Am Beispiel von pSeVV-eGFP- Δ L ist der Einbau einer Restriktionsschnittstelle in die freie Transkriptionskassette exemplarisch dargestellt.

Die Klonierungen pSeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L wurden alle nach demselben Prinzip durchgeführt. Exemplarisch soll die Klonierung von pSeVV-eGFP- Δ N im folgenden Absatz ausführlich beschrieben werden. Im Anschluss daran werden nur die Unterschiede in den Klonierungen von pSeVV-eGFP- Δ P und - Δ L tabellarisch zusammengefasst.

3.2.1.1 Klonierung des cDNA-Konstruktes SeVV-eGFP-ΔN

Der ORF des N-Proteins musste aus dem cDNA Konstrukt des replikations-kompetenten Virus pSeV-eGFP entfernt werden, um die neue cDNA pSeVV-eGFP-ΔN für die Herstellung des replikations-defizienten Vektors herzustellen. An die Position des N-ORF sollte eine singuläre *Apa I*-Restriktionsschnittstelle eingesetzt werden.

Für die Klonierung von pSeVV-eGFP-ΔN wurden zwei PCR-Fragmente namens PCR ΔN I und PCR ΔN II hergestellt und anschließend fusioniert. Als Template für die beiden PCR-Reaktionen diente pSeV-eGFP. Beim Fragment PCR ΔN I (1080 bp) wurde über den *forward*-Primer ΔNI (M13) eine Hybridisierung mit dem Template pSeV-eGFP im Bereich der *leader*-Sequenz erreicht. Der *reverse*-Primer ΔN I (+) hybridisiert mit dem Template im 5'-NTR Bereich des N-Gens bis vor das ATG-Codon von N und fügt dort eine Restriktionsschnittstelle *Apa I* an (siehe rote Markierung).

PCR ΔN II besteht aus 1190 bp, als Template dient auch hier pSeV-eGFP. Der *forward*-Primer ΔN II hybridisiert mit der Genstopp-Sequenz des N-Gens und hängt am 5'-Ende des PCR-Produkts einen Teil der 5'-NTR-N Sequenz und eine *Apa I*-Schnittstelle an, kompatibel zum 3'-Bereich von PCR Primer ΔN I (siehe rote Markierung). Der *reverse*-Primer von PCR ΔN II ist ein Primer namens P-2892 (+), der mit dem Template pSeV-eGFP im ORF des P-Gens hybridisiert.

Über Fusions-PCR fand die Verschmelzung beider PCR-Fragmente ΔN I und ΔN II (5.2.3.17) statt. Das Fusionsprodukt, bestehend aus der Sequenz des *leaders*, der vollständigen eGFP-Transkriptionskassette, der nicht-kodierenden N-Transkriptionskassette mit eingefügter *Not I*-Restriktionsschnittstelle, der Genstartsequenz von P mit dem 5'-NTR und einem Drittel des P-ORFs, wurde mit den Primern ΔNI-M13 und P-2892 (+) amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Nar I* gespalten. Es entstand ein 1235 bp großes Fragment, welches nach Gelelektion über die *Nar I*-Schnittstellen mit dem ebenfalls mit *Nar I* behandelten Vektor pSeV-eGFP ligiert wurde.

Nach Transformation, Plasmid-Mini-Präparation und nach Überprüfung der korrekten Orientierung des eingebauten *Nar I*-Fragmentes wurden verschiedene Plasmid-DNAs von pSeVV-eGFP-ΔN sequenziert. Ein entsprechender pSeVV-eGFP-ΔN-Klon stand nach Maxi-Plasmid-Präparation nun für die Herstellung des replikations-defizienten SeVV-eGFP-ΔN bereit.

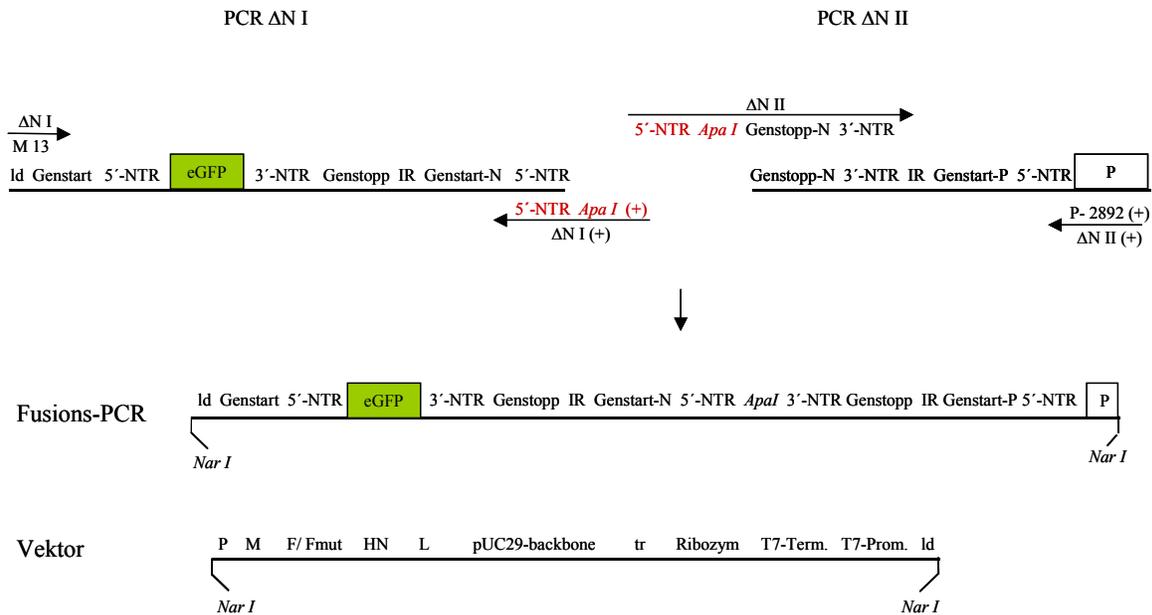


Abb. 13: Darstellung der Herstellung von pSeV-eGFP-ΔN durch Deletion des N-ORFs aus pSeV-eGFP.

3.2.1.2 Klonierungen der cDNA-Konstrukte SeVV-eGFP-ΔP und -ΔL

Die Herstellung von pSeVV-eGFP-ΔP und pSeVV-eGFP-ΔL erfolgte nach dem gleichen Schema wie die Klonierung von pSeVV-eGFP-ΔN. Um die Klonierungen zusammenzufassen, wurden in Tab. 2 alle entscheidenden Parameter zum Klonierungsverfahren dargestellt.

Durch die Herstellung jeweils zweier fusionierbarer PCR-Produkte PCR I und PCR II wurde der ORF der Gene P oder L aus pSeV-eGFP unter Berücksichtigung der *rule of six* entfernt und an dessen Stelle sollte in beiden Fällen eine singuläre ApaI-Restriktionsschnittstelle in die Transkriptionskassette eingebaut werden. Im Fall von SeVV-eGFP-ΔL gelang dieses Vorhaben; im Fall von SeVV-eGFP-ΔP konnte das Fusionsprodukt mit der Apa I-Restriktionsschnittstelle trotz mehrmaliger Wiederholung nicht inseriert werden und es wurde dann auf die nicht-singuläre Restriktionsschnittstelle *Xho I* ausgewichen. Die Verwendung dieser nicht-singulären *Xho I*-Schnittstelle im Fall von pSeVV-eGFP-ΔP macht beim Einbau einer kodierenden Sequenz eine Klonierung über einen Zwischenvektor notwendig. Außer dieser Zwischenklonierung ergeben sich für einen Einbau einer kodierenden Sequenz an dieser Position aber keinerlei Nachteile. Die Sequenzen der Primer zur Klonierung von pSeVV-eGFP-ΔN, -ΔP und -ΔL sind unter 5.2.3.14 aufgelistet. Die hergestellten PCR-Produkte PCR I und PCR II wurden fusioniert und mit Hilfe des *forward*-Primers von PCR I und des *reverse*-Primers von PCR II amplifiziert. Anschließend wurden die Fusions-PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen,

die in pSeV-eGFP singulär vorkommen und die Insertion des entsprechenden Fusionsproduktes in pSeV-eGFP zulassen, gespalten (z.B.: *Sph I* + *Eco47 III* bei Klonierung pSeVV-eGFP- Δ P, Tab. 2). Das gereinigte Spaltprodukt wurde durch Ligation in den ebenfalls mit den entsprechenden Enzymen verdauten Vektor pSeV-eGFP eingefügt.

Tabelle 2: Übersicht über die bei den Klonierungen verwendeten Primern + zugehörigen Restriktionsschnittstellen.

	pSeVV-eGFP-ΔN	pSeVV-eGFP-ΔP	pSeVV-eGFP-ΔL
Primer PCR I	Δ N I = M13, Δ N I (+)	Δ P I = NP- 578, Δ P I (+)	Δ L I = F- 4871, Δ L I (+)
Primer PCR II	Δ N II, Δ N II (+) = P- 2892 (+)	Δ P II, Δ P II (+) = F- 5430 (+)	Δ L II, Δ L II (+) = pSeV- 18873 (+)
RSS[§] der Transkriptionskassette	<i>Apa I</i>	<i>Xho I</i>	<i>Apa I</i>
RSS[§] der Klonierung	<i>Nar I</i>	<i>Sph I</i> + <i>Eco47 III</i>	<i>Eco47 III</i> + <i>Asc I</i>

§ RSS = Restriktionsschnittstelle

E.coli Zellen wurden mit einem Teil der Ligationsansätze transformiert und Plasmid-DNA der erhaltenen Klone durch Plasmid-Mini-Präparation isoliert. Nach Überprüfung der korrekten Sequenz durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurde von je einem positiven Klon eine Plasmid-Maxi-Präparation angefertigt (5.2.3.3) und so standen die verschiedenen pSeVV-eGFP- Δ X für die Herstellung von rekombinanten Deletionsmutanten bereit.

3.2.2 Herstellung der Virusmutanten SeVV-eGFP- Δ X

Aus den cDNA-Konstrukten pSeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L sollten nun in Zellkultur replikationsdefiziente SeVV hergestellt werden. Es sollte dazu das Standardsystem zur Herstellung rekombinanter SeV eingesetzt werden, da auch bei der rekombinanten Herstellung von SeV wt Viren die viralen Proteine N, P und L zunächst durch Transkomplementation bereitgestellt werden.

3.2.2.1 Initiale Herstellung von SeVV-eGFP- Δ X

Für die Herstellung von rekombinanten SeV mit vollständigem Genom in Zellkultur werden MVA-T7 infizierte Zellen mit der cDNA des viralen Genoms (pSeV) und den Plasmid-kodierten Genen N, P und L transfiziert (pTM-N, -P, -L). Die T7-Polymerase transkribiert nun das virale Genom und die Gene N, P und L. Das über pTM-N exprimierte N-Protein verpackt die synthetisierte virale antigenomische RNA und dieses Nukleokapsid-Core (RNP) bildet zusammen mit den Proteinen P und

L den Replikationskomplex, über den wiederum genomische RNA hergestellt werden kann und zu Nukleokapsiden verpackt werden kann. Im Anschluss daran erfolgt die Transkription aller Virus-kodierter Proteine und Replikation weiterer viraler Genome.

Im Unterschied zur beschriebenen Herstellung von rekombinanten SeV wt mit vollständigem Genom fehlt in der Plasmid-kodierten cDNA von pSeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L die genetische Information je eines der Gene N, P oder L. Demzufolge sind die initial hergestellten Nukleokapside nur in der Lage jeweils zwei der Gene N, P oder L zu exprimieren. Die zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L Nukleokapsiden benötigte Menge des fehlenden Proteins muss daher ausschließlich über die T7-Promotor-gesteuerte Expression der Plasmid-kodierten Gene N, P und L zur Verfügung gestellt werden.

Die Herstellung der replikations-defizienten SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L erfolgte analog zur Herstellung von SeV-eGFP oder SeVV-eGFP-DsRed nach der unter 3.1.3.1 beschriebenen Standardmethode. Nach 48-stündiger Inkubation der HeLa-Zellen sollte untersucht werden, ob SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L in den Kulturüberständen gebildet worden waren und wie viele initiale Deletionsmutanten entstanden sind.

3.2.2.2 Detektion initial hergestellter SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L

Die Überstände von HeLa-Zellen, in denen initial SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L hergestellt worden sein sollten, mussten nun auf die Anwesenheit dieser viralen Vektoren untersucht werden. SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L haben, im Gegensatz zu rekombinanten SeV wt, im 3'-Bereich das Reporter-gen eGFP integriert. Dieser Detektionsmarker konnte nun verwendet werden, um zu analysieren, wie viele SeVV-eGFP- Δ X gebildet worden waren. Der Hintergrund zur Detektion der initial hergestellten Vektoren soll am Beispiel von SeVV-eGFP- Δ N erklärt werden: Ein initial hergestellter, replikations-defizienter Vektor SeVV-eGFP- Δ N sollte in der Lage sein, eine Zelle zu infizieren, was die Expression des Reporter-gens eGFP in der infizierten Zelle nach sich ziehen sollte und detektiert werden könnte. Da nicht sichergestellt war, dass die Deletionsmutante SeVV-eGFP- Δ N die Expression des Reporter-gens eGFP ausreichend unterstützen würde, sollte die eGFP-Expression in einer SeVV-eGFP- Δ N infizierten Zelle durch eine zeitgleiche Infektion mit SeV wt unterstützt werden: Bei einer zeitgleichen Infektion einer Zelle mit SeV wt und SeVV-eGFP- Δ N synthetisiert das wt Virus alle auf seinem Genom kodierten Proteine und damit auch N-Protein. In derselben Zelle befindet sich das Nukleokapsid von SeVV-eGFP- Δ N. Durch SeV wt wird N-Protein in der doppelt infizierten Zelle zur Verfügung gestellt und die Deletion des N-Gens in SeVV-eGFP- Δ N wird transkomplementiert. Daher sollte SeVV-eGFP- Δ N in die Lage versetzt werden, das Reporter-gen eGFP ausreichend stark zu exprimieren.

Auf dem gleichen Prinzip basiert die Detektion der initial hergestellten Vektoren SeVV-eGFP- Δ P und SeVV-eGFP- Δ L, nur dass das wt Virus hier die Proteine P oder L transkomplementieren muss. Durch Einsatz von viel SeV wt (MOI=3) sollte sichergestellt werden, dass jede mit SeVV-eGFP- Δ X infizierte Verozelle gleichzeitig auch mit SeV wt infiziert ist. Auf die Anzahl der in HeLa-Zellen initial hergestellten SeVV-eGFP- Δ X konnte durch die Anzahl fluoreszierender Verozellen zurück geschlossen werden.

In parallelen Ansätzen wurden 5×10^5 Verozellen mit je 1 ml Zellkultur-Überstand der bei der initialen Herstellung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P, - Δ L transfizierten HeLa-Zellen und zeitgleich mit SeV wt (MOI = 3) infiziert. Um sicherzustellen, dass eine Doppelinfektion von Zellen erreichbar wird und dass sich eine solche nicht negativ auf die Effizienz der Expression des Reportergens eGFP auswirkt, wurden als Kontrolle Verozellen entweder nur mit 1 ml initial hergestellten SeV-eGFP oder aber mit initial hergestellten SeV-eGFP und zeitgleich mit SeV wt (MOI = 3) infiziert. Nach 1-stündiger Adsorption erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM + 10 % FKS. Die Ansätze wurden 36 h bei 33 °C inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes die Anzahl grün fluoreszierender Verozellen pro Ansatz ausgezählt. Auf diese Weise konnte die Anzahl initial hergestellter Viruspartikel ermittelt werden (Abb. 14).

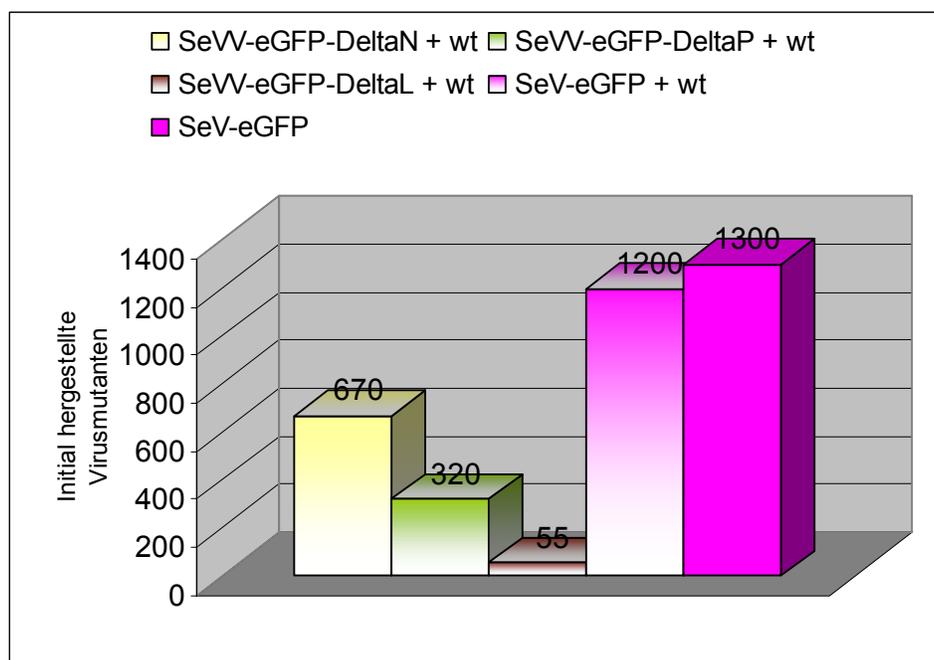


Abb. 14: Initiale Herstellung von SeVV-eGFP- Δ X.

5×10^5 Verozellen wurden mit 1 ml Zellkulturüberstand der Initialherstellung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P, oder - Δ L und mit SeV wt (MOI = 3) koinfiziert. Als Kontrolle wurden Verozellen einmal mit 1 ml Zellkulturüberstand der Initialherstellung von SeV-eGFP und wt koinfiziert und einmal mit 1 ml Zellkulturüberstand der Herstellung von SeV-eGFP ohne SeV wt infiziert. Die Ansätze wurden 36 h bei 33 °C inkubiert und die Anzahl fluoreszierender Verozellen bestimmt.

Die Kontrollen (SeV-eGFP \pm wt) zeigen, dass es durch die Doppelinfektion zu keiner Beeinträchtigung des Nachweissystems kommt und dass die Effizienz der Virusherstellung den Standardwerten entspricht.

Das Ergebnis der Koinfektion von Zellen mit Kultur-Überständen der Herstellung von SeVV-eGFP- Δ N, Δ P oder Δ L und SeV wt zeigt, dass alle drei Virusmutanten SeVV-eGFP- Δ X initial herstellbar sind und nach initialer Herstellung auch in der Lage sind, Zellen zu infizieren, was sich durch eine nachweisbare eGFP-Transgenexpression detektieren lässt. Dabei zeigt sich zugleich eine Abstufung bei der Anzahl initial hergestellter Virusmutanten: Es können initial etwa 13×10^2 SeV-eGFP, $6,7 \times 10^2$ SeVV-eGFP- Δ N, $3,2 \times 10^2$ SeVV-eGFP- Δ P und $0,55 \times 10^2$ SeVV-eGFP- Δ L Virusmutanten hergestellt werden. Die initiale Herstellung von SeVV-eGFP- Δ N ist mit 56 % im Vergleich zur initialen Herstellung von SeV-eGFP am effizientesten. Von SeVV-eGFP- Δ P werden im Vergleich zu SeV-eGFP etwa 27 % Virusmutanten erhalten werden. Die Menge an initial hergestellten SeVV-eGFP- Δ L beläuft sich mit 55 Partikeln auf etwa 4 % im Vergleich zu SeV-eGFP.

Den unterschiedlichen Rescue-Werten bei der Herstellung der drei Vektoren können verschiedenen Ursachen zugrunde liegen: Zum einen könnten die unterschiedlichen Mengen an initial hergestellten Virusmutanten davon abhängen, dass das Plasmid-gestützte rescue-System die initiale Herstellung der drei Vektoren SeVV-eGFP- Δ N, Δ P und Δ L in unterschiedlicher Effizienz transkomplementiert. Um einen solchen Effekt sichtbar machen zu können, müsste vorausgesetzt werden, dass das bei Koinfektion von Zellen zugeführte SeV wt Virus die virale Transkription in allen drei Fällen gleich effizient unterstützt.

Zum anderen könnte auch sein, dass SeVV-eGFP- Δ N, Δ P oder Δ L durch die Koinfektion mit SeV wt in unterschiedlichem Maße transkomplementiert würden. Vielleicht kann SeVV-eGFP- Δ L durch das wt Virus schlechter transkomplementiert werden als SeVV-eGFP- Δ N und daraus resultiert eine verringerte Anzahl an grün fluoreszierenden Zellen.

Es bleibt festzuhalten, dass SeVV-eGFP- Δ N, Δ P und Δ L initial herstellbar und infektiös sind. Im Folgenden sollte die Replikationsfähigkeit von SeVV-eGFP- Δ N, Δ P und Δ L untersucht werden.

3.3 Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ X

Eine wichtige Zielvorgabe dieser Arbeit ist die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ X durch zelluläre Transkomplementation. Bevor entsprechende Vermehrungssysteme für die viralen Vektoren auf zellulärer Ebene etabliert werden sollten, musste zunächst sichergestellt werden, dass SeVV-eGFP- Δ X vermehrbar sind, das heißt biologisch aktiv sind. Die Replikationsfähigkeit sollte zunächst durch

Bereitstellung der Proteine der fehlenden Gene N, P oder L durch virale Transkomplementation mit SeV untersucht werden. Im vorangegangenen Versuch war eine Ausbreitung der Vektoren SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L auf Nachbarzellen wegen der gewählten hohen MOI des SeV wt Virus (MOI = 3) unwahrscheinlich. Die Konditionen der wt Koinfektion sollten nun so gewählt werden, dass sich bei Koinfektion einer Zelle sowohl der virale Vektor als auch das SeV wt anschließend auf umliegende, noch uninfizierte Zellen ausbreiten kann.

3.3.1 Nachweis der Vermehrbarkeit von SeVV-eGFP- Δ X

Als Voraussetzung für die Etablierung zellulärer Helfersysteme für die Vermehrung der Deletionsmutanten SeVV-eGFP- Δ X musste zunächst nachgewiesen werden, dass die Mutanten bei entsprechender Transkomplementation durch das SeV wt Virus in der Lage sind sich zu vermehren und dabei umliegende Zellen infizieren. Für die Untersuchung der Vermehrbarkeit von SeVV-eGFP- Δ X bietet sich wiederum die Koinfektion von Zellen mit SeVV-eGFP- Δ X und SeV wt an. In dem unter 3.2.2.2 beschriebenen Versuch wurden die Zellen mit SeV wt in einer hohen MOI = 3 infiziert, um sicherzustellen, dass jede mit SeVV-eGFP- Δ X infizierte Zelle auch mit SeV wt infiziert ist, um die Anzahl initial hergestellter SeVV-eGFP- Δ X sicher detektieren zu können. Durch die Infektion von Zellen mit einer hohen MOI ist die Kultur kurzfristig mit wt Viren durchinfiziert und die Zellen sind somit nicht mehr in der Lage, von durch Transkomplementation entstandenen SeVV-eGFP- Δ X Virusnachkommen infiziert zu werden. Daher sollen die Zellen in diesem Versuch mit SeV wt in niedriger MOI infiziert werden, mit SeVV-eGFP- Δ X koinfiziert und über mehrere Tage inkubiert werden, um so die Ausbreitung der SeVV-eGFP- Δ X Vektoren durch die zunehmende Anzahl fluoreszierender Zellen detektieren zu können. Bei der Wahl einer geringen MOI (MOI = 0,2) sind bei einer Gesamtzahl von 5×10^5 Verozellen theoretisch nur 100.000 Verozellen mit wt infiziert. Werden die Verozellen gleichzeitig mit etwa 100 initial hergestellten SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L Virusmutanten infiziert, ist eine Doppelinfektion bei nur ca. 20 Zellen zu erwarten. Findet dieses Ereignis aber statt, können aus der doppelt infizierten Zelle entlassenen Virusmutanten umliegende, noch nicht infizierte Zellen befallen. Da auch wt Virus nebenliegende Zellen infizieren kann, entsteht bei zeitgleicher Infektion umliegender Zellen mit SeVV-eGFP- Δ X und SeV wt eine Ausbreitung der Infektion mit SeVV-eGFP- Δ X. Gleichzeitig würden bis zu 80 Verozellen anfangs nur mit SeVV-eGFP- Δ X infiziert. Wegen des anzunehmenden geringen Expressionslevels der viralen Gene sollten die infizierten Zellen nicht durch eine Neuraminidase-Aktivität des HN-Proteins vor einer Sekundärinfektion geschützt sein. Deswegen könnte diese Zelle zu einem späteren Zeitpunkt der Inkubation von einem replizierten SeV wt Virus koinfiziert werden. Nach Doppelinfektion kann das

SeVV-eGFP- Δ X Virus durch virale Transkomplementation vermehrt werden, was bei einer Inkubation über mehrere Tage durch eine eGFP-Expression in infizierten Zellen zu beobachten ist.

5×10^5 Verozellen wurden zeitgleich mit durchschnittlich 100 initial hergestellten SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L und SeV wt (MOI = 0,2) infiziert. Als Positivkontrolle diente die Koinfektion von Verozellen mit etwa 100 Partikeln des replikations-kompetenten Virus SeV-eGFP und SeV wt. Nach einstündiger Inkubation wurde ein Mediumwechsel mit DMEM + 10 % FKS durchgeführt. Die Ansätze wurden bei 33 °C für 48 h inkubiert. Während dieser 48-stündigen Inkubationsphase konnte eine Vermehrung aller drei Deletionsmutanten beobachtet werden: Zunächst fluoreszierten jeweils nur einzelne Verozellen, die mit SeVV-eGFP- Δ X und SeV wt koinfiziert worden waren. Nach etwa 24 h wurden aus diesen Zellen neu synthetisierte Viruspartikel entlassen, die nun in der Lage waren, in nebenliegende Zellen einzudringen. Wurden diese Zellen wiederum zeitgleich mit SeVV-eGFP- Δ X und SeV wt infiziert, kam es ebenfalls in solchen Zellen zu einer detektierbaren Fluoreszenz-Erscheinung. Die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P, und - Δ L in mit wt koinfizierten Zellen konnte durch diese „Schweifbildung“ fluoreszierender Zellen 48 h p.i. und darüber hinaus detektiert werden.

Durch diesen Versuch konnte sichergestellt, dass die genomischen cDNA-Konstrukte, aus denen SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P, und - Δ L entstanden sind, in allen Bereichen funktionell sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Vermehrung der Virusmutanten bei Zugabe des fehlenden viralen Proteins möglich ist. Das ausschließlich von wt Virus bereitgestellte Protein (z.B. N) ist ausreichend, um beide, die Deletionsmutante und den wt, zu vermehren, das heißt auch eine möglicherweise suboptimale Menge an N-Protein führt zur Bildung funktioneller Nukleokapside von SeV wt und SeVV-eGFP- Δ N. Durch die Bereitstellung des fehlenden Proteins durch den Transkomplementationspartner SeV wt konnte eine sichtbare Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N, gemessen durch die Zunahme fluoreszierender Zellen in den Kulturansätzen, erreicht werden. In Abbildung 15 sind Fluoreszenzaufnahmen solcher koinfizierter Zellen 48 h p.i. dargestellt.

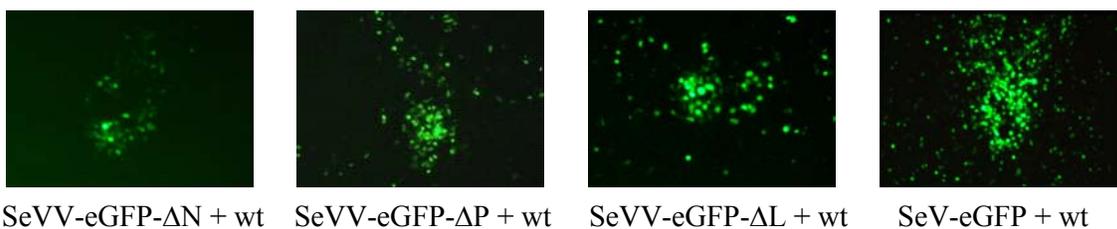


Abb. 15: Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ X durch Koinfektion mit wt Virus.

5×10^5 Verozellen wurden mit SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L und wt Virus (MOI = 0,2) koinfiziert. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 33 °C erfolgte der Nachweis der Ausbreitung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L über die Expression von eGFP in infizierten Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops.

Da bei Koinfektion von Zellen mit einer Deletionsmutante und SeV wt alle drei Proteine N, P und L für die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ X gleichzeitig zur Verfügung stehen, konnten durch diese Untersuchungen keine Aussagen darüber getroffen werden, ob die Proteine N, P oder L auch einzelnen ausreichen, um die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L zu unterstützen, oder ob Kombinationen der Proteine erforderlich sind.

Durch Koinfektion von Zellen mit SeVV-eGFP- Δ X und Vaccinia Helferviren, welche die SeV Proteine N, P oder L einzeln exprimieren, sollte nun analysiert werden, ob beispielsweise allein P-Protein für die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P ausreicht oder ob neben P-Protein auch N-Protein in der Helfezelle zur Verfügung stehen muss.

3.3.2 Bestimmung der erforderlichen Proteine zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ X

Durch den unter 3.3.1 vorgestellten Versuch ist sichergestellt, dass alle drei Virusmutanten durch Transkomplementation vermehrt werden können. Durch die Koinfektion mit SeV wt werden in jedem Fall alle viralen Proteine, wie auch die Nichtstrukturproteine (C, C', Y1, Y2, X, V, W) transkomplementiert. Um herauszufinden, welche Proteine in jedem einzelnen Fall der Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L durch eine Helfezelle zur Verfügung gestellt werden müssen, sollten die SeV Proteine N, P und L unabhängig voneinander synthetisiert werden können. Für eine unabhängige Synthese der SeV Proteine N, P und L standen die drei rekombinanten Vaccinia Viren VV-N, VV-P, VV-L zur Verfügung, welche die SeV Proteine N, P oder L rekombinant exprimieren (Graef, 1994).

Aus *in vitro*-Untersuchungen war bereits bekannt, dass SeV N-Protein nur nach Komplexierung mit P-Protein für die Verpackung von viraler RNA zur Verfügung steht (Buchholz, 1994) und dass freies N-Protein jegliche Art von RNA in einer infizierten Zelle verpackt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ebenso *in vivo* die beiden Proteine N und P in einer Zelle zur Verfügung stehen sollten, um SeVV-eGFP- Δ N zu vermehren. In den hier beschriebenen Versuchen sollten diese *in vitro*-Ergebnisse überprüft werden.

Des Weiteren konnte durch *in vitro*-Analysen ermittelt werden, dass eine simultane Expression des P-Proteins die Stabilität des L-Proteins durch die Bildung von stabilen P:L-Komplexen steigert (Horikami et al., 1997). Um diese Aussage *in vivo* zu bestätigen, sollte die Produktion von SeVV-eGFP- Δ L durch Koinfektion von Zellen mit VV-L allein oder durch Koinfektion mit VV-L+VV-P analysiert werden.

VV ist ein virulentes Virus, welches in infizierten Zellen nach kurzer Zeit schwere zytopathische Effekte (CPE) auslöst, welche aber durch Verwendung von Replikationsinhibitoren, wie etwa Cytosin-Arabinosid (AraC), gemildert werden können. Um sicherzustellen, dass das replikations-kompetente SeV-eGFP unter diesen Bedingungen in der Lage ist, das Reporter-gen eGFP zu exprimieren, wurden in einem Kontrollansatz Zellen mit SeV-eGFP und VV-P infiziert. SeV-eGFP wurde dabei mit einer MOI von 0,01 eingesetzt, da auch für SeVV-eGFP- Δ X aufgrund der niedrigen Ausbeute bei der initialen Herstellung keine höhere MOI möglich war. Durch die sichtbare Zunahme eGFP-exprimierender Zellen während der Inkubationsphase konnte auf eine Produktion von Nachkommenviren geschlossen werden und eine gravierende Hemmung der SeV-Replikation ausgeschlossen werden

Nun wurden 1×10^6 Verozellen simultan mit SeVV-eGFP- Δ X oder SeV-eGFP (MOI = 0,01) und VV infiziert. VV-N, -P und -L wurden dabei einzeln oder in den durch *in vitro*-Untersuchungen bekannten Kombinationen eingesetzt (MOI = 0,5). Nach einer einstündigen Adsorptionszeit erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM + 10 % FKS + AraC (100 μ g/ml) und die Zellen wurden für 72 h bei 33 °C inkubiert, wobei das Medium täglich gewechselt wurde, um neues AraC zuzugeben. AraC ist ein Nukleotidanalogen, welches DNA-abhängige RNA-Polymerasen inhibiert und sollte somit die Replikation der N-, P- oder L-Protein exprimierenden Vaccinia Viren (VV) weitgehendst inhibieren sollte, um dadurch das Auftreten eines CPE durch die VV-Infektion möglichst abzuschwächen.

Die Ausbreitung von SeVV-eGFP- Δ X wurde über die eGFP-Expression nach 72 h analysiert. In dieser Zeit ergab sich in den positiven Ansätzen eine Vermehrung grün fluoreszierender Zellen von einer Initialzelle zu 10-30 benachbarten, fluoreszierenden Zellen.

Die Ergebnisse der Untersuchung, welche SeV Proteine notwendig sind, um SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L in Verozellen zu vermehren, sind in Tab. 3 zusammengefasst. Die alleinige Expression von SeV N durch VV-N führt nicht zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N. SeVV-eGFP- Δ N wird nur vermehrt, wenn die SeV Proteine N und P simultan mit Hilfe rekombinanter Vaccinia Viren VV-N und VV-P in der infizierten Zelle exprimiert werden. Die durch *in vitro*-Untersuchungen erhaltenen Daten können somit durch *in vivo*-Experimente bestätigt werden. SeVV-eGFP- Δ P kann allein durch die Expression von SeV P-Proteinen mit Hilfe von VV-P in Verozellen vermehrt werden. Zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ L bedarf es der simultanen Synthese der Proteine P und L durch VV. In einer SeVV-eGFP- Δ L und nur VV-L infizierten Verozelle findet keine Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ L statt. Dieses *in vivo*-Ergebnis ist konsistent mit den Untersuchungen einer amerikanischen Arbeitsgruppe, die herausgefunden hat, dass das SeV L-Protein *in vitro* nur im Komplex mit dem P-Protein stabil ist (Horikami et al., 1997).

Tabelle 3: Zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ X benötigte SeV Proteine.

	<i>in vivo</i> -Vermehrung mittels VV		
SeVV-eGFP- Δ N	N	-	(N + P) +
SeVV-eGFP- Δ P	P	+	(N + P) +
SeVV-eGFP- Δ L	L	-	(L + P) +

§ n.d. = nicht durchgeführt

Abbildung 16A zeigt exemplarisch die Ausbreitung von SeVV-eGFP- Δ P nach einer simultanen Infektion von Verozellen mit SeVV-eGFP- Δ P und VV-P, 16B zeigt den Kontrollansatz, in dem Verozellen mit SeV-eGFP und VV-P koinfiziert wurden. Trotz Anwesenheit von AraC im Medium, kam es nach 3-tägiger Inkubation zu einem starken CPE, der primär von der Infektion der Verozellen mit dem rekombinanten Vaccinia Virus (VV) herrührt.



Abb. 16: Vermehrung von SeVV in Anwesenheit des SeV P-Proteins (VV-P).

1×10^6 Verozellen wurden simultan mit VV-P (MOI = 0,5) und SeVV-eGFP- Δ P oder SeV-eGFP (MOI > 0,01) koinfiziert. Die Inkubation erfolgte für 72 h bei 33 °C in Anwesenheit von AraC. Die Vermehrung der Viruspartikel wurde durch die Infektion nebenliegender Zellen sichtbar gemacht,

(A) Ausbreitung von SeVV-eGFP- Δ P mit Hilfe des rekombinant exprimierten P-Proteins (VV-P).

(B) Ausbreitung von SeV-eGFP bei simultaner Infektion der Zellen mit VV-P.

Die vorliegenden *in vivo*-Untersuchungen bestätigen in allen Fällen die vorhandenen Daten der *in vitro*-Analysen und es konnte nun vorausgesagt werden, welche SeV Proteine für die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L durch entsprechende Helferzellen stabil exprimiert werden müssten: Zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N müsste eine Helferzelle die SeV Proteine N und P simultan exprimieren, zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P reicht die Expression von SeV P-Protein in der Helferzelle aus und die Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ L sollte durch eine zelluläre Expression der SeV Proteine P und L möglich sein. Gleichzeitig wurde nochmals in einem anderen System gezeigt, dass eine Vermehrung der viralen Vektoren durch virale Transkomplementation möglich ist. Da bei

viraler Transkomplementation die virushaltigen Überstände jedoch mit Vaccinia Virus oder SeV wt Virus kontaminiert sind, kann eine Vermehrung der Vektoren für die geplante Anwendung jedoch nicht durch diese Art der Transkomplementation stattfinden. Ein zelluläres System wird benötigt, welches die fehlenden Proteine ohne die Beteiligung von Helferviren *in trans* zur Verfügung stellt.

In unserer Arbeitsgruppe war bereits eine Helferzelle namens H29 etabliert worden, die die SeV Proteine N, P und L stabil exprimiert. Diese Zelllinie sollte sich wegen der Expression aller drei Polymerase-Proteine für erste Untersuchungen zur Vermehrung der drei Deletionsmutanten, SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L, eignen.

3.3.3 Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ X durch Helferzellen

Um die Vermehrbarkeit von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L durch zelluläre Transkomplementation zu untersuchen, sollte zunächst auf die in dieser Arbeitsgruppe etablierte Helferzelle H29 zurückgegriffen werden. Zunächst soll diese Helferzelllinie im Hinblick auf das neue Anwendungsgebiet charakterisiert werden.

3.3.3.1 Die Helferzelllinie H29

Die Helferzelllinie H29 wurde 1994 in unserer Arbeitsgruppe hergestellt (Willenbrink & Neubert, 1994). H29 Zellen exprimieren die SeV Proteine N, P und L stabil und könnten sich daher für die Vermehrung aller drei replikations-defizienten Vektoren SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L durch zelluläre Transkomplementation eignen. Wesentliche Parameter für eine effiziente Vermehrung der Deletionsmutanten durch zelluläre Transkomplementation sind neben der ausreichenden Synthese der deletierten Proteine die Infizierbarkeit der Zelle und die Effizienz der Virusproduktion solcher Helferzellen. Zunächst soll die die Synthese der Proteine N, P und L durch die Helferzelle H29 beschrieben werden.

3.3.3.1.1 Synthese von SeV Proteinen in H29 Zellen

Die Helferzelllinie H29 exprimiert stabil die SeV Proteine N, P und L und stammt von 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) ab. Die in das zelluläre Genom integrierten SeV Gene N, P und L stehen unter Kontrolle des hCMV-Promotorelementes. H29 Zellen produzieren das E1a-Protein, welches in der Lage ist, die hCMV-Promotor-Region zu transaktivieren und damit eine hohe Genexpression zu erreichen. Die Synthese der SeV N- und P-Proteine in H29 Zellen wurde mit der Synthese der Proteine in SeV infizierten CV-1 Zellen verglichen und es ergaben sich folgende Werte: Das SeV N-Protein wird mit einem Anteil von 4,8 % synthetisiert (5,7 ng/ μ g H29-Gesamtprotein) und das SeV P-Protein mit 10,5 % (4,1 ng/ μ g) im Vergleich zu SeV infizierten CV-1 Zellen (Willenbrink

& Neubert, 1994). Synthetisiertes L-Proteine konnte von Willenbrink mit Hilfe der Western Blot-Analyse nicht detektiert werden, aber die vollständige mRNA des L-Gens wurde mittels RT-PCR nachgewiesen und H29 Zellen sind in der Lage, Nukleokapside defektiver-interferierender SeV zu replizieren. Da das L-Protein im Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte und die Nachweisgrenze eines Proteins im Western Blot bei etwa 0,4 ng/ μ g Gesamtprotein liegt, wurde festgesetzt, dass der Anteil des L-Proteins am Gesamtproteinanteil unter 5 % liegen muss. Vor einem Einsatz der Helferzelle H29 für die Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L mussten zunächst die Infektionsbedingungen charakterisiert werden.

3.3.3.1.2 Sensitivität der H29 Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen

Das F-Protein von SeV ist ein membranständiges Oberflächenprotein, welches für die Fusion des Virus mit der Zellmembran zu infizierender Zellen verantwortlich ist. Für eine Fusion mit der Zellmembran muss das F-Protein (F) in die Untereinheiten F₁ und F₂ gespalten vorliegen (Ohuchi & Homma, 1976), da erst dann der hydrophobe Teil der F₁-Untereinheit mit der Zellmembran interagieren und die Fusion einleiten kann. Diese Spaltung kann in Zellkultur durch eine Serin-Protease, wie z.B. acetyliertem Trypsin (AcT) erfolgen (Scheid & Choppin, 1974). AcT wird durch die Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FKS) im Medium inaktiviert. Das Fmut-Protein hat ein verändertes Spaltstellenmotiv, welches das Erkennungsmotiv von Furin, einer subtilisin-ähnlichen Protease, die im Golgi-Apparat der meisten Zelltypen zu finden ist, aufweist (Garten et al., 1994; Klenk & Garten, 1994; Heminway et al., 1995). Dadurch wird das Fmut-Protein von SeV ohne die Anwesenheit von AcT aktiviert und für eine Vermehrung von SeV_{Fmut} können die Zellen in Anwesenheit von FKS inkubiert werden. Deshalb wurden alle rekombinant hergestellten SeV vorsorglich in zwei Versionen hergestellt, mit F und Fmut, um die Schwierigkeit zu umgehen, dass manche sensitive Zelltypen als Mediumzusatz FKS benötigen, um sich vermehren zu können. Auch H29 Zellen wachsen in Zellkultur ausschließlich in DMEM mit 10 % FKS und tolerieren keine mehrtägige Inkubation in DMEM ohne FKS. Da H29 Zellen auf die Anwesenheit von FKS im Kulturmedium angewiesen sind, wurden in den nachfolgenden Experimenten nur Deletionsmutanten verwendet, die für das Fmut-Protein kodieren (SeV_{Fmut}).

Neben der Stabilität der H29 Zellen im Kultursystem ist für eine effiziente Virusvermehrung auch die Infizierbarkeit der Zellen von entscheidender Bedeutung.

3.3.3.1.3 Infizierbarkeit der H29 Zellen

SeV ist in der Lage, verschiedene Zelltypen zu infizieren. Die Infektion solcher Zelltypen geschieht aber mit sehr unterschiedlicher Effektivität (Infizierbarkeit von Zellen). Verozellen etwa lassen sich durch SeV äußerst gut infizieren. Die Infizierbarkeit von H29 Zellen sollte deshalb mit der Infizierbarkeit von Verozellen verglichen werden.

1×10^6 Vero- oder H29 Zellen wurden in je zwei Ansätzen parallel mit einer MOI von 0,01 mit SeV-eGFP infiziert und für 1 d bei 33 °C inkubiert. Durch die Expression von eGFP in SeV-infizierten Zellen 30 h p.i. konnte die Anzahl infizierter Zellen pro 6-well mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes bestimmt werden.

Wurden Verozellen mit SeV-eGFP infiziert, konnten nach 30 h 1×10^4 fluoreszierende Zellen detektiert werden. Dies bedeutet, dass 1×10^4 Zellen von SeV-eGFP infiziert worden sind, was bei einer MOI von 0,01 einer 100 %-igen Infizierbarkeit entspricht. Wenn H29 Zellen parallel infiziert wurden, konnte eine Infektion bei nur maximal $2,5 \times 10^3$ Zellen durch eGFP-Expression detektiert werden. Aus den Untersuchungen ergibt sich, dass sich H29 Zellen durch SeV-eGFP 4 x schlechter infizieren lassen als Verozellen, d.h. hier ergibt sich eine gewisse Einschränkung für ihre Verwendung als Vermehrungszelle.

Nicht nur die Infizierbarkeit ist von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich, auch die Effizienz der Produktion von SeV ist zelltyp-abhängig. Um H29 Zellen als Vermehrungszelle von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L weiter zu charakterisieren, musste ermittelt werden, wie effektiv sie die Vermehrung von SeV unterstützen.

3.3.3.1.4 Virusproduktion in H29 Zellen

Verschiedene Zelltypen sind in unterschiedlichem Maße in der Lage, SeV zu replizieren. Deshalb sollte untersucht werden, wie effizient die Zelllinie H29 Nachkommenviren produziert, um daraus Rückschlüsse auf die Effektivität des zellulären Transkomplementationssystems für die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L ziehen zu können.

Neben H29 Zellen sollten 293-Zellen, aus denen H29 Zellen hervorgegangen waren, und Verozellen für die Untersuchungen herangezogen werden. Zusätzlich wurde die Analyse von CHO-Zellen mit einbezogen, da diese attraktive Kandidaten für die Etablierung neuer Helferzellen sein könnten (siehe 3.3.4.1).

5×10^5 H29- Vero-, 293- oder Verozellen wurden mit SeV wt mit einer MOI von 5 infiziert. Nach einer 1-stündigen Adsorptionsphase erfolgte die Inkubation der Ansätze für 96 h bei 33 °C in Medium mit 10 % FKS. Die Überstände wurden 48 h p.i. abgenommen und die Zellen mit frischem Medium mit 10 % FKS überschichtet. 96 h p.i. wurde die Überstände erneut abgenommen. Die Bestimmung der Anzahl infektiöser Viruspartikel in den 48 h- und 96 h-Überständen erfolgte anschließend im KID-Test. Von jeder untersuchten Probe wurden für die Titerbestimmung zwei Verdünnungsreihen angelegt und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der 48 h- und 96 h-Titrierung wurden addiert und als Ergebnisse der KID-Testreihen in Abbildung 17 grafisch dargestellt.

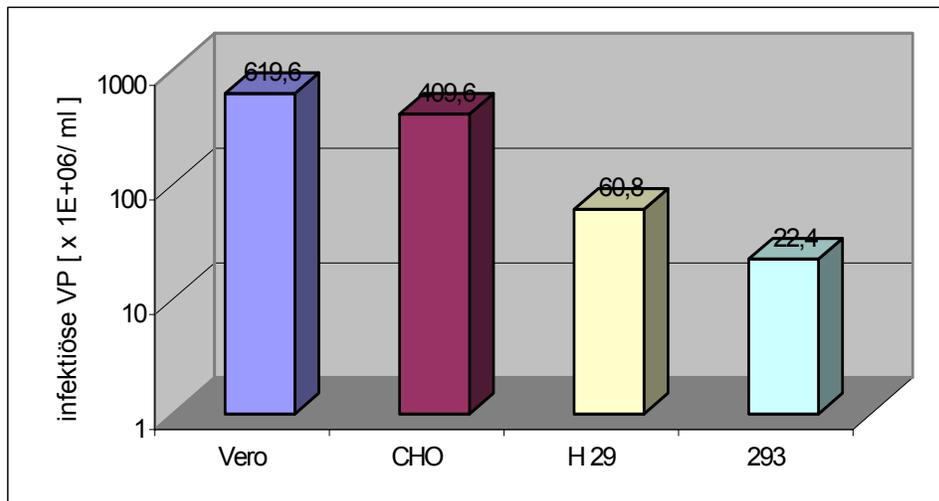


Abb. 17: Produktion infektiöser Sendai-Viren in verschiedenen Zelltypen.

5×10^5 Zellen wurden mit SeV wt infiziert (MOI = 5) und in DMEM mit FKS inkubiert. Alle 24 h wurden die Zellkulturüberstände auf freigesetzte Viruspartikel überprüft. Die Gesamtmenge an freigesetzten Viren 96 h p.i. ist als infektiöse Viruspartikel (VP) pro ml angegeben.

Durch die Untersuchung der Virusproduktion in verschiedenen Zelltypen wird bestätigt, dass die Fähigkeit zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel stark zelltypabhängig ist:

H29 Zellen, die mit SeV wt infiziert wurden, setzen innerhalb der 96-stündigen Inkubationsphase $60,8 \times 10^6$ Nachkommenviren frei, somit etwa 122 Nachkommenviren pro infizierter Zelle. SeV wt infizierte Verozellen produzieren dagegen 10-Mal mehr Sendai-Viren: Fast 620×10^6 Nachkommenviren während einer 96 h-Inkubation, dies entspricht über 1240 Virusnachkommen pro infizierter Zelle. SeV wt infizierte CHO-Zellen entlassen innerhalb 96 h etwa 410×10^6 Virusnachkommen, bei 5×10^5 Zellen sind das etwas unter 820 Viren pro infizierte CHO-Zelle. Am schlechtesten ist die Virusfreisetzung aus infizierten 293-Zellen. Im Zeitraum von 96 h konnten nur $22,4 \times 10^6$ Nachkommenviren detektiert werden. Dies entspricht durchschnittlich 45 Virusnachkommen pro infizierte 293-Zelle.

Aus den Untersuchungen zur Effektivität der Virusproduktion geht deutlich hervor, dass die Produktion infektiöser Viren in Verozellen am effizientesten ist. An zweiter Stelle die stehen CHO-Zellen mit etwa 820 Viren pro infizierte Zelle. H29 Zellen produzieren im Vergleich zu Verozellen nur rund 10 % an infektiösen Nachkommenviren. Es könnte angenommen werden, dass die Virusproduktion in H29 Zellen durch die Anwesenheit der Proteine N, P und L negativ beeinflusst wird. Entgegen dieser Vermutung ist die Virusfreisetzung in H29 Zellen mit 122 Nachkommenviren effizienter als die in der nicht-transfizierten Ursprungszelle 293, aus der nach Infektion nur 45 neue Viruspartikel entlassen werden. Die Anwesenheit der Proteine N, P und L in H29 Zellen beeinflusst demnach die Produktion neuer Viren positiv.

H29 Zellen, die als Helferzellen zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L dienen könnten, lassen sich im Vergleich zu Verozellen 4 mal schlechter infizieren (siehe 3.3.3.1.3) und sind in der Produktion von Virusnachkommen mit knapp 10 % im Vergleich zu Verozellen nur mäßig effizient. Sie sind daher sicherlich keine optimale Vermehrungszelle für die Gen-defekten Mutanten. Allerdings sollte eine Vermehrung der Mutanten prinzipiell auch in H29 Zellen möglich sein. Die H29 Helferzelle sollte daher zunächst zur Überprüfung des Konzeptes einer Zell-unterstützten Vermehrung der Mutanten eingesetzt werden, bevor über eine Etablierung neuer, effizienter Helferzellen entschieden werden konnte.

H29 Zellen synthetisieren die drei Proteine N, P und L funktionell, simultan, stabil und in Mengen von bis zu 10 % im Vergleich zu SeV wt infizierten Zellen. Laut den unter 3.3.2 durchgeführten Untersuchungen mit rekombinanten Vaccinia Viren muss eine Helferzelle zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N die Proteine N und P simultan exprimieren, für die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ L muss eine Helferzelle die SeV Proteine P und L zur Verfügung stellen.

In SeVV-eGFP- Δ P wurde der P-ORF auf genomischer Ebene deletiert. Im P-ORF integriert befinden sich zusätzlich die Leserahmen aller SeV Nichtstrukturproteine (siehe 2.7.2). Bei einer Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P könnten auch keine Virus-kodierten Nichtstrukturproteine exprimiert werden. Falls Nichtstrukturproteine für die Replikation der Deletionsmutanten relevant sind, müssten diese ebenfalls von der Helferzelle zur Verfügung gestellt werden. Im folgenden Unterpunkt soll daher auf die Expression der Nichtstrukturproteine in H29 Zellen eingegangen werden.

3.3.3.1.5 Expression von Nichtstrukturproteinen durch H29 Zellen

In Kapitel 2.7.2 wurden die bekannten Funktionen der im SeV P-Gen kodierten Nichtstrukturproteine C, C', Y1, Y2, X, V und W beschrieben. SeVV-eGFP- Δ N und SeVV-eGFP- Δ L kodieren viral das P-Gen, bei ihrer Vermehrung durch zelluläre Transkomplementation würde die Synthese der Nichtstrukturproteine C, C', Y1, Y2, X, V und W unabhängig von einer Helferzelle erfolgen.

Im Fall von SeVV-eGFP- Δ P ist das P-Gen auf viraler Ebene deletiert, was dazu führt, dass viral keine Nichtstrukturproteine exprimiert werden könnten. Sollten die Nichtstrukturproteine für die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P erforderlich sein, müssten sie daher von der Helferzelle bereit gestellt werden. Da bei der Herstellung von H29 Zellen die Synthese von P-Protein im Vordergrund stand, sollte zunächst festgestellt werden, welche der Nichtstrukturproteine in H29 Zellen ebenfalls kodiert sind und somit bei der Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P zur Verfügung stehen sollten:

Die Nichtstrukturproteine V und W werden durch den Mechanismus des „RNA-Editing“ transkribiert, zu welchem nur die SeV RNA-Polymerase in der Lage ist. Die entsprechenden mRNAs können durch die DNA-abhängige-RNA-Polymerase der H29 Helferzellen also nicht synthetisiert werden und ihre Gene sind auch nicht zusätzlich in die H29 Zellen inseriert worden.

Die Leserahmen der Nichtstrukturproteine der C-Familie starten mit Ausnahme des C'-ORFs im Leserahmen von P und sollten demnach durch H29 Zellen exprimiert werden. Um zu ermitteln, ob die Leserahmen von C, Y1, Y2 und X in der genomischen DNA von H29 korrekt enthalten sind und ob auch der Leserahmen des C'-Proteins, welcher einige Nukleotide vor dem Start-Codon des P-Proteins beginnt, auf DNA-Ebene vollständig inseriert wurde, wurde aus H29 Zellen genomische DNA isoliert, diese im Bereich des kodierten SeV P-Leserahmens und des 5'-Bereiches vor Beginn des P-Leserahmens über PCR-Reaktionen amplifiziert und anschließend mit Hilfe von geeigneten Primern sequenziert.

Durch die Sequenzierungen der genomischen DNA von H29 Zellen wurde ermittelt, dass die genetische Information für das SeV Protein P und die Nichtstrukturproteine X, Y2, Y1 und C auf DNA-Ebene vollständig vorhanden ist. Auch die genetische Information für C' ist auf der DNA von H29 Zellen kodiert. Bei der Herstellung der H29 Zellen wurde das Expressionsplasmid pSC-P verwendet (Willenbrink & Neubert, 1994), das auch den 5'-Bereich des C'-ORFs mit dem ACG-Start-Codon des C'-Leserahmens kodiert.

In Tab. 4 sind die Ergebnisse der Sequenzierungen zusammengefasst. Vergleichend sind die in SeVV-eGFP- Δ P infizierten H29 und Verozellen exprimierten Nichtstrukturproteine aufgezeigt.

Tab. 4: Kodierung von Nichtstrukturproteinen durch H29 Zellen.

Nichtstrukturproteine	H29 Zellen
C'	+
C	+
V	-
W	-
Y1	+
Y2	+
X	+

Bei einer Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N oder SeVV-eGFP- Δ L durch H29 Zellen ist der ORF des P-Gens viral kodiert, somit ist die Synthese des P-Proteins und aller Nichtstrukturproteine auf viraler Ebene sichergestellt. Ob H29 Zellen andererseits für eine erfolgreiche Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N oder SeVV-eGFP- Δ L ausreichend N- oder L-Protein synthetisieren, war zu überprüfen.

Bei einer Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P in H29 Zellen müsste primär das P-Protein zellulär bereitgestellt werden. Daneben könnte es sein, dass die Expression von Nichtstrukturproteinen für eine erfolgreiche Virusvermehrung ebenfalls erforderlich ist. Da durch H29 Zellen neben P-Protein zusätzlich die Nichtstrukturproteine der C-Familie und X-Proteine bereitgestellt werden, nicht aber die

Nichtstrukturproteine V und W, müssten diese möglicherweise zusätzlich viral kodiert werden, falls sie für eine Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ P in H29 essentiell sind.

Im Folgenden sollte zunächst die prinzipielle Fähigkeit der H29 Zellen zur Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ X untersucht werden.

3.3.3.2 Unterstützung der Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ X durch H29 Zellen

In den replikations-defizienten Vektoren SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L wurde auf cDNA-Ebene jeweils eines der Gene N, P oder L deletiert. H29 Helferzellen exprimieren simultan die drei SeV Proteine N, P und L, sowie einige Nichtstrukturproteine. H29 Zellen könnten daher die Amplifikation von zumindest einer oder bestenfalls aller drei der Deletionsmutanten durch zelluläre Transkomplementation unterstützen.

Für die Untersuchungen zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ X mit Hilfe der H29 Zelllinie wurden 1×10^6 H29 Zellen in vier verschiedenen Ansätzen mit jeweils ca. 100 initial in HeLa-Zellen hergestellten SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P oder - Δ L Viruspartikeln bzw. als Kontrolle für die erfolgreiche Vermehrung replikationsfähiger SeV in H29 Zellen mit etwa 100 SeV-eGFP Viruspartikeln infiziert. Nach einer 1-stündigen Adsorptionsphase erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM mit 10 % FKS und die Zellen wurden bei 33 °C weiter inkubiert. Im Zeitraum von 1 bis 10 d p.i. erfolgte die Untersuchung auf Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ X durch Nachweis einer schweifartigen Ausbreitung der fluoreszierenden Zellen (Spotbildung), ausgehend von einer initial infizierten H29 Zelle.

Im Kontrollansatz konnte eine Vermehrung von SeV-eGFP, ausgehend von singularär fluoreszierenden Zellen 1 d p.i. zu Spots mit bis zu 50 fluoreszierenden Zellen 3 d p.i. beobachtet werden. Damit war sichergestellt, dass es durch den gewählten Versuchsaufbau zu einer Vermehrung von SeV kommt.

In H29 Zellen infiziert mit SeVV-eGFP- Δ N oder - Δ L kam es nur zu einer Expression von eGFP in solchen H29 Zellen, die initial mit SeVV-eGFP- Δ N oder - Δ L infiziert worden waren, eine Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N oder - Δ L konnte aber auch 10 d p.i. nicht festgestellt werden. Trotz mehrmaliger Wiederholung des Versuches konnte keine Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ N oder - Δ L beobachtet werden. Die Expression von eGFP in H29 Zellen, die mit initial hergestellten SeVV-eGFP- Δ N oder - Δ L Partikeln infiziert worden waren, zeigt, dass die Virusmutanten die entsprechenden Zellen infizieren konnten und dass die SeV Proteine die Transkription der N- und L-Deletionsmutanten unterstützen. Für eine Replikation der Deletionsmutanten sind die synthetisierten Proteinmengen aber offensichtlich nicht ausreichend.

Im Ansatz mit SeVV-eGFP- Δ P konnten 1 d p.i. an die hundert initial infizierte Einzelzellen detektiert werden. 3 d p.i. hatten sich etwa 70 % der fluoreszierenden Einzelzellen zu Spots, mit bis zu 30 fluoreszierenden Zellen, entwickelt. Damit konnte eindeutig eine Verbreitung von SeVV-eGFP- Δ P auf

umliegende H29 Zellen beobachtet werden. Somit ist es erstmals möglich einen viralen SeV Vektor, der im P-Gen des Polymerase-Komplexes deletiert ist, zu vermehren. Auf die Charakterisierung der Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P soll im folgenden Unterpunkt eingegangen werden.

3.3.3.3 Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P in H29 Helferzellen

SeVV-eGFP- Δ P kann durch die von H29 Helferzellen produzierten SeV P-Proteine amplifiziert werden. Die freigesetzten P-Deletionsmutanten sind in der Lage, umliegende H29 Zellen zu infizieren. Die Ausbreitung von SeVV-eGFP- Δ P sollte nun im Vergleich zu der Ausbreitung des replikationskompetenten SeV-eGFP analysiert werden.

Hierzu wurden 1×10^6 H29 Zellen mit durchschnittlich 100 SeVV-eGFP- Δ P oder SeV-eGFP infiziert. Nach einer 1-stündigen Adsorptionsphase erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM mit 10 % FKS. Die Zellen wurden bei 33 °C für mehrere Tage inkubiert, wobei alle 2 d ein Mediumwechsel erfolgte, um die Vitalität der H29 Zellen aufrecht zu erhalten. 3, 5 und 10 d p.i. erfolgte die Detektion von grün fluoreszierenden Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes. Die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P (A) ist im Vergleich zu SeV-eGFP (B) in Abb. 18 dargestellt.

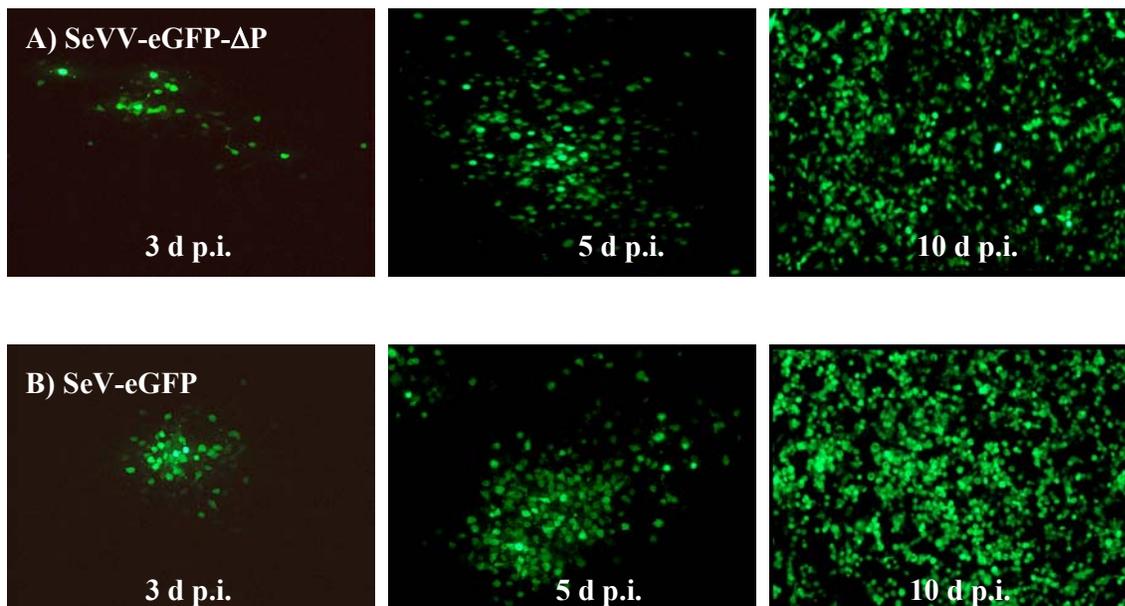


Abb. 18: Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P im Vergleich zu SeV-eGFP während Passage 1 auf H29 Zellen.

H29 Zellen wurden mit SeVV-eGFP- Δ P (A) und mit SeV-eGFP (B) infiziert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in DMEM mit 10 % FKS, ein Mediumwechsel fand alle 2 d statt.

Eine Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P konnte erfolgreich durch die zelluläre Bereitstellung von SeV P-Proteinen durchgeführt werden. Zu allen untersuchten Zeitpunkten (3, 5, 10 d p.i.) ist erkennbar,

dass sich SeVV-eGFP- Δ P (A) und SeV-eGFP (B) effizient vermehren. Um die Wachstumskinetik von SeVV-eGFP- Δ P und SeV-eGFP vergleichend quantifizieren zu können, mussten die Virusüberstände in einem einheitlichen Testverfahren titriert werden.

3.3.3.4 Wachstumskinetik von SeVV-eGFP- Δ P in H29 Helferzellen

Die Wachstumskinetik von SeVV-eGFP- Δ P auf H29 Zellen sollte mit der von SeV-eGFP verglichen werden, um die Effizienz der Virusvermehrung definieren zu können.

Die Titrierung der Virusüberstände von SeVV-eGFP- Δ P und von SeV-eGFP erfolgte, analog zum KID-Test, durch den ZID-Test (Zell-Infektions-Dosistest 5.2.2.7) über eine serielle Verdünnungsreihe der Virussuspension (1:4) auf H29 Zellen. Anstelle der Detektion von SeV HN-Oberflächenprotein durch Bindung von Erythrozyten an virusinfizierte Zellen, beruht der ZID-Test auf der Bestimmung von eGFP-exprimierenden, infizierten H29 Zellen (siehe 5.2.2.7).

Um die Virusfreisetzung von SeVV-eGFP- Δ P aus H29 Zellen im Vergleich zum Referenzvirus SeV-eGFP zu ermitteln, wurden 5×10^5 H29 Zellen mit einer MOI = 5 mit SeVV-eGFP- Δ P oder SeV-eGFP infiziert. Nach 1-stündiger Adsorption erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM mit 10 % FKS. Die Ansätze wurden für 120 h bei 33 °C inkubiert. Alle 24 h erfolgte die Abnahme der Überstände. Die Anzahl infektiöser Partikel in den einzelnen Überständen konnte im anschließenden ZID-Test (5.2.2.7) ermittelt werden, indem von jeder Probe zwei Verdünnungsreihen angelegt wurden und aus deren Ergebnissen ein Mittelwert gebildet wurde. Der zeitliche Verlauf der Freisetzung infektiöser Viruspartikel (VP/ ml) ist in Abb. 19 grafisch dargestellt.

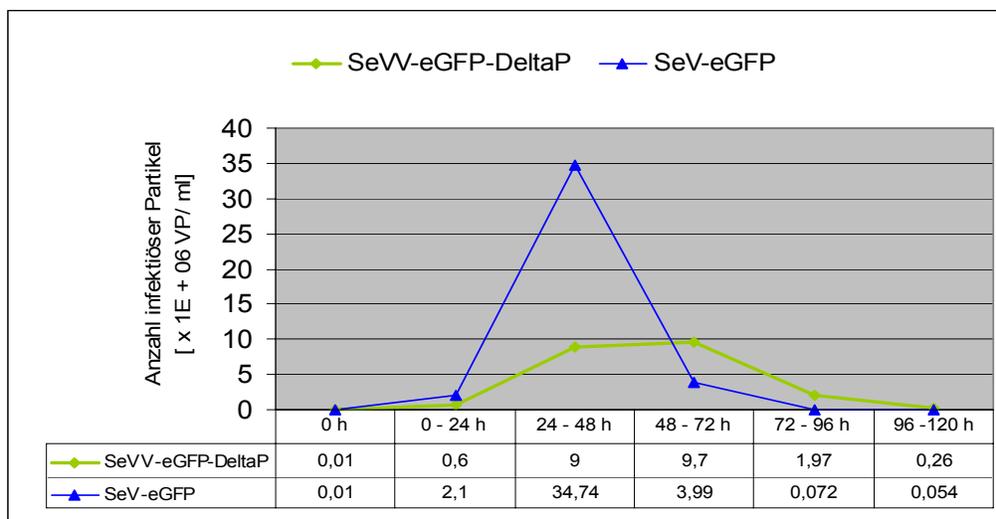


Abb. 19: Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ (Delta)P und SeV-eGFP auf H29 Zellen.

5×10^5 H29 Zellen wurden mit einer MOI 5 mit SeVV-eGFP- Δ P oder SeV-eGFP infiziert. Im Abstand von 24 h wurden in einem Zeitfenster von 120 h die Zellkulturüberstände im ZID-Test (5.2.2.7) auf freigesetzte Viruspartikel (VP) untersucht. Die Menge an Nachkommenviren wurde als infektiöse Viruspartikel pro ml angegeben.

Bei einer Infektion von H29 Zellen mit SeVV-eGFP- Δ P konnten nach 120 h insgesamt $21,5 \times 10^6$ freigesetzte Viruspartikel (VP) detektiert werden, was im Durchschnitt einer Produktion von 43 VP pro infizierte Zelle entspricht. Die maximale Ausschleusung von SeVV-eGFP- Δ P findet im Zeitraum von 24 – 72 h p.i. statt.

Durch die Infektion von 5×10^5 H29 mit SeV-eGFP konnte über 120 h eine Gesamtzahl von 41×10^6 VP detektiert werden, pro infizierter H29 Zelle werden demnach durchschnittlich 82 Viruspartikel im Zeitraum von 120 h freigesetzt. Im Fall von SeV-eGFP findet die maximale Virusausschleusung im Zeitabschnitt von 24 bis 48 h p.i. statt.

H29 Zellen, die mit SeVV-eGFP- Δ P infiziert sind, produzieren demzufolge etwa 50 % an Nachkommenviren im Vergleich zum Kontrollvirus SeV-eGFP. Durch Infektion einer T75 Flasche ($\sim 20 \times 10^6$ H29 Zellen) mit SeVV-eGFP- Δ P konnten nach 5-tägiger Inkubation maximal 1×10^9 Viruspartikel isoliert werden. Demzufolge ist die Produktion an SeVV-eGFP- Δ P in H29 Zellen an sich effizient. Problematisch ist eher die Tatsache, dass H29 Zellen im Vergleich zu anderen Zelltypen nur wenig Viruspartikel produzieren. Bezogen auf die Produktion von SeV wt setzen Verozellen etwa 10 mal mehr und CHO-Zellen etwa 7 mal mehr wt Viruspartikel frei (siehe 3.3.3.1.4).

Da geplant war, auf Basis der Virusmutante SeVV-eGFP- Δ P eine Vakzine zu entwickeln, musste deren Produktion in Helferzellen möglichst optimal sein: Aus den unter 3.3.2 geschilderten Untersuchungen der Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P durch virale Transkomplementation mit rekombinantem Vaccinia Virus, welches das SeV P-Protein stabil exprimiert, geht hervor, dass SeVV-eGFP- Δ P durch die ausschließliche Bereitstellung dieses Proteins vermehrbar sein sollte. Da aus früheren Arbeiten der Aufwand der Herstellung einer einfach stabil transfizierten Zelllinie als nicht allzu groß eingeschätzt wurde, sollte durch die Etablierung einer weiteren P-Helferzelle, ausgehend von einer effizient SeV-produzierenden Zelllinie, versucht werden, die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P noch zu verbessern.

3.3.4 Etablierung einer weiteren Helferzelle zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P

Replikations-defiziente SeVV-eGFP- Δ P Vektoren konnten mit Hilfe des H29-Helfersystems zu Titern vermehrt werden, die für vorklinische Studien ausreichen, für weiterführende klinische Prüfungen aber zu gering sind. So gab es für die Etablierung einer neuen Helferzelle mehrere Gründe: Helferzellen für

die Produktion viraler Vektoren, welche im human-medizinischen Bereich Anwendung finden sollen, müssen nach „*good medical practice*“ (GMP)-Kriterien charakterisiert sein. Für H29 Zellen bzw. auch für die ihr zugrunde liegende 293 Zelle wurde diese Charakterisierung noch nicht durchgeführt und ist sehr aufwendig. Andere Zelllinien, wie z.B. CHO-Zellen, wurden dieser Charakterisierung bereits unterzogen und können deshalb leichter als Produktionszellen eingesetzt werden. Zum anderen ist die Zelllinie H29 bei der Kultivierung empfindlich und zeigt eine verminderte Virusreplikation, was sich negativ bei einer Virusvermehrung im großen Maßstab auswirken würde. Deswegen sollte versucht werden, die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P durch Transkomplementation mit einer neuen Helferzelle weiter zu optimieren.

3.3.4.1 Bereitstellung der Ausgangszelllinie

Für die Herstellung einer neuen Helferzelllinie zur verbesserten Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P sollten CHO-Zellen verwendet werden. Die Verwendung von Verozellen als Grundlage für die zu etablierende Helferzelle wurde parallel diskutiert, schließt sich aber aufgrund der im Folgenden aufgeführten Kriterien aus. Die Auswahlkriterien sollen in aufsteigender Gewichtung, vergleichend zu der Verwendung von Verozellen, kurz aufgeführt werden:

- * Gute Transfizierbarkeit
- ** Effiziente Virusproduktion
- *** GMP (*good medical practice*)-Standard

Die Effektivität der Transfektion ist ein wesentlicher Faktor bei der Herstellung stabil transfizierter Zellen. Die Transfektionseffizienz hängt unter anderem vom verwendeten Zelltyp ab. Verozellen erweisen sich generell als sehr schwer transfizierbar, was sich in einer verringerten Wahrscheinlichkeit der Selektion passender Zellklone bemerkbar machen kann; CHO-Zellen dagegen zeigen sich einer Transfektion sehr zugänglich (Auer, 2003).

Wichtiger als die Transfektionseffizienz ist eine optimale Virusproduktion in der verwendeten Zelllinie. Durch die unter 3.3.3.1.4 beschriebenen Untersuchungen zur Virusproduktion in Vero- und CHO-Zellen konnte ermittelt werden, dass bezogen auf die Produktion von SeV wt Verozellen etwa 10 mal mehr und CHO-Zellen etwa 7 mal mehr wt Viruspartikel freisetzen als H29 Zellen (siehe 3.3.3.1.4).

Der dritte Punkt, die Auswahl einer zu transfizierenden Zelllinie nach GMP-Standard, ist der entscheidende Punkt für die Wahl der CHO-Zellen zur stabilen Transfektion: „GMP“ bedeutet „*good medical practice*“. Helferzellen zur Vermehrung rekombinanter viraler Vektoren im medizinischen

Bereich müssen Kriterien erfüllen, um für derartige Anwendungen zugelassen zu werden. CHO-Zellen sind bereits als GMP-standardisierte Zelllinie zugelassen. Die Anmeldung einer neuen, stabil transfizierten CHO-Zelllinie würde demnach in ihrem Prüfverfahren weniger aufwendig und damit weitaus kostengünstiger ausfallen als eine nicht dem GMP-Standard entsprechende Verozelle. Da CHO-Zellen sehr gut transfizierbar sind, eine effiziente Virusproduktion garantieren und dem GMP-Standard entsprechen, sollten diese Zellen für die Etablierung der neuen Helferzelle zur Produktion von SeVV-eGFP- Δ P verwendet werden.

3.3.4.2 Bereitstellung des Expressionsvektors

In den unter 3.3.2 beschriebenen Versuchen zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P durch heterologe Transkomplementation war ermittelt worden, dass die alleinige Expression des P-Proteins in einer SeVV-eGFP- Δ P-infizierten Zelle dessen Replikation unterstützt. Die neu zu etablierende Helferzelle sollte wegen der Insertion nur eines Fremdgens (P-Gen) im Vergleich zur 3-fach transfizierten H29 Zelle weniger belastet werden.

Für die neu zu etablierende Helferzelle zur Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P sollte ein Expressionsplasmid ausgewählt werden, welches die Expression des viralen P-Gens durch kodierte Promotor- und Enhancer-Elemente verstärkt unterstützen soll: Der für die Transfektion der CHO-Zellen eingesetzte Expressionsvektor ist pcDI18, ein 1998 in unserer Arbeitsgruppe hergestelltes Plasmid zur stabilen Transfektion von Zellen. pcDI18 besitzt wie das zur Transfektion von H29 Zellen eingesetzte pSC-Expressionsplasmid den humanen Cytomegalovirus(hCMV)-Promotor. Eine in pcDI18 zusätzlich eingebaute Intron A-Region aus hCMV und ein Terminationssignal sollen durch eine positive Regulation von Enhancer/Promotor-Elementen sowie durch Stabilisierung von mRNA die Genexpression weiter verstärken (Abb. 20) (Chapman et al., 1991). Aus Ergebnissen einer Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe, in der die Expressionsstärke der Plasmide pSC und pcDI verglichen wurden, ging hervor, dass die Anwesenheit des IntronA-Elementes die Expressionsstärke eines Fremdgens deutlich erhöht (Fischer, 1998).

Ausgehend von einem früher hergestellten Expressionsplasmid pcDI18-M, in welches der SeV-M ORF über die singulären Restriktionsschnittstellen *Xho I* und *Kpn I* eingebaut worden war, konnte das Plasmid pcDI18-P hergestellt werden: Durch Restriktionsverdau von pcDI18-M mit den Enzymen *Kpn I* und *Xho I* wurde der M-ORF aus pcDI18-M entfernt. Über eine PCR-Reaktion wurde der P-ORF ab dem ATG-Codon amplifiziert und die Restriktionsschnittstellen *Kpn I* und *Xho I* wurden am 5'- bzw. 3'-Bereich durch mutagene Primer angefügt. Nach Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit *Kpn I* und *Xho I* konnte der Leserahmen des P-Gens durch Ligation in pcDI18 integriert werden (pcDI18-P). Nach Transformation von *E.coli* und Plasmid-Mini-Präparation konnte die erhaltene Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau und Sequenzierung des P-ORFs auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

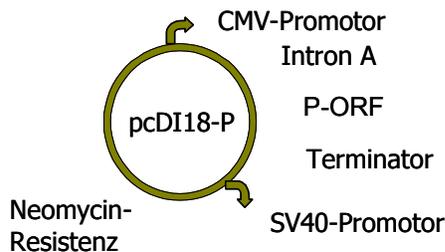


Abb. 20: Darstellung des Expressionsplasmids pcDI18-P.

Wie unter 2.7.2.1 erläutert, kodiert das P-Gen auch für sieben Nichtstrukturproteine. Der ORF des P-Leserahmens wurde ab dem ATG-Start-Codon bis zum Stopp-Codon in pcDI18 integriert. Das Start-Codon des Leserahmens des Nichtstrukturproteins C', welches vor dem ATG des P-Gens liegt, wurde somit nicht integriert. Es wurde erwartet, dadurch die Expression des P-Gens in der Helferzelle weiter verstärken zu können.

Da aus Literaturangaben bekannt war, dass die Proteine der C-Familie für die Unterdrückung der Interferon-induzierten Immunantwort verantwortlich sind und diese Funktion für den vorliegenden Anwendungsbereich keine Rolle spielt, konnte auf die Synthese des C'-Proteins verzichtet werden.

3.3.4.3 Transfektion von CHO-Zellen und Selektion resistenter Zellklone

Für die Herstellung stabil transfizierter, monoklonaler Zelllinien wurden CHO-Zellen am Vortag der Transfektion zu einer Konfluenz von 20 - 30 % in einer 35 mm-Schale ausgelegt. Die Zellen wurden mit 2,5 µg pcDI18-P mit Hilfe des Reagens LipofectACETM transfiziert (5.2.1.4). 48 h nach Transfektion wurde mit der Selektion Neomycin-resistenter Klone begonnen. In Vorversuchen hatte sich eine Neomycin-Konzentration von 400 µg/ml im Kulturmedium F12 als optimal geeignet herausgestellt, um nicht-resistente Zellen nach 4 – 5 d abzutöten.

Es wurden in einem Zeitraum von 4 Wochen über 30 Neomycin-resistente CHO-Klone isoliert. Durch Western Blot-Analyse sollte nun ermittelt werden, ob die Neomycin-resistenten Klone auch die genetische Information für das P-Protein stabil in ihr Genom aufgenommen hatten.

3.3.4.4 Nachweis der Synthese des P-Proteins in CHO-Zellen

Die stabile Expression des P-Gens sollte durch den Nachweis von P-Protein mittels Western Blot-Analyse gezeigt werden. Dazu wurden Zellextrakte der CHO-Klone in der SDS-PAGE aufgetrennt und das virale P-Protein durch Western Blot-Analyse nachgewiesen. In Abb. 21 ist die Detektion des P-Proteins durch Western Blot-Analyse von 18 CHO-Klonen dargestellt.

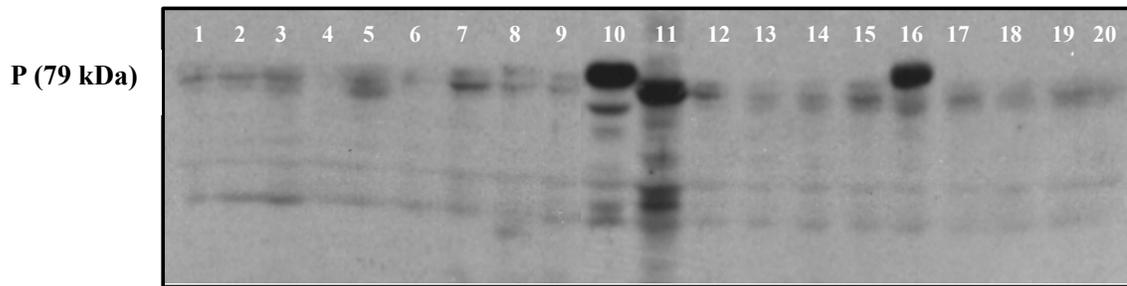


Abb. 21: Nachweis der Synthese von P-Protein in CHO-Zellen.

Zellextrakte von 18 Neomycin-resistenten CHO-Klonen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde das P-Protein im Western Blot nachgewiesen. Pro Spur wurden 20 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Spuren 1 – 9: CHO-Klone # 1-9, Spuren 12 – 20: CHO-Zellklone # 10 - 18, Spur 10: H29 Zellen, Spur 11: SeV-infizierte CHO-Zellen (MOI = 0,3; 24 h p.i.).

Als Kontrolle für die zelluläre Expression des P-Proteins wurden 20 μ g Gesamtprotein von H29 Zellen als Probe aufgetragen (Spur 10). Als Kontrolle für die virale Expression wurden CHO-Zellen mit einer MOI von 0,3 mit SeV wt infiziert (Spur 11) und 24 h nach Infektion erfolgte die Ernte dieser Zellen. Von Willenbrink (Willenbrink & Neubert, 1994) wurde ermittelt, dass H29 Zellen etwa 10 % an P-Protein im Vergleich zu SeV wt infizierten CV-1 Zellen exprimieren. Die hier gezeigte vergleichbare Intensität der Banden in den Spuren 10 und 11 kommt daher, dass in diesem Versuch die CHO-Zellen nur mit einer MOI von 0,3 infiziert worden waren und daher 24 h nach Infektion nur ein Bruchteil an P-Protein synthetisiert war im Vergleich zu CV-1 Zellen, die mit einer MOI von 1 infiziert sind. 9 der 18 CHO-Klone zeigen eine schwache P-Protein Expression. In einem der Klone, CHO-P14 (Spur 16), konnte eine starke Expression des P-Proteins detektiert werden. Bei diesem Klon CHO-P14 beträgt die Expressionsstärke ca. 90 % der P-Protein Menge von MOI 0,3 infizierten CHO-Zellen (Spur 11) und etwa 70 % der P-Protein Menge, welche in H29 Zellen exprimiert wird (Spur 10).

Es ist weiter festzuhalten, dass viral kodiertes P-Protein (niedrigere Bande, Spur 11) gegenüber zellulär kodiertem P-Protein ein leicht verändertes Laufverhalten aufweist (Spuren 10, 16). Dieses etwas höhere apparente Molekulargewicht tritt sowohl in H29 Zellen, als auch in CHO-P14 Zellen auf, unabhängig von dem für die Transfektion verwendeten P-Plasmid. Die Intaktheit der Sequenz des P-Gens in CHO-P14 Zellen wurde durch Sequenzierung nochmals bestätigt. Somit scheint dieser Effekt vielmehr die Folge einer unterschiedlichen posttranslationalen Modifikation des P-Proteins zu sein. Ein derartigen Effekt konnte Willenbrink auch bei der Herstellung stabil N-Protein exprimierender Zellen auf Basis von LTK⁻-Zellen feststellen (Willenbrink, 1991).

Der Zellklon CHO-P14 wurde monoklonalisiert (5.2.1.6), wobei sich aber die Synthese von P-Protein nicht weiter steigern ließ. Trotz der im Vergleich zu H29 Zellen leicht reduzierten Expression des P-

Proteins in CHO-P14 Zellen sollte nun untersucht werden, ob die Helferzelllinie CHO-P14 für die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P herangezogen werden kann. Wäre es möglich SeVV-eGFP- Δ P mit Hilfe der Helferzelle CHO-P14 zu vermehren, sollte die Virusausbeute wegen der verbesserten Virusproduktion in CHO-Zellen deutlich erhöht sein und damit das Vermehrungssystem entscheidend verbessert werden.

3.3.4.5 Untersuchung der Replikation von SeVV-eGFP- Δ P in CHO-P14 Helferzellen

Die Helferzelllinie CHO-P14 exprimiert stabil das SeV P-Protein und sollte für die Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ P herangezogen werden. Da CHO-Zellen eine 7-fach höhere Effizienz bei der Freisetzung von Viruspartikeln im Vergleich zu H29 Zellen aufweisen (3.3.3.1.4), sollte die Effizienz der Virusfreisetzung im Vergleich zu den bereits etablierten H29 Helferzellen optimiert werden. Um zu untersuchen, wie gut die Helferzelle CHO-P14 die Vermehrung durch zelluläre Transkomplementation unterstützt, sollten CHO-P14 Helferzellen mit SeVV-eGFP- Δ P infiziert werden. Eine Ausbreitung der Vektoren sollte anschließend durch Zunahme grün fluoreszierender, infizierter Zellen nachgewiesen werden.

5×10^5 CHO-P14 Zellen wurden mit SeVV-eGFP- Δ P und dem Kontrollvirus SeV-eGFP (MOI = 0,2) in zwei verschiedenen Ansätzen infiziert. Nach 1-stündiger Inkubation bei 33 °C erfolgte ein Mediumwechsel mit F12 + 10 % FKS. Die Ansätze wurden bei 33 °C inkubiert. 2, 5 und 10 d p.i. erfolgte die Untersuchung der infizierten CHO-P14 Zellen im Fluoreszenzmikroskop.

Im Ansatz der Positivkontrolle, CHO-P14 infiziert mit SeV-eGFP, konnte bereits 2 d p.i. eine Vermehrung von SeV-eGFP durch die Zunahme grün fluoreszierender Zellen beobachtet werden. Im Ansatz CHO-P14 infiziert mit SeVV-eGFP- Δ P konnte hingegen weder eine Ausbreitung von SeVV-eGFP- Δ P, noch initial infizierte, grün fluoreszierende Helferzellen detektiert werden. Trotz mehrmaliger Versuchswiederholung konnte durch CHO-P14 Zellen keine Transkription und Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ P erreicht werden. Bei der Coinfektion von Verozellen mit der Deletionsmutante SeVV-eGFP- Δ P und rekombinantem Vaccinia Virus, welches das SeV P-Protein exprimiert (VV-P), war nach mehrtägiger Inkubation eine Zunahme grün fluoreszierender Zellen beobachtet worden (siehe 3.3.2). Daher wurde davon ausgegangen, dass SeVV-eGFP- Δ P durch die alleinige Bereitstellung von P-Protein vermehrbar ist. Die stabile, zelluläre Expression des SeV P-Proteins führt aber im hier beschriebenen Ansatz nicht zur gewünschten Vermehrung. Das P-Gen aus CHO-P14 Zellen war durch Sequenzierung überprüft worden und wies keine Mutationen auf, die zu Aminosäureaustauschen führen, daher sollte das in CHO-P14 exprimierte P-Protein funktionell sein. Das Zusammenspiel zwischen P-Protein Expression und SeVV-eGFP- Δ P-Replikation ist offensichtlich noch komplexer als zunächst angenommen.

Durch die neu etablierte Helferzelllinie CHO-P14 konnte folglich keinerlei Produktion des viralen Vektors SeVV-eGFP- Δ P erlangt werden, ohne dass die molekularen Gründe verstanden wurden, die zum Versagen der CHO-P14 Zellen bei der Transkomplementation der Virusmutanten führen. Von einer erneuten Etablierung einer Helferzelle wurde zunächst abgesehen, da die für vorklinische Untersuchungen notwendigen Virusmengen notfalls auch mit Hilfe der Helferzelle H 29 produziert werden können. Für den weiteren Fortgang des Projektes erschien es jetzt wichtiger, die Genexpression des viralen Vektors zu untersuchen.

3.4 Genexpression in SeVV-eGFP- Δ P infizierten Zielzellen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines Sendai-Virus Vektors (SeVV) als Prototyp für einen viralen Vakzinierungsvektor: Der Vektor SeVV-eGFP- Δ P konnte durch zelluläre Transkomplementation in H29 Zellen mit Titern bis 10^8 Vektorpartikel pro ml vermehrt werden, die für die nachfolgenden Untersuchungen ausreichend waren. Die Transgenexpression sollte mit in H29 Zellen amplifizierten SeVV-eGFP- Δ P Vektoren im Folgenden untersucht werden.

3.4.1 eGFP-Expression in SeVV-eGFP- Δ P infizierten Zielzellen

Das Transgen eGFP ist in SeVV-eGFP- Δ P im 3'-Bereich des Genoms stellvertretend für ein später einzusetzendes Antigen eingebaut. Während der Amplifikation des Vektors in H29 Zellen, welche durch die Bereitstellung P-Proteins die Genomreplikation des Vektors unterstützen, wird das Transgen eGFP effizient exprimiert. Nun sollte nach SeVV-eGFP- Δ P Infektion von Verozellen, welche das fehlende P-Protein nicht zur Verfügung stellen und im Folgenden auch als „Zielzellen“ bezeichnet werden, die Expression des Reportergens eGFP detektiert werden. Aus der Stärke der Expression des eGFP-Transgens sollen Parallelen gezogen werden zur Synthese eines später kodierten Antigens. Um das Reporterprotein eGFP mittels Fluoreszenzmikroskopie detektieren zu können, müssen etwa 10^6 Moleküle pro infizierter Zelle vorhanden sein, d.h. eine deutliche eGFP-Expression wäre ein Indiz dafür, dass später eingefügte Antigene ebenfalls mit hoher Effizienz exprimiert werden.

5×10^5 Verozellen wurden mit einer MOI von 5 mit SeVV-eGFP- Δ P infiziert. Die Detektion der Expression des Reportergens eGFP erfolgte erstmals 48 h p.i., ein Zeitraum, der ausreichen sollte, um eGFP in ausreichender Menge zu synthetisieren (siehe Abb. 18 A). Die Ansätze wurden über weitere 8 Tage inkubiert und auf zunehmende fluoreszierende Zellen untersucht. Zum einen sollte damit eine eventuell verspätet auftretende Expression detektiert werden. Gleichzeitig sollte sichergestellt werden, dass sich der virale Vektor von den infizierten Zielzellen nicht weiter ausbreiten kann.

Bei 50 der 5×10^5 infizierten Verozellen (= 0,01 %) konnte 2 bis 10 d p.i. das eGFP-Protein durch Fluoreszenz detektiert werden. Da keinerlei Zunahme grün fluoreszierender Zellen beobachtet werden konnte, wurde die Replikations-Defizienz von SeVV-eGFP- Δ P in diesem Experiment bestätigt. Eine maximale Fluoreszenz konnte an Tag 3 beobachtet werden, danach nahm die Intensität, soweit visuell quantifizierbar, ab. Nach 10-tägiger Inkubationszeit konnte die eGFP-Expression nicht mehr weiterverfolgt werden, da sich die Verozellen vom Boden der Kulturschale abgelöst hatten. Aus Literaturangaben ist bekannt, dass das eGFP-Protein eine Halbwertszeit von 24 h besitzt (www.bdbiosciences.com/clontech/gfp/index.shtml). Demnach könnte eine über 10 d detektierbare Fluoreszenz auf eine mehrere Tage aktive Transkription sowie Neusynthese von eGFP-Protein hinweisen. Der Versuch bestätigt gleichzeitig die Annahme, dass P-Gen-defiziente SeV Vektoren zu einer Transkription in infizierten Zielzellen fähig sind.

Es konnte jedoch nur in 0,01 % der infizierten Zellen eine eGFP-Expression beobachtet. Warum es nur in einem so niedrigen Prozentsatz der infizierten Zellen zur Expression von eGFP kommt, wird unter Punkt 3.4.3 weiter untersucht.

Zunächst sollte neben der Expression des Reporterproteins eGFP in SeVV-eGFP- Δ P infizierten Verozellen auch die Expression des viralen HN-Proteins untersucht werden. Das Gen des eGFP-Proteins wurde im 5'-Bereich des viralen Genoms an erster Stelle positioniert, das Gen des HN-Proteins liegt im SeVV-eGFP- Δ P Genom an Position fünf. Wegen des natürlichen Transkriptionsgradienten werden Gene im 5'-Bereich stärker transkribiert. Es ist daher sinnvoll, ebenfalls die Expression von Genen, die vom genomischen 5'-Bereich entfernt liegen, zu untersuchen, um dadurch festzustellen, ob deren ausreichende Expression in infizierten Zielzellen stattfindet. Das HN-Protein von SeV stellt eine wichtige Antigen determinante dar und das entsprechende Gen kann in weiterführenden Studien durch das HN-Gen anderer Paramyxoviren ersetzt werden.

3.4.2 HN-Expression auf SeVV-eGFP- Δ P infizierten Zielzellen

Das HN-Protein ist ein spezifisches Antigen verschiedener Paramyxoviren. Seine Präsentation auf infizierten Zellen ist eines der Ziele bei der Entwicklung eines viralen Vektors im Vakzinierungsbereich. Wird das an Position fünf im Vektorgenom positionierte HN-Gen erfolgreich exprimiert, kann davon ausgegangen werden, dass an dieser Position eingesetzte Antigene heterologer Viren bei späteren Anwendungen des Vektors ebenso effizient exprimiert werden.

Die Expression des viral kodierte HN-Proteins auf der Zelloberfläche von SeV infizierten Zellen kann im HAD-Test (5.2.2.5) durch Bindung von humanen Erythrozyten an die Zelloberfläche detektiert werden. An der Zelloberfläche einer SeV wt infizierten Verozelle werden bis zu fünfzig Erythrozyten gebunden (Daten nicht gezeigt), wobei zahlreiche HN-Proteine in Form von Tetrameren

exponiert sein müssen. Demzufolge ist ein positiver HAD-Test der Nachweis für eine stärkere virale Genexpression als die durch weniger eGFP-Moleküle hervorgerufene, positive Fluoreszenz.

Mit SeVV-eGFP- Δ P infizierten Verozellen (siehe 3.4.1) wurde nun ein HAD-Test (5.2.2.5) zur Detektion des viralen HN-Proteins durchgeführt. Infizierte Zellen wurden mit einer 1%igen Erythrozytenlösung überschichtet und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Um nach der einstündigen Inkubation bei 4 °C nichtgebundene Erythrozyten von den Zelloberflächen zu entfernen, wurden diese mehrmals mit DMEM gewaschen. Anschließend wurde unter dem Mikroskop die Anzahl HAD-positiver Verozellen ausgezählt.

Von 50 eGFP-exprimierenden Verozellen konnten 25 Einzelzellen identifiziert werden, die 10 bis 30 Erythrozyten auf ihrer Zelloberfläche gebunden hatten. Demnach präsentieren diese 25 Zellen HN-Proteine extrazellulär in einer Menge, die die Bindung von humanen Erythrozyten zulässt.

In Abb. 22 ist eine SeVV-eGFP- Δ P infizierte Verozelle dargestellt, die sowohl das eGFP-Protein exprimiert (A) als auch das HN-Protein, welches auf ihrer Zelloberfläche exponiert wird und Erythrozyten bindet (B).

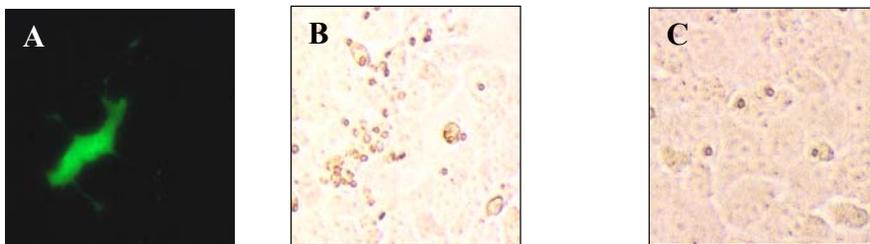


Abb. 22: Detektion der eGFP- und HN-Expression in SeVV-eGFP- Δ P infizierten Verozellen.

5×10^5 Verozellen wurden mit SeVV-eGFP- Δ P (MOI = 5) infiziert und bei 33 °C in DMEM mit 10 % FKS inkubiert. 2 d p.i. erfolgte die Detektion des eGFP-Proteins mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes (A) und die Detektion von HN-Proteinen mit Hilfe des HAD-Testes (B). Bild (C) zeigt die Negativkontrolle des HAD-Testes mit nicht infizierten Verozellen.

Die Zielvorgabe einer Expression viraler Proteine in einer SeVV-eGFP- Δ P infizierten Zelle war somit erreicht. Die HN-Expression auf den infizierten Zellen ist zwar geringer als auf wt infizierten Zellen (bis 30 Erythrozyten), sollte aber als immunologisches Stimulans ausreichend sein. Allerdings wäre der Anteil Transgen-exprimierender Zellen nach Infektion mit SeVV-eGFP- Δ P Vektoren voraussichtlich zu gering, um bei einer Vakzinierung eine ausreichende Immunantwort auszulösen. Es musste folglich versucht werden, den viralen Vektor dahingehend zu optimieren, dass er eine nachweisbare Expression in deutlich mehr Zielzellen erbringt (siehe 3.6). Um dies zu ermöglichen, sollten zunächst Gründe für die geringe Expressionsrate gesucht werden.

3.4.3 Überlegung zur geringen Anzahl Transgen-exprimierender Zielzellen

Nur 0,01 % der SeVV-eGFP- Δ P infizierten Verozellen waren in der Lage das Transgen eGFP sichtbar zu exprimieren (siehe 3.4.1). Die These, dass 0,01 % der SeVV-infizierenden Partikel mit besseren Polymerase-Komplexen ausgestattet sind, war unwahrscheinlich, da es sich um eine homogene Viruspopulation, gewachsen auf monoklonalen H29 Helferzellen, handelt.

Die Verozellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert, d. h. durchschnittlich sollte jede Verozelle mit 5 SeVV-eGFP- Δ P Partikeln infiziert worden sein. Diese Überlegung spiegelt aber nicht die Realität wider: Bei einer Virusinfektion ist ein Teil der Zellen mit weniger Viren infiziert, als es der Durchschnitt vorhersagen würde, ein anderer Teil der Zellen mit mehr Viren. Der geringe Anteil von 0,01 % eGFP-exprimierender Verozellen könnte nun dadurch erklärt werden, dass eine eGFP-Expression nur dann zustande kommt, wenn diese Verozellen durch die Infektion mehr als fünf SeVV-eGFP- Δ P-Nukleokapside aufgenommen haben. Es galt also herauszufinden, wie viele Nukleokapside erforderlich sind, um bei einer MOI von 5 mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,01 % eine Transgenexpression zu erreichen.

Durch das Gesetz von Poisson (P) kann berechnet werden, wie viele Viruspartikel und damit Nukleokapside(n) bei einer Infektion mit einer bestimmten MOI (m), abweichend von einer durchschnittlichen Verteilung, eine Zelle infizieren:

$$P(n) = \frac{m^n \cdot e^{-m}}{n!}$$

Bei einer Infektion mit einer MOI von 5 beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass 15 Nukleokapside simultan in eine Zelle gelangen 0,01 %. Daraus kann gefolgert werden, dass es nur dann zu einer sichtbaren eGFP-Expression kommt, wenn 15 oder mehr SeVV-eGFP- Δ P-Nukleokapside gleichzeitig in einer infizierten Verozelle vorhanden sind.

Wenn die detektierbare eGFP-Expression in 0,01 % der infizierten Zellen nur bei einer Anwesenheit von 15 Nukleokapsiden zustande kommt, dann dürfte eine SeVV-eGFP- Δ P Infektion mit der niedrigen MOI = 1 laut Poisson-Verteilung keine fluoreszierenden Zellen mehr bewirken: In diesem Fall würde die Wahrscheinlichkeit, dass 15 SeVV-eGFP- Δ P-Nukleokapside in eine Verozelle gelangen, nur bei 8×10^{-11} % liegen, in der Kultur mit 5×10^5 SeVV-eGFP- Δ P infizierten Zellen würde ein solches Ereignis nahezu unmöglich sein.

Deshalb wurde eine Kontrollinfektion von Verozellen mit SeVV-eGFP- Δ P mit einer MOI von 1 durchgeführt und 2 d p.i. bis 10 d p.i. wurden die Zellen auf eine eGFP-Expression untersucht. Es konnte keine sichtbare eGFP-Expression detektiert werden.

Dieser Versuch unterstützt die These, dass es nur bei Anwesenheit von 15 oder mehr SeVV-eGFP- Δ P-Nukleokapsiden in einer infizierten Zelle zur Expression des eGFP-Proteins kommt, d.h. die Transgenexpression des einzelnen SeVV-eGFP- Δ P-Nukleokapsids scheint zu gering zu sein.

Der virale Vektor SeVV-eGFP- Δ P musste also modifiziert werden, um in jeder infizierten Zielzelle eine detektierbare Transkriptionsleistung hervorzurufen.

3.5 Modifikationen von SeVV-eGFP- Δ P zur Steigerung der Expression in Zielzellen

Die Transkriptionsleistung des Vektors SeVV-eGFP- Δ P musste verbessert werden, so dass eine Transgenexpression möglichst auch in jeder einfach infizierten Zielzelle sichergestellt wird. Für das Erreichen dieser Zielvorgabe wurden zwei Lösungswege verfolgt:

Ein Weg, die Transgenexpression zu verbessern, könnte darin bestehen, nicht das gesamte P-Gen aus dem Vektor zu entfernen, sondern nur die für die Replikation relevanten Bereiche. So würde das P-Protein in seiner Aktivität in der Zielzelle nur soweit eingeschränkt, dass eine Replikation inhibiert ist, während eine Transkriptionsleistung durch Bereitstellung eines verkürzten P-Proteins mit den entsprechenden funktionellen Domänen erhalten bleibt. Domäne I (As 1-77) des P-Proteins ist bisher die einzig bekannte Domäne, die nur in die virale Genomreplikation, nicht aber die Transkription involviert zu sein scheint (Curran et al., 1994, Curran et al., 1995). *In vitro*-Experimente legen nahe, dass durch Aminosäuren 1 bis 77 des P-Proteins die Bindestelle für N⁰-Protein zur Verfügung gestellt wird. Die sich bildenden N⁰:P-Komplexe sind verantwortlich, dass die SeV Polymerase in den Replikations-Modus schaltet und sorgen dann für die Verpackung naszierender RNA-Genome mit N-Protein. Eine Entfernung dieser Aminosäuren könnte die virale Replikation in der Zielzelle abschalten. Die übrigen funktionellen Domänen (RNA-Synthese, Tetramerisierung, P:L-Komplexierung, P:RNP-Bindung) sind in dem Bereich As 78 – 568 lokalisiert (Abb. 23) und sollten in ihrer Funktion nicht gestört sein, falls sich ein verkürztes P-Protein P Δ 1-77 korrekt faltet.

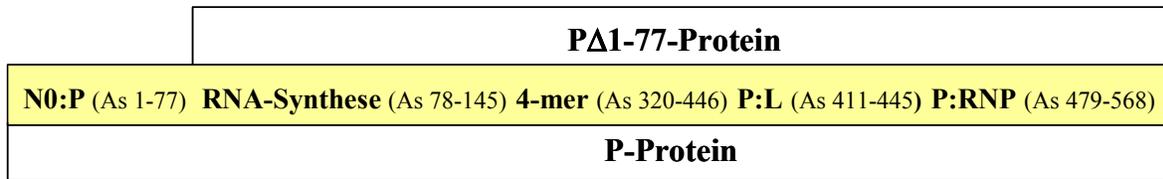


Abb. 23: Darstellung funktioneller Domänen des P-Proteins und des verkürzten Proteins PΔ1-77.

Ein zweiter Weg, die Transgenexpression in der Zielzelle zu verbessern, könnte in der Bereitstellung von Nichtstrukturproteinen bestehen. Durch das P-Gen werden die NS-Proteine C, C', Y1, Y2, X, V und W kodiert. Nichtstrukturproteine üben eine Vielzahl von Funktionen bei der Virusreplikation aus, von denen bisher nur einige identifiziert wurden (2.7.2.1), und könnten in die virale Transkription involviert sein. Auch H29 Zellen, in denen nach Infektion mit SeVV-eGFP-ΔP eine starke eGFP-Expression zu beobachten ist, kodieren für die Proteine der C-Familie (außer C') und das X-Protein (3.3.3.1.5). Den beiden Proteinen V und W werden unter anderem Funktionen bei der Genomreplikation zugeschrieben (Kato et al., 1997a). Ob sie an weiteren Funktionen beteiligt sind, konnte bisher nicht geklärt werden, da die Versuche bis dato immer in Anwesenheit von P-Protein erfolgen mussten. Die Proteine V und W besitzen bis Aminosäure 316 die gleiche Sequenz wie das P-Protein und damit unter Umständen ebenfalls dieselben funktionellen Domänen (2.7.2.1.3): Denkbar wäre eine Beteiligung der Proteine V und W einzeln oder in Kombination an der viralen RNA-Synthese, da sie entsprechende Bereiche mit dem P-Protein gemeinsam haben (Abb. 21, As 78-145). Eine Unterstützung der Verpackung naszierender genomischer RNA und damit des viralen Replikations-Modus ist hingegen nicht zu erwarten, da den Proteinen V und W die Domäne zur Bindung des L-Proteins fehlt (Abb. 23, As 411-445). Durch zusätzliche Kodierung von Genen von Nichtstrukturproteinen im Vektor SeVV-eGFP-ΔP könnte deren Beteiligung an der viralen Transkription untersucht werden. Eine Kodierung der Gene V oder W würde gleichzeitig die Nukleotidsequenz von drei Proteine C, Y1, Y2 der vier Proteine der C-Familie beinhalten (Abb. 8, 2.7.2.1), die auch in H29 Zellen exprimiert werden. Die Gene V und W werden durch den Mechanismus des RNA-Editing in einem mRNA-Verhältnis von 70:25:5 für P:V:W transkribiert (Delenda et al., 1998). Durch Mutationen kann der Mechanismus des RNA-Edittings unterbunden wird (Kato et al., 1997b). Nach Integration der Leserahmen von V oder W mit zerstörtem RNA-Editing-Motiv in die freie Transkriptionskassette von SeVV-eGFP-ΔP würden nur noch V oder W mRNA-Transkripte synthetisiert werden. Somit könnten die Gene V und W erstmals in einem *in vivo*-System getrennt voneinander verstärkt exprimiert werden und deren Einfluss auf die virale Transkription damit eventuell erstmals dargestellt werden.

3.5.1 Herstellung der drei modifizierten SeVV-eGFP- Δ P cDNA Konstrukte

Um die Transkriptionsleistung von SeVV-eGFP- Δ P in der Zelle zu verbessern, sollte an der Position des ursprünglichen P-Leserahmens zum einen der Leserahmen einer um 77 Aminosäuren verkürzten Form des P-Proteins in die cDNA von pSeVV-eGFP- Δ P eingebaut werden (SeVV-eGFP-P Δ 1-77) und zum anderen sollten die Leserahmen der Nichtstrukturproteine V oder W in pSeVV-eGFP- Δ P integriert werden (SeVV-eGFP- Δ P-V, SeVV-eGFP- Δ P-W).

Der Leserahmen des N-terminal um 77 Aminosäuren verkürzten P-Proteins und die Leserahmen der Nichtstrukturproteine V oder W wurden mittels PCR oder Fusions-PCR (siehe 5.2.3.17), ausgehend vom Template pSeV-eGFP unter Einhaltung der *rule of six* hergestellt und durch mutagene Primer mit *Xho I*-Restriktionsschnittstellen versehen, was den Einbau in die nicht-kodierende Transkriptionskassette von pSeVV-eGFP- Δ P an der Position des ursprünglichen P-ORF zulässt. Nach PCR-Synthese, *Xho I*-Restriktionsverdau und Aufreinigung der Fragmente konnten die Leserahmen von V, W und P Δ 1-77 über die *Xho I*-Schnittstelle (siehe 3.2.1) in einen ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *Xho I* behandelten Zwischenvektor kloniert werden und anschließend mit Hilfe der singulären Restriktionsschnittstellen *Sph I* und *Eco47 III* in die Plasmid-DNA von pSeVV-eGFP- Δ P eingefügt werden.

In den Leserahmen von V und W wurde die purinreiche Editierungssequenz (UUUUUCCCC) über PCR-Reaktion dahingehend verändert, dass es in den SeVV-eGFP- Δ P-V/W-infizierten Zellen zu keinem RNA *Editing*-Mechanismus mehr kommt (CUUCUCCUU). Durch die Modifikation der Editierungssequenz wird lediglich in dem durch U₆C₃ kodierten Motiv ein konservativer Austausch der basischen Aminosäure K316R durchgeführt; durch diesen Austausch ist kein Einfluss auf die Funktionen der Proteine V oder W zu erwarten.

3.5.2 Initiale Herstellung der drei modifizierten SeVV-eGFP- Δ P Vektoren

Zunächst war nun zu untersuchen, ob die drei modifizierten Vektoren initial herstellbar sind. Im Bezug auf den Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 stellt sich die Frage, ob die Anwesenheit eines verkürzten P-Proteins P Δ 1-77 schon in der Herstellungszelle einen negativen Effekt mit sich bringt. Die initiale Herstellung von SeVV-eGFP-P Δ 1-77, SeVV-eGFP- Δ P-V und SeVV-eGFP- Δ P-W erfolgte methodisch analog zur Herstellung von SeVV-eGFP- Δ P (siehe 3.2.2.1).

Alle drei viralen Vektoren konnten initial mit gleicher Effizienz wie SeVV-eGFP- Δ P hergestellt werden. Ebenfalls gelang es, alle drei Vektoren mit Hilfe der H29 Helferzellen über mehrere Zell-Zell-

Passagen effizient zu vermehren (Vorgehen siehe 3.3). Der zeitliche Verlauf der Virusfreisetzung wird unter 3.5.4 erläutert.

Um die erwartete Überexpression der Nichtstrukturproteine V und W (3.5) zu untersuchen, sollte die Synthese dieser Proteine in infizierten H29 Zellen detektiert werden.

3.5.3 Detektion der Nichtstrukturproteine V oder W infizierten H29 Zellen

Die Gene V und W werden in mit SeV wt Viren infizierten Zellen durch den Mechanismus des RNA-*Editing* in einem mRNA Verhältnis von 70:25:5 für P:V:W transkribiert (Delenda et al., 1998). Nach Deletion des P-Leserahmens und Integration der Leserahmen der Gene V oder W mit verändertem RNA-*Editing* Motiv in den Vektor SeVV-eGFP- Δ P an der Position des ursprünglichen P-Leserahmens musste nun davon ausgegangen werden, dass es in SeVV-eGFP- Δ P-V oder SeVV-eGFP- Δ P-W infizierten H29 Zellen zu einer erhöhten Expression des V-Proteins um Faktor 4 (25 % mRNA bezüglich 100 % Gesamt mRNA aus P-Gen bei SeV wt) und des W-Proteins um Faktor 20 (mRNA 5 % bei SeV wt) kommt. Um eine solche Überexpression der Nichtstrukturproteine V und W in SeVV-eGFP- Δ P-V oder SeVV-eGFP- Δ P-W infizierten H29 zu untersuchen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde ein Antikörper eingesetzt, der gegen den N-terminalen Bereich des SeV P-Proteins gerichtet ist und damit zugleich diese Bereiche der Nichtstrukturproteine V und W erkennt.

Für den Western Blot wurden H29 Zellen mit SeVV-eGFP- Δ P-V, oder - Δ P-W oder SeVV-eGFP- Δ P infiziert (MOI = 1). Die Infektion von H29 Zellen mit SeVV-eGFP- Δ P diente dabei als Negativkontrolle, da hier keine Expression der Proteine V oder W zu erwarten war. Ebenso wurden als Negativkontrolle uninfizierte H29 Zellen verwendet. Als Positivkontrolle diente die Infektion von Verozellen mit SeV-eGFP mit einer MOI von 0,1. Mit Hilfe der Positivkontrolle sollte das natürliche Mengenverhältnis der Proteine P, V und W aufgezeigt werden. 24 h p.i. (Verozellen, SeV-eGFP) bzw. 72 h p.i. (H29 Zellen) wurden Zellextrakte hergestellt und im Anschluss die Western Blot-Analyse mit dem Antikörper gegen P, V und W durchgeführt (Abb. 24).

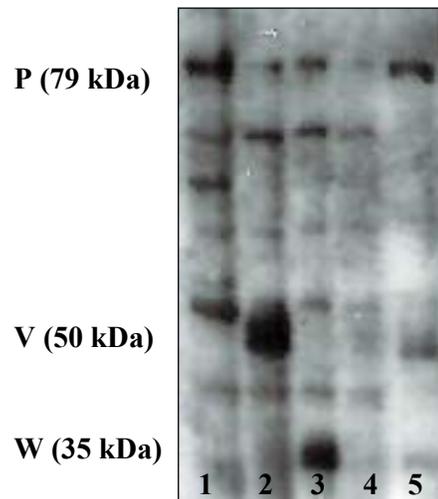


Abb. 24: Nachweis der Synthese der Proteine P, V und W in SeV(V) infizierten Zellen.

Zellextrakte von uninfizierten und infizierten (MOI = 1) H29 Zellen (Spur 1 – 4) und SeV-eGFP infizierten (MOI = 0,1) Verozellen (Spur 5) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und die Proteine P, V und W und mit einem P-Antikörper in der Western Blot-Analyse nachgewiesen. In den Spuren 1 – 4 wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen, in Spur 5 µg.

Spur 1: H29, nicht infiziert

Spur 2: H29, SeVV-eGFP-ΔP-V

Spur 3: H29, SeVV-eGFP-ΔP-W

Spur 4: H29, SeVV-eGFP-ΔP

Spur 5: Verozellen, SeV-eGFP

In SeV wt infizierten Zellen soll es wegen des Mechanismus des *RNA-Editing* auf Proteinebene zu einer Verteilung der Proteine P:V:W von 70:25:5 kommen (Delenda et al., 1998). Durch die Positivkontrolle, in der Verozellen mit SeV-eGFP mit einer geringen MOI von 0,1 infiziert worden waren, wird dieses Verhältnis durch die Banden der Proteine P (79 kDa), V (50 kDa) und W (35 kDa) verdeutlicht (Spur 5). In Spur 2, in der die Probe von SeVV-eGFP-ΔP-V infizierten H29 Zellen aufgetragen wurde, kann im Vergleich zu Spur 5 eine deutliche Überexpression des V-Proteins (50 kDa) detektiert werden. In Spur 3 wurde die Probe von SeVV-eGFP-ΔP-W infizierten H29 Zellen aufgetragen und es lässt sich auf der Höhe von etwa 35 kDa eine starke Bande des W-Proteins identifizieren.

Unter Berücksichtigung der 10-fach verminderten Virusproduktion in wt infizierten H29 Zellen im Vergleich zu infizierten Verozellen, der unterschiedlichen MOI und der unterschiedlichen Mengen an Gesamtprotein konnte eine Expression der Proteine V und W zumindest überschlagsweise kalkuliert werden: Es konnte eine Überexpression der Nichtstrukturproteine V und W in SeVV-eGFP-ΔP-V oder SeVV-eGFP-ΔP-W infizierten H29 Zellen um einen Faktor ≥ 4 bestimmt werden. Daneben war sichergestellt worden, dass es wegen der Modifikation des *RNA-Editing* Motivs in SeVV-eGFP-ΔP-V

oder SeVV-eGFP- Δ P-W in infizierten H29 Zellen nur noch zur Expression der gewünschten Nichtstrukturgene kommt.

Da nun sichergestellt worden war, dass die Nichtstrukturproteine V oder W im Vergleich zur Expression in SeV wt infizierten Zellen überexprimiert werden, konnte ein Einfluss dieser um Faktor ≥ 4 stärker exprimierten Nichtstrukturproteine V und W auf die virale Transkription untersucht werden.

Zuvor noch sollte das Wachstumsverhalten aller drei Vektoren SeVV-eGFP- Δ P-V, SeVV-eGFP- Δ P-W und SeVV-eGFP-P Δ 1-77 während der Amplifikation in H29 Zellen untersucht werden, um Einflüsse der Expression der Proteine V oder W auf die virale Replikation zu ermitteln und um festzustellen, ob die Expression des N-terminal um 77 Aminosäuren verkürzten P-Proteins während der Vermehrung von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in H29 Zellen einen negativen Effekt mit sich bringt.

3.5.4 Wachstumsverhalten der drei modifizierten Δ P-Vektoren in H29 Zellen

In SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten H29 Helferzellen wird das N-terminal um 77 Aminosäuren verkürzte, viral-kodierte P Δ 1-77-Protein zusammen mit dem zellulären P-Protein synthetisiert, was zu einem transdominant-negativen Effekt bei der Vermehrung von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 führen könnte: Laut *in vitro*-Daten (Curran et al., 1994) kann ein N-terminal um 77 Aminosäuren verkürztes P-Protein die Genomreplikation nicht unterstützen, da eine Komplexierung von P- und N⁰-Protein (N⁰:P-Komplex) wegen der fehlenden funktionellen Domäne nicht mehr stattfindet. Wenn diese *in vitro*-Daten auf die in dieser Arbeit untersuchte *in vivo*-Situation übertragen werden können, dann kann auch hier keine Komplexierung von P Δ 1-77 mit N⁰-Protein (N⁰:P Δ 1-77-Komplex) während der Amplifikation von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in H29 Zellen nicht stattfinden. Die Verpackung naszierender RNA-Genome würde nur durch N⁰:P-Komplex ausgeführt werden. Somit würde die Vermehrung von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 nicht negativ beeinflusst werden. Es könnte jedoch sein, dass freies P Δ 1-77-Protein während der Replikation an das L-Protein bindet und damit die Bindung für den N⁰:P-Komplex sperrt. Um diese Frage zu klären, sollte die Amplifikation von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in H29 Zellen mit der Amplifikation von SeVV-eGFP- Δ P verglichen werden.

Des Weiteren könnte die Überexpression der Nichtstrukturproteine V oder W das Wachstumsverhalten von SeVV-eGFP- Δ P-V und SeVV-eGFP- Δ P-W beeinflussen: Es wurde durch *in vitro*-Untersuchungen ermittelt, dass eine verstärkte Expression der Gene der Nichtstrukturproteine V oder W die Genomreplikation in einer dosis-abhängigen Art und Weise inhibiert (Curran et al., 1991; Horikami et al., 1996). Da die Gene V und W nun in einem *in vivo*-System mehrfach überexprimiert werden, kann ermittelt werden, ob sich diese Aussage bestätigen lässt. Auch hier kann die Vektorvermehrung gegenüber des von SeV-eGFP- Δ P, durch den keines der Nichtstrukturproteine

synthetisiert wird, verglichen werden. Weiterhin werden durch SeVV-eGFP- Δ P-V und SeVV-eGFP- Δ P-W die Nichtstrukturproteine C, Y1 und Y2 nun ebenfalls wieder viral-kodiert und auch diese Expression kann sich auf die Replikation in H29 Zellen bemerkbar machen.

Um den Einfluss der Überexpression der Nichtstrukturproteine V oder W und den Einfluss der Expression des verkürzten P-Proteins P Δ 1-77 auf die virale Replikation zu untersuchen, wurde eine Infektion (MOI = 3) von H29 Zellen mit SeVV-eGFP-P Δ 1-77, SeVV-eGFP- Δ P-V, SeVV-eGFP- Δ P-W, dem Kontrollvektor SeV-eGFP- Δ P und dem Kontrollvirus SeV-eGFP analog zu dem unter 3.3.3.4 beschriebenen Verfahren, durchgeführt.

Die Überstände der einzelnen Ansätze wurden über einen Zeitraum von 120 h durch den ZID-Test auf Nachkommenviren untersucht. Der zeitliche Verlauf der Virusproduktion ist in Abb. 25 dargestellt.

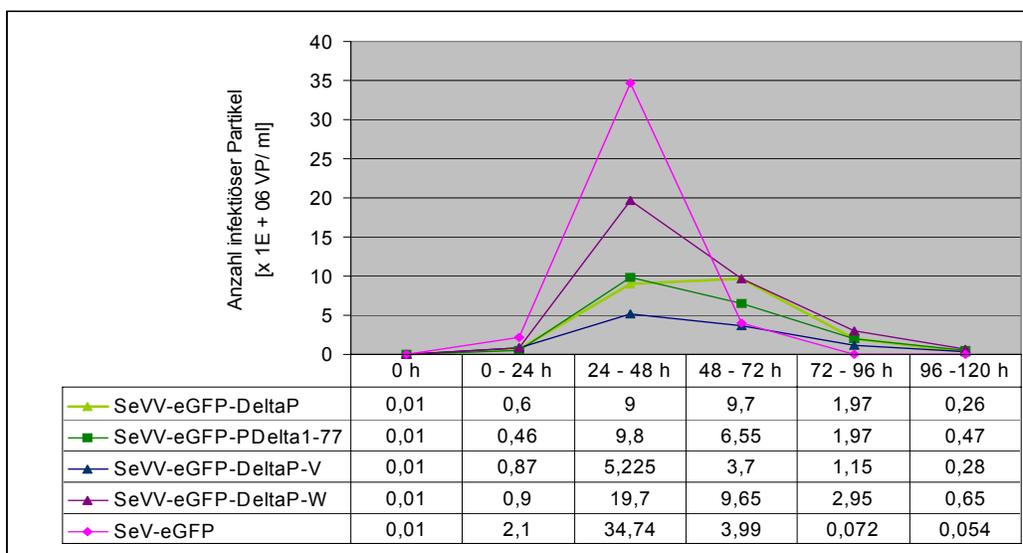


Abb. 25: Amplifikation der Virusmutanten auf H29 Zellen.

5×10^5 H29 Zellen wurden mit den SeVV-Mutanten infiziert (MOI = 3). In einem Zeitfenster von 120 h wurden die Zellkulturüberstände im Abstand von 24 h auf freigesetzte Viruspartikel (VP) mit Hilfe des ZID-Testes untersucht. Die Menge an Nachkommenviren ist in einer Skala als infektiöse Viruspartikel pro ml angegeben.

Aus einer SeV-eGFP infizierten Zelle (Positivkontrolle) werden im Zeitraum von 120 h durchschnittlich 80 Viruspartikel freigesetzt, wobei eine Transkomplementation des P-Proteins durch H29 Zellen in diesem Fall nicht benötigt wird. SeVV-eGFP-P Δ 1-77 und SeVV-eGFP- Δ P-V können im H29-Transkomplementationssystem mit etwa gleicher Effizienz wie SeVV-eGFP- Δ P vermehrt werden: Aus infizierten H29 Zellen werden nach 120 h etwa 20×10^6 Viruspartikel von SeVV-eGFP- Δ P, SeVV-eGFP-P Δ 1-77 oder SeVV-eGFP- Δ P-V freigesetzt, dies entspricht einer Anzahl von etwa 40 freigesetzten Viruspartikeln pro H29 Zelle. Interessanterweise werden aus SeVV-eGFP- Δ P-W infizierten H29 Zellen in 120 h 30×10^6 Viruspartikel entlassen, was einer Anzahl von 60

Viruspartikeln pro infizierter Zelle entspricht und damit einer Steigerung der Virusfreisetzung um Faktor 1,5 im Vergleich zu den übrigen Virusmutanten. Demzufolge scheint sich die Überexpression des W-Proteins in diesem System positiv auf die Virusproduktion auswirken. Bis jetzt wurde angenommen, dass das W-Protein keine Einzelfunktion innehat, da es nur eine verkürzte Form des V-Proteins darstellt. Der rekombinante Einbau des Gens für das Nichtstrukturprotein W in den Vakzinierungsprototypen wäre also auch eine Möglichkeit, um die Effizienz der Vektorvermehrung im H29 Helfersystem zu verbessern.

Die zeitgleiche Expression des P Δ 1-77-Proteins und des vollständigen P-Proteins in H29 Zellen hat keinen negativen Effekt auf die Vermehrung der Virusmutante SeVV-eGFP-P Δ 1-77. Durch diese Untersuchung kann gefolgert werden, dass P Δ 1-77-Proteine nicht zur Komplexierung mit N⁰-Protein fähig sind und somit können die *in vitro*-Daten von Curran (s.o.) erstmals durch ein *in vivo*-Analyseverfahren bestätigt werden (Curran et al., 1994). Auch bei der Bildung der P-Protein-Tetramere, die das Bindeglied zwischen RNA-Polymerasen und RNP-Template darstellen, scheinen verkürzte P-Proteine ohne Funktionsverlust der Polymeraseaktivität eingebaut zu werden. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung, damit der Vektor im Zielgewebe eine Transkription der Virus-kodierten Antigene auslösen kann. Um nun diese Transgenexpression in Zielzellen zu untersuchen, sollten Verozellen parallel mit den drei viralen Vektoren infiziert werden.

3.5.5 Genexpression der drei modifizierten Δ P-Vektoren in infizierten Zielzellen

Der zu etablierende Vakzine-Prototyp sollte laut Zielvorgabe in der Lage sein, in infizierten Zielzellen eine Antigenexpression durchzuführen, die eine spezifische Immunantwort induziert. Gleichzeitig darf sich der Vektor in der infizierten Zielzelle aber nicht vermehren.

Um nun zu untersuchen, ob die drei Varianten des Vektors SeVV-eGFP- Δ P eine verstärkte Transgenexpression in infizierten Zielzellen aufzeigen, wurden 5×10^5 Verozellen mit SeVV-eGFP- Δ P-V, SeVV-eGFP- Δ P-W oder SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infiziert (MOI = 1). Ein Mediumwechsel mit DMEM + 10 % FKS erfolgte nach der 1-stündigen Adsorptionsphase. Die infizierten Verozellen wurden bei 33 °C inkubiert.

In den zwei Ansätzen, in denen Verozellen mit den Mutanten SeVV-eGFP- Δ P-V oder SeVV-eGFP- Δ P-W infiziert worden waren, kam es innerhalb 7 d p.i. zu keinerlei eGFP-Expression. Somit steht fest, dass die Bereitstellung der Nichtstrukturproteine V oder W und C, Y1 und Y2 keine Transgenexpression in infizierten Verozellen unterstützt.

Ein positives Ergebnis wurde in dem Ansatz, in dem Verozellen mit SeVV-eGFP-PΔ1-77 infiziert worden waren, erreicht. Es konnten bereits bis 2 d p.i. mehr als 50 % grün fluoreszierende Verozellen beobachtet werden. Laut Poisson-Verteilung sollten bei einer Infektion mit MOI von 1 rechnerisch 63,3 % der Zellen mindestens mit einem Nukleokapsid infiziert sein. Da mehr als 50 % der vorhandenen Verozellen fluoreszieren, kann davon ausgegangen werden, dass jedes einzelne Nukleokapsid nach Einfachinfektion von Zielzellen in der Lage ist, eine messbare Transkription zu induzieren. Die Intensität der beobachteten Fluoreszenz SeVV-eGFP-PΔ1-77 infizierter Verozellen soll anhand einer Aufnahme 2 d p.i. verdeutlicht werden (Abb. 26). Zusätzlich wurde die eGFP-Expression später vergleichend zur Expression in SeV-eGFP infizierten Verozellen durch Western Blot Analyse quantifiziert (3.6.2).

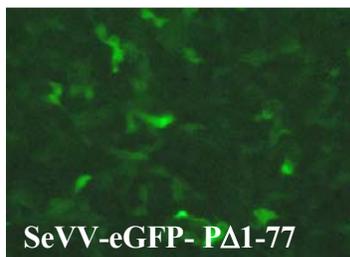


Abb. 26: eGFP-Expression in SeVV-eGFP-PΔ1-77 infizierten Verozellen (2 d p.i.).

4 x 10⁵ Verozellen wurden mit SeVV-eGFP-PΔ1-77 (MOI = 0,5) und bei 33 °C inkubiert. 2 d p.i. erfolgte die Detektion des eGFP-Proteins über Fluoreszenz.

Die eGFP-Expression in den SeVV-eGFP-PΔ1-77 infizierten Verozellen (= Passage 1) konnte zunächst über einen Zeitraum von 7 d p.i. mit gleich bleibender Intensität und ohne Zunahme der Anzahl infizierter Zellen beobachtet werden. 7 d p.i. mussten die Zellen der Passage 1 trypsiniert werden, da diese anfangen, sich aus Platzmangel vom well-Boden zu lösen. Der Zellkulturüberstand (= Üs P1_{1-7 d}) wurde zur Überprüfung der Replikations-Defizienz auf neue Verozellen gegeben (siehe 3.5.6). Die infizierten Zellen der Passage 1 wurden trypsiniert und die Hälfte erneut in einer T75-Zellkulturflasche ausgelegt und für weitere 9 d bei 33 °C inkubiert (P1_{7-16 d}). Bis etwa 12 d p.i. blieb die Intensität der Fluoreszenz infizierter Zellen konstant, auch wenn sich aufgrund der natürlichen Teilungsrate aus einer initial infizierten, fluoreszierenden Zelle zwei bis vier Tochterzellen gebildet hatten. 9 d p.i. bis 16 d p.i. wurde die Fluoreszenz zunehmend schwächer, wobei auch in dieser Phase keine Zunahme fluoreszierender Zellen detektiert werden konnte. Die gleich bleibende Anzahl fluoreszierender Zellen und die Abnahme der Intensität der Fluoreszenz zeigen bereits hier, dass der virale Vektor nicht in der Lage ist, zu replizieren. 16 d p.i. mussten die Zellen erneut trypsiniert werden. Mit dem Zellkulturüberstand (= Üs P1_{7-16 d}) der T75-Flasche wurden wieder frisch ausgelegte Verozellen infiziert, um die Replikations-Defizienz in einer weiteren Passage zu bestätigen (siehe

3.5.6). Wiederum wurden nach der Trypsinierung 20 % der Verozellen erneut ausgelegt und bei 33 °C für weitere 6 d inkubiert (= Üs P1_{16-22 d}). Im Zeitraum 17 bis 22 d wurde die Fluoreszenz der infizierten Zellen zunehmend schwächer und konnte 22 d nach der Infektion nicht mehr visuell detektiert werden. Auch in dieser Phase der Inkubation konnte keine Zunahme der fluoreszierenden Zellen beobachtet werden.

Das eGFP-Protein hat eine Halbwertszeit von etwa 24 h. Aufgrund der bis Tag 12 gleich bleibenden Intensität der Fluoreszenz in infizierten Zellen kann davon ausgegangen werden, dass bis mindestens 10 d p.i. eine Transkription durch SeVV-eGFP-PΔ1-77 in infizierten Verozellen stattfindet. Das auf dem Vektor SeVV-eGFP-PΔ1-77 kodierte verkürzte P-Protein unterstützt in infizierten Zielzellen eine mehrere Tage andauernde Transkription. Mit der Transgenexpression in nahezu jeder infizierten Zelle war ein wesentlicher Schritt für die Zielsetzung der Arbeit erreicht worden. Vor einer Charakterisierung der Expressionsstärke musste nochmals die Replikations-Defizienz des Vektors in einem zusätzlichen Experiment bestätigt werden.

3.5.6 Replikations-Defizienz von SeVV-eGFP-PΔ1-77 in der Zielzelle

Die Mutante SeVV-eGFP-PΔ1-77 kodiert nach Infektion von Zielzellen für die Synthese eines verkürzten P-Proteins, dem N-terminal 77 Aminosäuren fehlen. Diese 77 Aminosäuren des P-Proteins repräsentieren laut *in vitro*-Untersuchungen die Bindedomäne des P-Proteins zum N-Protein, die so genannte die N⁰:P-Bindedomäne (Curran et al., 1994). N⁰:P-Komplexe sind essentiell für die Verpackung naszierender Genome während der viralen Replikation. Nach Infektion von Zellen mit dem Vektor SeVV-eGFP-PΔ1-77 sollte es demnach nicht mehr zu einer Replikation viraler Genome kommen und eine Virusreplikation sollte demzufolge unterbunden sein.

Werden Verozellen mit einem replikations-kompetenten SeV-eGFP infiziert, entsteht in den zwei darauf folgenden Tagen um die initial infizierte, stark fluoreszierende Zelle ein Spot aus bis zu tausend weiteren fluoreszierenden Zellen. Um die Replikations-Defizienz von SeVV-eGFP-PΔ1-77 in Verozellen nachzuweisen, sollte nun das Ausbleiben dieser Zunahme grün fluoreszierender Zellen um eine initial infizierte Zielzelle unter Berücksichtigung der natürlichen Teilungsrate von Verozellen bestätigt werden. Verozellen teilen sich im Durchschnitt alle 24 h. Werden Verozellen mit SeVV-eGFP-PΔ1-77 infiziert, ist eine eGFP-Expression nach etwa 24 h zu sehen. Es wurde beobachtet, dass nach weiteren 24 h Inkubationsphase aus dieser initial infizierten, fluoreszierenden Verozelle aufgrund natürlicher Teilung in einigen Fällen zwei (schwächer) fluoreszierende Tochterzellen hervorgehen. Diese Beobachtung hat nichts mit einer Virusvermehrung zu tun, bei der zwischen 10¹ bis 10⁴ Viruspartikel aus einer infizierten Zielzelle entlassen werden, die dann nebenliegende Zellen infizieren können. Diese natürliche Teilungsrate infizierter Zellen hat andererseits einen Einfluss auf die eGFP-

Expressionsstärke, die mit zunehmender Anzahl von Zellteilungen reduziert wird. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz dafür, dass der virale Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 replikations-defizient ist. Führen mehrere aufeinander folgende Zellteilungen einer infizierten Zelle zu einer kontinuierlichen Abnahme der Intensität der Fluoreszenz, bis diese schließlich zum Erliegen kommt, so ist eine Virusvermehrung auszuschließen. Diese Erscheinung konnte bereits durch die unter 3.5.5 beschriebenen Versuchsbedingungen beobachtet werden. Wegen der initial MOI von 1 in diesem Versuch waren zu Anfang bereits 60 % aller sich im Ansatz befindenden Verozellen infiziert. Die Überstände (Üs) dieser als Passage 1 bezeichneten Ansätze wurden zu verschiedenen Zeiten auf frisch ausgelegte Verozellen gegeben (Üs P1_{1-7 d}, Üs P1_{7-16 d}, Üs P1_{16-22 d}). Sollten aus den mit SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Verozellen Viruspartikel entlassen worden sein, so sollten diese durch die Infektion neuer Verozellen spätestens 4 d p.i. detektiert werden können. Es konnten aber in keinem der Ansätze 4 d p.i. oder zu einem späteren Zeitpunkt eGFP-exprimierende und damit infizierte Verozellen ermittelt werden. Diese Untersuchung unterstützt die Aussage, dass SeVV-eGFP-P Δ 1-77 replikations-defizient ist. Um die Replikations-Defizienz von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in Verozellen endgültig zu bestätigen, wurde eine letzte Untersuchung durchgeführt:

Es wurde eine T75-Flasche mit $\sim 20 \times 10^6$ Verozellen ausgelegt. Die Zellen waren schon zu Beginn der Inkubationsphase in hoher Dichte ausgesät und demzufolge nicht mehr stark teilungsaktiv. Diese Verozellen wurden mit SeVV-eGFP-P Δ 1-77 mit einer MOI von 0,001 infiziert. Ein Mediumwechsel mit DMEM mit 5 % FKS (für verringerte Teilungsaktivität) erfolgte nach einstündiger Inkubationszeit und die Verozellen wurden bei 33 °C inkubiert (P1). 2 d p.i. konnten, entsprechend der gewählten MOI, initial mehrere tausend einzeln liegender, infizierter und fluoreszierender Verozellen beobachtet werden. Wegen der hohen Zelldichte kam es in den darauf folgenden 4 Inkubationstagen kaum zu Zellteilungen, d.h. die Anzahl initial infizierter Zellen, detektiert durch die Fluoreszenz blieb konstant. Würden in dieser Zeit Viruspartikel gebildet worden sein, hätten diese nebenliegende Zellen infizieren können, was sich an einer Zunahme der Fluoreszenz widerspiegelt hätte. Auch nach 8 Tagen konnten keine Neuinfektionen festgestellt werden, also ausgeschlossen werden. Um die Zellen mit frischem Medium zu versorgen, wurde der Überstand abgenommen und die Verozellen mit neuem Medium überschichtet. 12 Tage nach Inkubationsstart lösten sich die Verozellen vom Kulturboden ab. Während der gesamten Versuchsdauer konnte keine Replikation des viralen Vektors in Form einer Zunahme fluoreszierender Zellen beobachtet werden. Eine Ausbreitung von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 von den primär infizierten Zellen auf umliegende Verozellen durch Produktion neuer Viruspartikel konnte somit ausgeschlossen werden und SeVV-eGFP-P Δ 1-77 kann als replikations-defizienter viraler Vektor bezeichnet werden.

Die Transgenexpression in infizierten Zielzellen wurde bisher anhand der Fluoreszenz infizierter Zellen detektiert. Um eine definierte Aussage über die Quantität der Expression im Vergleich zu SeV-

eGFP infizierten Verozellen treffen zu können, sollte im nächsten Kapitel die Transgenexpression und des Weiteren die Expression viral-kodierter Gene durch proteinchemische und virologische Methoden analysiert werden.

3.6 Quantifizierung der Proteinsynthese in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Zielzellen

Der replikations-defiziente Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 kann initial hergestellt und durch zelluläre Transkomplementation mit Hilfe der Helferzelle H29 vermehrt werden. Nach Infektion von Verozellen mit SeVV-eGFP-P Δ 1-77 konnte seine Replikations-Defizienz eindeutig bestätigt werden (3.5.6). Die von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 induzierte Expression des Reportergens eGFP konnte ab Tag 2 bis Tag 21 visuell mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes detektiert werden. Nun musste die Expression dieses Reportergens und des viralen HN-Proteins detailliert charakterisiert werden.

3.6.1 Quantifizierung der eGFP-exprimierenden Zielzellen

Die Transkriptionskassette, in die das Reportergen eGFP in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 eingesetzt wurde, soll in späteren Anwendungen im medizinischen Bereich ein Antigen eines gewünschten Virus kodieren. Durch Positionierung im 3'-Bereich des SeVV Genoms kann von einer maximalen Transgen- bzw. Antigenexpression ausgegangen werden (Tokusumi et al., 2002). Diese Antigenexpression muss ausreichend intensiv sein, um im Patienten eine protektive Immunantwort hervorzurufen.

Es ist wichtig, sicherzustellen, dass jedes SeVV-eGFP-P Δ 1-77 Nukleokapsid, das eine Zielzelle infiziert, in der Lage ist, eine detektierbare Transgenexpression durchzuführen. Erste Bestätigungen, dass ein einzelnes Nukleokapsid zur Transkription in einer infizierten Zielzelle fähig ist, waren bereits durch den unter 3.5.6 beschrieben worden. Um die Anzahl SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierter, fluoreszierender H29 Zellen und SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierter und fluoreszierender Verozellen genau zu vergleichen, wurde sich der FACS (*fluorescent activated cell sorting*)-Analyse bedient. Durch die zuvor durchgeführte visuelle eGFP-Detektion infizierter Verozellen und H29 Zellen mittels Fluoreszenz (3.5.5 und 3.5.6) konnte nur schwer ein Vergleich der Anzahl eGFP-exprimierender Zellen vorgenommen werden, da sich SeVV-eGFP-P Δ 1-77 zum einen in H29 Zellen bereits nach 2 Tagen vermehrt haben kann, eine Expression von eGFP in infizierten Verozellen aber erst nach 2-3 Tagen voll zur Erscheinung kommt. Mit Hilfe der FACS-Analyse parallel infizierter H29 Zellen und Verozellen, kann die Anzahl der eGFP-exprimierenden Zellen nun exakt und in einem automatisierten

Verfahren detektiert werden. Die Daten werden per Computerhistogramm ausgewertet, indem die Fluoreszenzsignale infizierter Zellen gegen die Gesamtzellzahl aufgetragen werden (5.2.1.7). Die FACS-Analyse von SeV-eGFP infizierten Zellen als Vergleichskontrolle konnte nicht vorgenommen werden, da SeV(wt)-infizierte Zellen den S2-Sicherheitsbereich nicht verlassen dürfen und sich das FACS-Analysegerät außerhalb des S2-Labors befindet.

5×10^5 Verozellen oder H29 Zellen wurden mit SeVV-eGFP-P Δ 1-77 oder dem Kontrollvirus SeVV-eGFP- Δ P mit einer MOI = 1 infiziert. Nach 1 h Adsorption erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM + 10 % FKS und anschließend wurden die infizierten Zellen bei 33 °C inkubiert. Die FACS-Analyse der Proben erfolgte 24 h nach Infektion. Die infizierten Zellen wurden in PBS aufgenommen und durchflußzytometrisch die Anzahl fluoreszierender Zellen ermittelt. Das Ergebnis der Auswertungen der FACS-Histogramme ist in Abbildung 27 als Anteil [%] fluoreszierender Vero- und H29 Zellen angegeben.

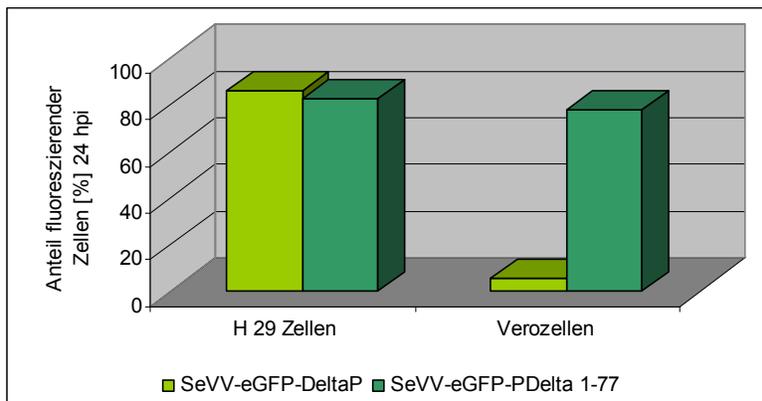


Abb. 27: Anteil fluoreszierender Zellen nach Infektion mit SeVV-eGFP- Δ P oder SeVV-eGFP-P Δ 1-77.

5×10^5 H29- oder Verozellen wurden mit einer MOI von 1 mit SeVV-eGFP- Δ (Delta)P oder SeVV-eGFP-P Δ (Delta)1-77 infiziert. 24 h p.i. wurden die Zellen in PBS-Lösung resuspendiert und es erfolgte die Detektion grün fluoreszierender Zellen mittels FACS-Analyse. Die Ergebnisse der Histogrammauswertungen sind als Anteil [%] fluoreszierender Zellen dargestellt.

24 h nach Infektion von H29 Helferzellen mit SeVV-eGFP- Δ P können 80 % eGFP-exprimierende, infizierte Zellen durch FACS-Analyse detektiert werden. Hier unterstützt die zelluläre Synthese des P-Proteins die Bildung neuer P:L-Komplexe und damit Produktion neuer mRNA, was zur Synthese von eGFP-Proteinen in der infizierten Zelle führt. Werden dagegen Verozellen mit SeVV-eGFP- Δ P infiziert, kann weder 24 h p.i. (siehe Abb. 25, hellgrüne Säulen) noch zu einem späteren Zeitpunkt (Daten nicht gezeigt) eine Expression des eGFP-Proteins nachgewiesen werden. Die durch SeVV-eGFP- Δ P Nukleokapside transferierten P:L-Komplexe sind wie erwartet bei einer Infektion mit MOI =

1 nicht in der Lage, eine detektierbare Expression in infizierten Verozellen herbeizuführen. Dieses Ergebnis kongruiert mit den unter 3.4 beschriebenen Resultaten.

24 h nach SeVV-eGFP-P Δ 1-77 Infektion konnten dagegen durch FACS-Analyse knapp 80 % eGFP-exprimierende H29 Zellen und ebenso etwa 70 % eGFP-exprimierende Verozellen identifiziert werden (Abb. 25, dunkelgrüne Säulen). Bei der Infektion von H29 Zellen kann die Transkription der eGFP mRNA durch die zelluläre Synthese des P-Proteins und damit durch neue P:L-Komplexe unterstützt werden. Bei der Infektion von Verozellen mit SeVV-eGFP-P Δ 1-77 wird die Transkription offensichtlich durch die Neusynthese von N-terminal verkürzten P-Proteins P Δ 1-77 unterstützt werden. Aus diesen Ergebnissen kann wichtige Aussage über die Anzahl transkriptionsfähiger SeVV-eGFP-P Δ 1-77 getroffen werden: H29 Zellen und Verozellen wurden mit einer MOI von 1 infiziert. Laut Poisson sollten dadurch statistisch etwa 63,3 % der Zellen mindestens einfach infiziert werden. Theoretisch auftretende Mehrfachinfektionen einer Zelle treten in beiden Zelllinien statistisch mit dergleichen Wahrscheinlichkeit auf, die Wahrscheinlichkeit etwa, dass drei SeVV-eGFP-P Δ 1-77 Nukleokapside in eine Zelle gelangen, beträgt bei einer Infektion mit MOI 1 gerade mal 6,13 %.

24 h p.i. konnten bei SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten H29 Zellen etwa 80 % eGFP-exprimierender H29 Zellen beobachtet werden, d. h. jede Einfachinfektion führt hier zu einer detektierbaren eGFP-Expression. Genauso verhält es sich in dem Ansatz, in dem Verozellen (Zielzellen) mit SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infiziert wurden: Etwa 70 % der mindestens einfach infizierten Zellen zeigten in der FACS-Analyse eine positive Fluoreszenz. Dadurch lässt sich ableiten, dass jedes SeVV-eGFP-P Δ 1-77-Nukleokapsid zur eGFP-Expression fähig ist, unabhängig ob der Polymerase-Komplex wie im Fall einer Infektionen von H29 Zellen unterstützt wird, oder nicht, wie im Fall von infizierten Verozellen. Eine vergleichende FACS-Analyse mit SeV-eGFP infizierten Zellen konnte wegen der gültigen Sicherheitsbestimmungen (s. o.) nicht vorgenommen werden. Um die Expressionsstärke des eGFP-Proteins in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Verozellen mit der in SeV-eGFP infizierten Verozellen vergleichen zu können und damit eine Quantifizierung der Expression abgeben zu können, wurde nun eine quantitative Western Blot-Analyse des eGFP-Proteingehaltes von infizierten Verozellen durchgeführt.

3.6.2 Quantifizierung der eGFP-Expressionsstärke in infizierten Zielzellen

Durch Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse infizierter Verozellen war ermittelt worden, dass Verozellen nach Infektion mit dem replikations-defizienten Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 das Reporter-gen eGFP exprimieren. Es wurde angenommen, dass es durch SeVV-eGFP-P Δ 1-77 im Vergleich zu SeV-eGFP zu einer verminderten eGFP-Expression in einer infizierten Zellen kommen

würde, da die verkürzte Aminosäuresequenz eventuell auch eine veränderte Faltung des Proteins mit sich bringt und diese sich negativ auf die Transkriptionsleistung auswirken könnte. Per FACS-Analyse konnte kein Abgleich SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierter Verozellen gegen SeV-eGFP infizierter Verozellen gemacht werden (S2-Bereich). Daher sollte nun eine quantitative Abschätzung der eGFP-Expression des replikations-defizienten SeVV im Vergleich zu dem replikations-kompetenten SeV-eGFP durch eine Western Blot-Analyse mittels seriellen Verdünnungsreihen von zellulärem Gesamtprotein durchgeführt werden.

5×10^5 Verozellen wurden mit SeV-eGFP oder SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infiziert (MOI = 3). 24 h p.i. erfolgte der Aufschluss der Zellen. Die Zellextrakte wurden in seriellen Verdünnungsreihen (1:2) von 20 μ g bis 2,5 μ g-Gesamtmenge in SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und zunächst das viral kodierte eGFP-Protein (26 kDa) durch Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 28).

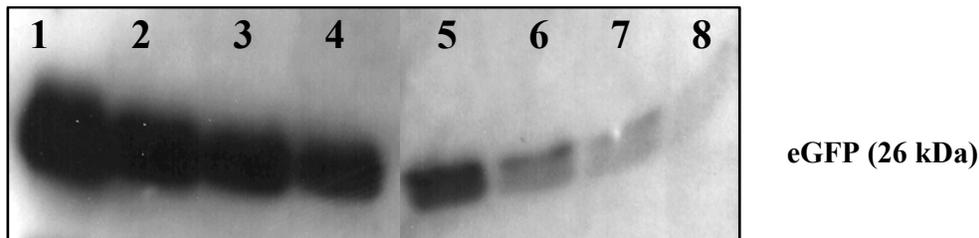


Abb. 28: Synthese des eGFP-Proteins in infizierten Verozellen, dargestellt durch serielle Verdünnung.

Zellextrakte SeV-eGFP (Spur 1-4) und SeVV-eGFP-P Δ 1-77 (Spur 5-8) infizierter Verozellen wurden in seriellen Verdünnungsreihen im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und das eGFP-Protein in der Western Blot-Analyse nachgewiesen. Pro Spur wurden 20 (Spur 1, 5), 10 (Spur 2, 6), 5 (Spur 3, 7) oder 2,5 μ g (Spur 4, 8) Gesamtprotein aufgetragen.

Das Fluoreszenzprotein eGFP kann sowohl in SeV-eGFP als auch in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Verozellen mit Hilfe der Western Blot-Analyse identifiziert werden. Ein Vergleich der Intensitäten der eGFP-Signale lässt die Aussage zu, dass die Expression in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Verozellen um etwa Faktor 16 im Vergleich zu SeV-eGFP infizierten Verozellen reduziert ist.

Es wurde erwartet, dass die Expressionsleistung in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Zellen wegen der fehlenden Vermehrung viraler Nukleokapside für die RNA-Polymerase verringert ist. Eine Reduktion um Faktor 16 ist dabei gering und lässt die Aussage zu, dass auch 1 bis 15 SeVV-eGFP-P Δ 1-77 Nukleokapside bei gleichzeitig modifiziertem P-Protein eine sehr effiziente Transkription erbringen können.

Neben der Expression des eingebauten Transgens in der Zielzelle ist ebenso die Expression weiterer viral-kodierter Gene durch SeVV-eGFP-P Δ 1-77 interessant, um Aussagen über die Effizienz des

Vektors treffen zu können. Wie schon unter 3.6.3 erwähnt, ist das SeV HN-Protein eine weitere wichtige Antigen-determinante, kann gegen HN-Proteine anderer Paramyxoviren ersetzt werden und somit die Immunogenität des Vektors weiter steigern. Daher sollte die Synthese des HN-Proteins, dessen Gen an Position fünf im Genom von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 platziert ist, ebenfalls vergleichend zur Expression in SeV-eGFP infizierten Verozellen quantifiziert werden.

3.6.3 Abschätzung der HN-Expression in infizierten Zielzellen

Das SeV HN-Protein ist, im Gegensatz zum eGFP-Protein, ein membranständiges Oberflächenprotein und stellt eine wichtige Antigen-Determinante dar. Durch in unserer Arbeitsgruppe parallel laufende Untersuchungen war bereits bekannt, dass das G-Gen von RSV oder das HN-Gen von hPIV3 rekombinant in ein replikations-kompetentes SeV eingebaut werden kann und rekombinante Sendai-Virus-Chimäre erhalten werden können (persönliche Mitteilung, Sascha Bossow). Es sollte nun die Expression des HN-Gens in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Zielzellen quantifiziert werden.

Das HN-Gen ist im SeVV-eGFP-P Δ 1-77 (und SeV-eGFP) Genom an Position 6 lokalisiert. Es wurde vermutet, dass auch das HN-Protein aufgrund der verminderten Anzahl von Nukleokapsiden in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Zellen (3.6.2) nur verringert synthetisiert werden kann. Durch Detektion des HN-Proteins in Proben SeV(V) infizierter Zellen sollte nun dessen Expressionsstärke im Western Blot abgeschätzt werden.

Dieselbe PVDF-Membran, auf der das eGFP-Protein in SeV(V) infizierten Zellen detektiert worden war (3.6.2), wurde nach Entfernen der eGFP-Antikörper nun mit einem SeV spezifischen HN-Antikörper inkubiert (Abb. 29).

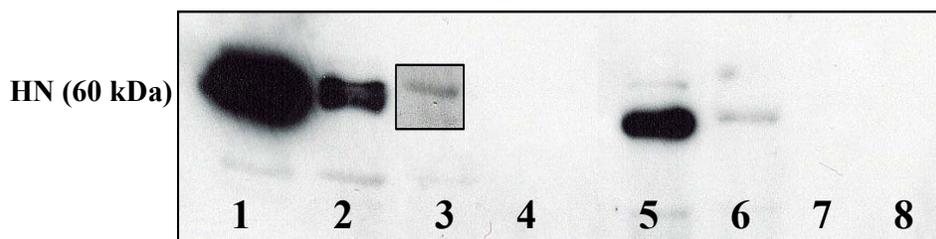


Abb. 29: Synthese des HN-Proteins in infizierten Verozellen, dargestellt durch serielle Verdünnung.

Zellextrakte SeV-eGFP (Spur 1-4) und SeVV-eGFP-P Δ 1-77 (Spur 5-8) infizierter Verozellen wurden in seriellen Verdünnungsreihen im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und das SeV HN-Protein durch Western Blot-Analyse nachgewiesen. Pro Spur wurden 20 (Spur 1, 5), 10 (Spur 2, 6), 5 (Spur 3, 7) oder 2,5 μ g (Spur 4, 8) Gesamtprotein aufgetragen. Nur durch Erhöhung des „Kontrastes“ konnte auch in Spur 3 ein Signal sichtbar gemacht werden, daher ist die Bande in Spur drei extra eingerahmt.

Das SeV HN-Protein konnte in den Spuren mit 20 und 10 µg Gesamtprotein SeV-eGFP infizierter Verozellen (Spuren 1, 2) deutlich nachgewiesen werden (Abb. 29). Die Bande des SeV HN-Proteins in Spur 3 (5 µg Gesamtprotein) ist auf dem entwickelten Röntgenfilm zu erkennen, konnte in Abbildung 29 jedoch nur deutlich gemacht werden, wenn der Kontrast der Aufnahme im Vergleich zum übrigen Ausschnitt erhöht wurde. Daher erscheint in Spur 3 ein extra eingefügtes Signal. Die Expression des HN-Proteins ist ebenso in den Spuren mit 20 und 10 µg Gesamtprotein SeVV-eGFP-PA1-77 infizierter Verozellen (Spur 5, 6) klar, aber mit schwächerer Intensität sichtbar. Die Expositionszeit von 35 sec wurde gewählt, um die Expression des HN-Proteins in Spur 6 sichtbar zu machen. Eine Abschätzung der HN-Expression in SeVV-eGFP-PA1-77 und SeV-eGFP infizierten Verozellen wurde durch den Vergleich der erhaltenen Signale vorgenommen (Spur 1 + 5, Abb. 29). Es kann von einer Reduktion der HN-Expression in SeVV-eGFP-PA1-77 infizierten Verozellen von ca. Faktor 10 ausgegangen werden. Auch dieser Wert ist wieder sehr hoch, obwohl es in SeVV-eGFP-PA1-77 infizierten Zellen zu keiner Replikation von Nukleokapsiden und damit zu keiner Vermehrung der *templates* für die Transkription kommen kann. Andererseits werden auch keine Viruspartikel freigesetzt, so dass einmal synthetisierte virale Proteine in der infizierten Zelle akkumuliert werden können und damit zu einem stärkeren Signal führen.

Für die Auslösung einer Immunantwort ist nicht nur die Menge an viralem Antigen entscheidend, sondern vor allem die Dichte der Antigenmoleküle auf der Oberfläche der infizierten Zelle.

3.6.4 Exprimiertes HN-Protein auf SeVV-eGFP-PA1-77 infizierten Zielzellen

Eine etwa 10-fach reduzierte HN-Expression in SeVV-eGFP-PA1-77 infizierten Zielzellen im Vergleich zu SeV-eGFP (wt) infizierten Zielzellen konnte bereits durch Western Blot-Analyse (3.6.3) ermittelt werden. Durch die Western Blot-Analyse kann aber nur die durchschnittliche Gesamtmenge an HN-Protein in infizierten Zellen ermittelt werden, sie erlaubt nicht den Nachweis der unterschiedlichen Expressionsstärke in distinkten Zellen. Mit Hilfe des HAD-Tests kann das HN-Protein auf Zelloberflächen durch Bindung humaner Erythrozyten nachgewiesen werden und damit die Effizienz der Exposition viraler HN-Proteine auf einzelnen infizierten Zellen detektiert werden.

Es stellte sich die Frage, ob die reduzierte HN-Expression in den mit replikations-defizienten Vektoren infizierten Zellen überhaupt stark genug ist, um im HAD-Test positive Signale zu erhalten und ob die HN-Expression auf jeder infizierten Zelle in etwa gleich stark ist.

5×10^4 Verozellen wurden in einer 6-well Vertiefung ausgesät. Es musste eine geringe Zelldichte gewählt werden, um den Zellen in den Folgetagen die Möglichkeit zu lassen, sich zu teilen. Die Verozellen wurden am darauf folgenden Tag mit SeVV-eGFP-PA1-77 mit einer MOI 0,5 infiziert. Nach 1-stündiger Adsorption erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM + 10 % FKS. Anschließend

wurden die Zellen mehrere Tage bei 33 °C inkubiert. 5 und 9 d p.i. wurden HAD-Testreihen durchgeführt, um die Exposition der viralen HN-Proteine anhand der Bindung humaner Erythrozyten zu analysieren. Aus früher durchgeführten Untersuchungen war bereits bekannt, dass an einer SeV wt infizierten Verozelle 2 Tage nach Infektion bis zu 50 humane Erythrozyten binden, wobei auch hier die Anzahl gebundener Blutkörperchen +/- 20 beträgt. Ein direkter Vergleich mit für 5 Tage SeV-eGFP infizierten Verozellen war nicht durchführbar, da sich SeV-eGFP innerhalb der Inkubationszeit in Verozellen vermehren würde und das Ausschleusen neuer Viruspartikel zum einen die Anzahl exponierter HN-Proteine auf der Zelloberfläche verringern würde (die ausgeschleusten neuen Viruspartikel würden HN-Protein mit sich nehmen) und zum anderen das Ausschleusen zum Absterben der infizierten Zelle führen würde. Nach Ausschleusung neuer SeV-eGFP Viruspartikel würden diese an umliegende, nicht infizierte Verozellen adsorbieren und es käme nach erfolgreicher Infektion wiederum zur Exposition viraler HN-Proteine auf diesen Zellen.

5 Tage nach Infektion zeigten etwa 40 % der mit SeVV-eGFP-PΔ1-77 infizierten Verozellen (5 d p.i.) mit 10 – 70 gebundenen Erythrozyten einen zur Wildtyp-Infektion vergleichbare Exposition von viralen Oberflächenantigenen (Abb. 30 A). Damit war gezeigt, dass die mit dem replikationsdefizienten Vektor infizierten Zellen 5 d p.i. in der Lage sind, HN-Proteine auf der Zelloberfläche zu exponieren.

Die infizierten Zellen wurden bei 33 °C weiter inkubiert, wodurch die Neuraminidase-Aktivität des HN-Proteins zum Ablösen der an infizierte Zellen gebundenen Erythrozyten führt. Die Zellen wurden gewaschen, um die abgelösten Erythrozyten zu entfernen, und für weitere 4 d bei 33 °C inkubiert. 9 d p.i. wurde wiederum ein HAD-Test durchgeführt. Es konnten nun etwa 30 % HAD-positive Verozellen detektiert werden. Dabei war deutlich zu erkennen, dass die Anzahl gebundener roter Blutkörperchen auf 5 bis maximal 20 Erythrozyten pro Zelle zurückgegangen war (Abb. 30 B).

Innerhalb der neuntägigen Inkubationsphase vermehrten sich die Verozellen wegen der natürlichen Teilungsrate. Ein HAD-Test, der 12 d p.i. durchgeführt wurde, konnte nicht mehr ausgewertet werden, da sich die durch die lange Inkubationsphase belasteten Zellen während des HAD-Testes immer vom Well-Boden ablösten. Eine 9-tägige Exposition des HN-Proteins auf den Zelloberflächen sollte ausreichen, um eine Immunantwort durch einen Vakzine-Prototypen hervorzurufen.



Abb. 30: Nachweis von funktionellen HN-Proteinen auf SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Verozellen.

5×10^5 Verozellen wurden mit SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infiziert (MOI = 0,5). Die Zellen wurden bei 33 °C inkubiert. 5 d p.i. (A) und 9 d p.i. (B) wurde ein HAD-Test durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde der HAD-Test auf nicht infizierten Verozellen durchgeführt.

Durch die unter 3.6 durchgeführten Untersuchungen ist bewiesen, dass der replikations-defiziente virale Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 nach Infektion einer Zelle in der Lage ist, eine effiziente Expression viral kodierter Gene durchzuführen. Dabei wird nicht nur das 3'-proximale Transgen (eGFP) effektiv synthetisiert, auch das an Position 6 liegende HN-Gen wird über 9 Tage nach Infektion funktionell auf infizierten Zielzellen exponiert.

In vorklinischen Studien muss nun untersucht werden, in wieweit die durch SeVV-eGFP-P Δ 1-77 vermittelte Genexpression in Versuchstieren eine spezifische Immunantwort gegen die kodierten Antigene hervorruft. Durch die Insertionstoleranz des SeVV für Fremdproteine bzw. -epitope ergeben sich hierbei eine Reihe von attraktiven Anwendungsmöglichkeiten für die Verwendung von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 bei der aktiven Immunisierung.

4 Diskussion

Paramyxoviren haben ein nichtsegmentiertes, durchgehendes RNA-Genom in Negativstrangorientierung, sie sind beim Menschen weit verbreitet und verursachen zum Teil schwere Erkrankungen. Als Beispiele seien die Masern- und Mumpserkrankungen oder die Infektionen der oberen Atemwege durch das Respiratorische Syncytial Virus sowie der durch menschliche Parainfluenzaviren (Typ 1-3) verursachte Pseudokrapp genannt (Modrow et al., 2003).

Gegen die Masern- und die Mumpskrankheit konnte bereits vor mehreren Jahrzehnten eine Schutzimpfung in Form eines attenuierten Lebendimpfstoffes entwickelt werden. Lebendimpfstoffe enthalten replikationsfähige Erreger, die sich in der geimpften Person vermehren können, also auch in der Lage sind, bestimmte Zellen zu infizieren und dort die Synthese von viralen Proteinen einzuleiten. Die so gebildeten Proteine werden vom Immunsystem des Impflings als „fremd“ erkannt. Nach Ausbildung einer humoralen und zellulären Immunantwort kommt es zur Eliminierung des Virus aus dem Organismus. Bei einer nachfolgenden Infektion des Geimpften mit dem gleichen Erreger ist bereits eine spezifische Immunität aufgebaut, das Virus wird sofort eliminiert.

Mit Lebendimpfstoffen lässt sich gegen eine Reihe von viralen Erregern ein wirksamer Schutz aufbauen, da sie sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem wirksam aktivieren. Gegen Infektionen von Masern-, Mumps- und Rötelnviren wird ein attenuierter Kombinations-Lebendimpfstoff („MMR“) eingesetzt, wobei die erste Injektion ab dem zwölften Lebensmonat gegeben wird und die zweite Impfung vier Wochen nach der ersten Impfung möglich ist. Nach der ersten Impfung sind 85-95 % der Geimpften geschützt, nach der zweiten Dosis fast 100 %. Der Impfschutz hält vermutlich lebenslang. Die Gabe des Masern-Impfstoffes ist in einigen Fällen mit Nebenwirkungen verbunden: Bei etwa jedem zehnten Impfling kann es sieben bis zwölf Tage nach der Impfung zu einer „Impfkrankheit“ mit leichtem Fieber, seltener auch mit Hautausschlag kommen. Bei einer entsprechenden Veranlagung sind auch Fieberkrämpfe möglich (www.gesundes-kind.de/gsk/impfschutz/masern03.htm).

Gegen Erkältungskrankheiten mit zum Teil schweren Verläufen, ausgelöst durch Viren der gleichen Familie (menschliche Parainfluenzaviren, Respiratorisches Syncytial Virus), sind bis heute keine Impfstoffe verfügbar. Parainfluenzaviren sind weltweit verbreitet und verursachen bei Säuglingen und Kindern Erkrankungen der Atemwege. Infektionen mit Parainfluenzavirus Typ 1, 2 und 3 äußern sich vorwiegend als Erkrankungen des oberen Respirationstrakts, seltener als Bronchitis, und sind die Hauptursache des Pseudokrapp. Die schweren Verläufe der Infektion mit dem Parainfluenzavirus vom Typ 3 werden bei Säuglingen bereits während der ersten Lebensmonate beobachtet. Alle bisherigen

Versuche, Vakzinen auf konventionellem Weg herzustellen, sind bis heute fehlgeschlagen. Durch Formalin abgetötete Viren erwiesen sich als ungeeignet, da das F-Protein durch die chemische Behandlung zerstört wird und nur Antikörper gegen das G-Protein gebildet werden. Diese sind zwar Virus neutralisierend, konnten aber die Virusverbreitung durch Zellfusion nicht behindern. Auch beobachtete man bei nachfolgenden Infektionen außerordentlich schwere Verläufe der Erkrankung (Modrow et al., 2003).

Durch die Technologie der reversen Genetik sind zielgerichtete Veränderungen an diesen Paramyxoviren möglich geworden. Die Herstellung infektiöser Viruspartikel mit Hilfe klonierter cDNA wurde für segmentierte und nicht-segmentierte RNA Viren etabliert (Garcin, 1995; Kato et al., 1996; Leyrer et al., 1998; Roberts et al., 1998; Nagai & Kato, 1999). Ziel der medizinischen Forschung ist es nun, Vakzine-Typen herzustellen, die durch rekombinanten Einbau von Genen verschiedener Viren für Antigene mehrerer schwer herstellbarer Viren kodieren, um so die Impfstoffentwicklung für derartige Erreger anzutreiben und Lebendvakzine zu etablieren, die gegenüber dem natürlichen Virus ein deutlich attenuiertes Infektions- und Replikationsverhalten aufweisen, um bei einer Anwendung Impfschäden, etwa hervorgerufen durch eine Virämie, verhindern zu können.

Schmidt und Kollegen entwickelten 2001 eine chimäre Form des Parainfluenza Virus Typ 3 mit Oberflächenproteinen verschiedener Virustypen, welcher in Tierversuchen erfolgreich als Vakzine eingesetzt werden konnte (Schmidt et al, 2001): Durch den rekombinanten Einbau von F- und HN-Genen des humanen Parainfluenzavirus Typ 3 (hPIV3) und des G- oder F-Gens des Respiratorischen Syncytial Virus (RSV) in den Vektor des bovinen Parainfluenza Virus Typ 3 (bPIV3) konnte nach Applikation in Hamstern eine mukosale Immunantwort gegen hPIV3 und RSV nachgewiesen werden. Diese Vakzine befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung. Das Ziel der einfachen Herstellung eines Vakzine-Typen, der für Antigene mehrerer Paramyxoviren kodiert, könnte damit erfüllt sein. Die Vorgabe einer Attenuierung des heterologen Virus für eine sichere Anwendung aber ist nur zum Teil verwirklicht: Die beschriebene Virusmutante ist durch das Überschreiten der Speziesbarriere in ihrer Replikationsfähigkeit zwar teilweise eingeschränkt, eine Vermehrung nach Applikation ist jedoch sehr wahrscheinlich und könnte vor allem bei der Immunisierung von Säuglingen und anderen Risikogruppen zu schweren Impfschäden führen.

Eine zusätzliche Attenuierung, etwa durch eine Modifikation des Polymerase-Komplexes, wäre aber wünschenswert, um eine Vakzine ohne Risiken bei Kleinstkindern oder älteren Menschen mit unausgereifter oder geschwächter Immunantwort anwenden zu können. Bisherige Versuche zur Etablierung solcher Vakzine basierten unter anderem auf der Deletion von Genen, welche für Oberflächenproteine kodieren, wodurch nicht übertragbare, aber dennoch replikationsfähige Virusmutanten entstehen. Ein nicht-übertragbares Sendai-Virus wurde erstmals 2000 von Li beschrieben (Li et al., 2000). Es handelt sich um eine F-Gen-defiziente SeV Mutante. Das SeV F-

Protein induziert nach Adsorption der Viruspartikel an die Zelle die Fusion der viralen mit der zellulären Membran. Die F-Gen-defizienten Mutanten können nach rekombinanter Herstellung mit Hilfe induzierbar F-Protein-exprimierender Helferzellen vermehrt werden. Nach Infektion von Nicht-Helferzellen (Zielzellen) werden Virus-kodierte Reportergene exprimiert werden, folglich auch virale Gene synthetisiert und das virale Genom in den infizierten Zielzellen vervielfältigt. Die F-Gen-defizienten Mutanten können aus infizierten Zielzellen entlassen werden, wobei Infektionen nebenliegender Zellen wegen der Abwesenheit von F-Proteinen in der Virushülle bisher nicht beobachtet werden konnten.

Die Anwendung eines solchen Vakzine-Typs würde einige Risiken mit sich bringen, da auch in diesem Ansatz die Zielvorgaben an eine sichere Vakzine nur teilweise erfüllt sind: Wenn Helferzellen für die Induktion der F-Gen Expression mit rekombinanten Adenoviren infiziert werden müssen, hat dies eine adenovirale Kontamination der SeV-Mutanten zur Folge. Diese Problematik könnte umgangen werden, wenn zur Vermehrung eine stabil F-Gen-exprimierende Helferzelle verwendet würde. Des Weiteren aber würden auch replikationsfähige virale Nukleokapside, nach einer Applikation in großen Mengen im infizierten Gewebe angereichert, was eine persistente Infektion zur Folge haben könnte. Persistente Infektionen können bei Personen mit verringerter Immunreaktivität zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Auch könnte es bei einer nachfolgenden, natürlichen Infektion der geimpften Person mit RNA-Viren, welche ein dem F-Oberflächenprotein funktionell analoges Protein synthetisieren, zur Mobilisierung der im Gewebe angereicherten F-Gen-defizienten Mutanten kommen. Beides, virale Persistenz als auch eine Mobilisierung, könnten bei Anwendungen im Humanbereich zu schwerwiegenden Nebenwirkungen bei der geimpften Person führen.

Bei der Etablierung einer Vakzine ist immer die Zielgruppe, an der dieser Impfstoff angewendet werden soll, ein wesentlicher Faktor. Die humanen Paramyxoviren PIV und RSV verursachen vor allem bei Kleinstkindern, teils auch bei älteren Personen schwere Infektionen der Atemwege. Daher muss eine Vakzine gegen humane Paramyxoviren den gegebenen Reaktivität angepasst werden: Säuglinge, deren Immunsystem noch nicht voll ausgereift ist, sollten möglichst in den ersten Lebensmonaten gegen die viralen Erreger immunisiert werden. Dabei müsste eine Lebendvakzine angewendet werden, die ein sicher attenuiertes Replikationsverhalten oder besser noch ein replikations-defizientes Verhalten aufweist, um den Säugling keinesfalls zu gefährden. Der kindliche Immunstatus wird von mehreren Faktoren beeinflusst: In den ersten Lebensmonaten befinden sich im Blutkreislauf des Kindes noch maternale Antikörper. Die maternalen Antikörperspektren sind dabei abhängig vom Immunstatus der Mutter, also von Kleinkind zu Kleinkind verschieden. Diese maternalen Antikörper eines Säuglings dürfen bei einer aktiven Immunisierung die Vakzine nicht abfangen, sonst kann es zu keiner körpereigenen, vollständigen Immunantwort kommen. Entsprechend

hoch muss eine Impfdosis gewählt werden, was aber nur bei einem sicheren viralen Lebendimpfstoff zulässig ist. Eine solche sichere Vakzine, die sich z.B. durch replikations-defizientes Verhalten auszeichnet, könnte auch in Sonderfällen zur Anwendung kommen, etwa bei Säuglingen, die zeitgleich bestimmte Chemotherapeutika einnehmen müssen, bei Frühgeborenen, bei Neugeborenen-Gelbsucht, bei chronischen Stoffwechselkrankheiten, bei kleinen Kindern mit Herzfehlern oder mit Chromosomen-Anomalien (Down-Syndrom). In diesen Fällen ist das Immunsystem des Kindes häufig geschwächt und entsprechende Vorsicht beim Einsatz von Lebendimpfstoffen ist geboten.

Eine weitere Zielgruppe für die Vakzinierung gegen humane Parainfluenzaviren stellen ältere Menschen dar, deren Immunsystem sich meist durch eine verzögerte Reaktionsfähigkeit auszeichnet, was eine verlangsamte oder nicht mehr vollständige Eliminierung der viralen Vakzine zur Folge haben würde. Auch in diesem Fall muss also eine Vakzine angewendet werden, die eine aktive Immunisierung ohne unerwünschte Nebenwirkungen garantiert.

Anhand dieser Ausführungen wird deutlich, dass ein viraler Vektor auf Basis des Sendai-Virus für den Einsatz in der Impfstoffentwicklung mehrere Kriterien erfüllen musste:

- Um den viralen Vektor für eine Vakzinierung von Säuglingen oder älteren Menschen verwenden zu können, musste eine Mutante entwickelt werden, die in der Zielzelle zu keiner Vermehrung fähig ist, eine notwendige Modifikation, um die sichere Anwendung des Vektors zu gewährleisten. Die Replikations-Defizienz sollte durch Deletion eines der Gene des Polymerase-Komplexes oder deren funktionellen Domänen sichergestellt werden.
- Wegen der Deletion eines essentiellen viralen Gens oder der Deletion einer funktionellen Domänen eines Proteins des Polymerase-Komplexes musste zur Vermehrung des Vektors eine Helferzelle bereitgestellt werden, die das fehlende oder modifizierte Protein stabil *in trans* zur Verfügung stellt. Nur so konnte eine effiziente Amplifikation sichergestellt werden.
- In infizierten Zielzellen sollte – trotz der Deletion eines Gens oder einer funktionellen Domäne des Polymerase-Komplexes - eine effiziente Expression der Virus-kodierten Transgene stattfinden, damit eine vollständige Immunantwort hervorgerufen werden kann.
- Der Vektor auf Basis von Negativstrang-RNA-Viren sollte mehrere virale Transgene kodieren können, um die gleichzeitige Synthese mehrerer Antigene von verschiedenen Viren in der infizierten Zielzelle zu gewährleisten.

4.1 Erweiterung der Kodierungskapazität von SeV durch zusätzliche Transgene

Virale Einzelstrang-RNA-Viren mit zusätzlich eingebauten Transgenen eignen sich sehr gut für den Gentransfer und zeigen eine effiziente Transgenexpression *in vitro* und *in vivo* (Hasan et al., 1997; Masaki et al., 2001; Shiotani et al., 2001). So konnten durch reverse Genetik unter Anderem bereits rekombinante Respiratorische Syncytial Viren (RSV) und Masernviren mit einem zusätzlichen Transgen bereitgestellt werden (Bukreyev et al., 1996; Hasan et al., 1997; Yu et al., 1997).

Eine Erweiterung der Kodierungskapazität ist bei Negativstrang-RNA-Viren leichter zu realisieren. RNA-Viren mit positiver Orientierung tolerieren die Integration von Fremdgenepitopen nur in Ausnahmefällen, da es hier nach zellulärer Infektion zur Synthese eines Vorläuferpolyproteins kommt, welches im Anschluss durch virale Proteasen spezifisch in die einzelnen Strukturproteine gespalten werden muss. Protease-Spaltstellen sowie für den Aufbau des viralen Kapsids essentiellen Bindedomänen der viralen Proteine dürfen nicht verändert werden.

Das negativsträngige RNA-Genom von SeV eignet sich dagegen sehr gut für die Expression zusätzlicher Transgene, da zusätzliche Transkriptionskassetten eingesetzt werden können. Während der Transkription der viralen mRNA von SeV Wildtyp (wt) erfolgt eine Reduktion der Transkripte an den Übergängen *leader*/ N-Gen, M-/ F-Gen und HN-/ L-Gen. Gene im 3'-Bereich des Genoms werden also aufgrund des natürlichen Transkriptionsgradienten stärker exprimiert als Gene, welche in Richtung 5'-Bereich lokalisiert sind (Homann et al., 1990; Tokusumi et al., 2002). Um zusätzliche Transgene mit maximaler Effizienz zu exprimieren, sollten diese demzufolge in den 3'-Bereich des viralen SeV Genoms inseriert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante SeV mit einer oder zwei zusätzlichen Transgenkassetten hergestellt. Alle Transkriptionskassetten wurden dabei so konzipiert, dass auf Plasmid-Ebene nach dem *leader*-Bereich eine bzw. zwei Transkriptionskassetten mit singulären Restriktionsschnittstellen für die Integration der jeweiligen Leserahmen eingebracht wurden. Zunächst wurden für Untersuchungen in Zellkultur Leserahmen von fluoreszierenden Proteinen in die Transkriptionskassetten eingefügt. Im späteren Gebrauch können beliebige Leserahmen von Antigenen in diese Transkriptionskassetten eingefügt werden.

Die Insertion eines Transgens im 3'-Bereich des vollständigen SeV Genoms an Position 1 wurde in einer japanischen Arbeitsgruppe bereits erfolgreich durchgeführt (Hasan et al., 1997). Das rekombinante Virus wurde hier so konzipiert, dass nach Nukleotidposition 119 der nicht-kodierenden Region des N-Gens der ORF des Luciferase-Gens (1,65 kb) mit anschließender Genstopp-Sequenz,

intergenem Triplet (IR) und Genstart-Sequenz über eine eingebaute singuläre *Not I*-Restriktionsschnittstelle in das virale Genom des Sendai-Virus (Z-Stamm) kloniert wurde [pSeVluc (+)]. Das von Hasan konzipierte rekombinante SeVluc (+) konnte initial hergestellt werden, wobei die Effizienz der initialen Herstellung wegen des Einbaus von etwa 1,65 kb Fremdgensequenz zehn Mal schwächer war im Vergleich zu rekombinanten SeV wt Viren (Stamm Z).

Das in unserer Arbeitsgruppe verwendete Sendai-Virus (Stamm F) wurde im 3'-Bereich des Genoms ebenfalls mit einer zusätzlichen Transgenkassette ausgestattet (3.1.1). Diese Integration einer zusätzlichen Transgenkassette mit dem Leserahmen des Gens des fluoreszierenden Proteins eGFP (Fremdgensequenz 0,8 kb) war erfolgreich. Die initiale Herstellung und die Vermehrung des daraus resultierenden rekombinanten SeV-eGFP konnten mit ähnlicher Effizienz wie die Herstellung und Amplifikation rekombinanter SeV wt Viren durchgeführt werden. Auch die Vermehrung des rekombinanten Virus verlief erwartungsgemäß ohne Komplikationen.

Um die Kodierungskapazität weiter auszubauen, wurden erstmals zwei zusätzliche Transgenkassetten in den 3'-Bereich des viralen SeV Genoms kloniert. Ein vergleichbares Konstrukt wurde noch nicht beschrieben. Bisher wurde nur über ein rekombinantes Masernvirus (MeV) berichtet (Singh & Billeter, 1999), das die genetischen Informationen der zwei Untereinheiten des humanen Interleukin-12, p35 und p40, in einer einzigen zusätzlichen Transkriptionseinheit zwischen den Genen HN und L integriert trägt. Die beiden kodierenden Regionen p35 und p40 wurden hier durch eine „internal ribosome entry site“ (IRES-Sequenz) voneinander getrennt und sind damit nicht in zwei individuellen Transkriptionskassetten kodiert. Dadurch kommt es zu einer stark reduzierten Expression des nach dem IRES-Element kodierten Transgens. Eine Integration von zwei Fremdgenen mit zwei unabhängigen Transkriptionskassetten an 3'-Position ist bisher in der Literatur nicht zu finden. Die in der vorliegenden Arbeit versuchte Integration zweier zusätzlicher Transgenkassetten mit den Genen für die fluoreszierenden Proteine eGFP und DsRed (Fremdgensequenz 1,65 kb) verlief erfolgreich (SeV-eGFP-DsRed). Die initiale Herstellung und auch die Vermehrung des rekombinanten Virus konnten effizient durchgeführt werden. SeV mit zwei Transgenkassetten weisen eine um etwa 50 % verminderte Effizienz der Virusfreisetzung auf, die Virusproduktion von SeV-eGFP-DsRed ist also nur um Faktor 2 vermindert.

Die beiden Varianten SeV-eGFP und SeV-eGFP-DsRed zeigten in Zellkultur eine starke Expression der Fluoreszenzproteine, welche darauf schließen lässt, dass beide Gene effizient exprimiert werden. Die Integration von zwei Fremdgenen in die zwei Transgenkassetten ermöglicht somit zukünftig die Etablierung von viralen Vektoren mit zwei zusätzlichen Transgenen bzw. Antigenen und erweitert damit deren Kodierungskapazität: In die zwei Kassetten können zum einen zwei verschiedene

Leserahmen heterologer Antigene eingefügt werden, zum anderen könnte die Expression eines Antigens durch den Einbau seiner genetischen Information in beide Kassetten verstärkt werden.

Neben den zusätzlichen Transgenkassetten sollen auch die Gene der SeV Oberflächenantigene zur Synthese heterologer Antigene eingesetzt werden: Die Gene der SeV Oberflächenproteine F und HN können gegen die Gene von Oberflächenproteinen anderer Paramyxoviren, wie etwa hPIV oder RSV ausgetauscht werden. In unserer Arbeitsgruppe konnten bereits erfolgreich rekombinante Sendai-Viren erzeugt werden, welche chimäre Formen dieser beiden Oberflächenproteine zur Verfügung stellen (persönliche Mitteilung, S. Bossow). Demnach ist das Prinzip der Fremdkodierung durch rekombinante Parainfluenzaviren Typ 3 von Schmidt et al. auch auf rekombinante SeV übertragbar (Schmidt et al., 2001). So könnte der Vakzine-Prototyp bei der späteren Anwendung nur noch aus einem Sendai-viralen Rückgrat bestehen, Gene von immunstimulierenden Oberflächenproteinen heterologer Virustypen exprimieren und durch die erweiterte Kodierungskapazität im 3'-Bereich weitere virale Antigene synthetisieren.

4.2 Anwendungssichere Vektoren durch Gen-Defizienz

Im Gegensatz zum Einsatz von SeV in der Gentherapie, bei der ein geringes humanpathogenes Potential und die fehlende Integration des viralen Genoms in die Wirtszell-DNA im Vordergrund stehen müssen, soll im Bereich der Vakzinierung die Expression viral-kodierter Gene in infizierten Zielzellen zu einer starken Stimulation der humoralen und der zellulären Immunantwort führen. Die Eliminierung der Antigen-präsentierenden Zellen durch die Reaktion des Immunsystems ist erwünscht und zeigt den Erfolg der Immunisierung. Wesentliches Ziel ist eine möglichst lang anhaltende Immunität der geimpften Person gegen die im Vektor kodierten, virusspezifischen Antigene.

Um die geforderten Sicherheitsstandards bei der Anwendung viraler Vektoren im Bereich der Vakzinierung von Risikogruppen erfüllen zu können, sollte ein virales Gen oder eine Teilsequenz eines viralen Gens aus dem SeV Genom entfernt werden. Ein F-Gen-defizientes SeV wurde bereits von Li vorgestellt (Li et al., 2001). Bei Anwendung einer solchen Virusmutante im Impfstoffbereich wäre zum einen eine Mobilisierung durch verwandte Viren möglich, es könnte also zur unkontrollierten Ausbreitung des Erregers in der geimpften Person kommen. Darüber hinaus könnte sich das nicht-übertragbare, aber mit replikationsfähigen Nukleokapsiden ausgestattete Virus in Form einer persistenten Infektion im Gewebe des Geimpften manifestieren.

Durch die persistente Manifestation von Masernviren etwa kann es bei Betroffenen zu seltenen, aber sehr schweren Komplikationen kommen: Die subakute sklerosierende Panencephalitis (SSPE) ist eine dieser Formen. SSPE tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:100 000 sechs bis fünfzehn Jahre nach

einer akuten Masernerkrankung auf und verläuft immer tödlich. Die SSPE manifestiert sich pathohistologisch als Knötchenencephalitis. Vermutlich infiziert das Virus die Gehirndothelzellen und tritt von hier aus in das Gehirn über. Im Gehirn finden sich Viren mit Mutationen in den M-, H- und F-Genen, die überwiegend nicht mehr infektiös sind (Cathomen et al., 1998). Voraussichtlich kann sich die persistente Infektion durch Weitergabe der Nukleoproteinkomplexe und durch Zellfusion im zentralen Nervensystem ausbreiten (Modrow et al., 2003). Eine persistente Infektion kann demzufolge schwere Schäden mit sich bringen. Bei Menschen mit unausgereiftem oder geschwächtem Immunsystem könnte es zu einer verzögerten Eliminierung von Viren aus dem Organismus und damit zu schweren Schädigungen kommen.

Ob die lebenslange Immunität gegen eine Virusinfektion mit einer persistierenden Infektion zusammenhängt, ist bislang ungeklärt. Um die Frage nach der Persistenz von Lebendvakzinen und Wildtyp Viren näher zu erforschen, wurden von 51 eines natürlichen Todes verstorbenen Personen im Alter zwischen 4 Monaten bis 88 Jahren im Zeitraum von April bis Dezember 1995 bei Autopsien Gewebeproben (Gehirn, Leber, Milz, Niere oder Lungengewebe) entnommen und nach RNA-Isolation mittels RT-PCR auf die Anwesenheit von mRNA des Masernvirus untersucht. In 23 von 51 untersuchten Gewebeproben konnte spezifische Masernvirus mRNA detektiert werden. Seit mehr als 25 Jahren werden Säuglinge ab dem 12. Lebensmonat mittels eines attenuierten Lebendimpfstoffes gegen eine Masernvirusinfektion geimpft. Da sowohl in Gewebeproben älterer als auch jüngerer Menschen Masernvirus mRNA-Moleküle gefunden wurden, liegt der Schluss nahe, dass das Masernvirus, in seiner Wildtyp Form als auch in der attenuierten Form als Lebendvakzine, nach Infektion oder Impfung in hier 50 % der untersuchten Fälle persistent im Körper verweilt (Katayama et al., 1997).

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit zu entwickelnden Vakzine-Prototyp auf Basis von Sendai-Virus für die Impfung von Kleinstkindern oder immungeschwächten, älteren Personen, sollte der Sicherheitsaspekt des Vektors an erster Stelle stehen. Persistente Infektionsverläufe wären unerwünscht, da bei den beiden Zielgruppen keine vollständig ausgeprägte Reaktivität des Immunsystems angenommen werden kann. Deshalb wurde es als notwendig erachtet, für eine Impfung dieser Zielgruppen einen replikations-defizienten Vektor zu verwenden. Die virale Replikation des Vektors im Zielgewebe sollte durch Deletion funktioneller Gene oder Teilbereiche funktioneller Gene des viralen Polymerase-Komplexes unterbunden werden.

In der Literatur wurde kein Hinweis auf die Existenz negativsträngiger RNA-Viren mit teil-deletierten Polymerase-Komponenten gefunden. Es konnte lediglich eine Literaturstelle ermittelt werden, in der Radecke und Mitarbeiter die Verwendung einer stabil MeV N- und P- Protein exprimierenden Helferzelllinie beschreiben. Diese Zelllinie wurde aber nicht für die Vermehrung replikations-

inkompetenter RNA-Viren verwendet, sondern für die initiale Herstellung von rekombinanten Masern Wildtyp Viren (Radecke et al., 1995). Vorarbeiten kommen aus unserer Arbeitsgruppe (Willenbrink & Neubert, 1994): Willenbrink etablierte eine Helferzelle H29, die die Proteine N, P und L in einem Mengenverhältnis 5:10:< 5 im Vergleich zu SeV Wildtyp-infizierten CV1 Zellen exprimiert (3.3.3.1). Die Helferzelllinie H29 sollte ursprünglich ebenfalls für die initiale Herstellung rekombinanter Sendai-Viren in einem Vaccinia Virus freien System entwickelt worden. Von Willenbrink konnte durch RT-PCR und Northern Blot-Analysen ermittelt werden, dass die Helferzelle H29 über einen Untersuchungszeitraum von 90 Tagen in der Lage ist, die Nukleokapside von defektiven-interferierenden Partikeln (DI-H4) mit einer Genomgröße von nur 1410 nt, d.h. ohne ein einziges vollständiges SeV Gen, durch die Bereitstellung der Proteine N, P und L zu amplifizieren.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Herstellung replikations-defizienter SeV Vektoren zunächst nach dem Konzept, die Gene N, P oder L im SeV Genom vollständig zu deletieren: Das Nukleokapsidprotein (N) verpackt bei der Replikation des Wildtyp Virus naszierende RNA-Genome. Ein N-Gen-defizienter Vektor könnte mit Hilfe der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Helferzelllinie H29 vermehrt werden. Nach Infektion einer Zielzelle könnten die viralen Gene, darunter die kodierten Antigene exprimiert werden. Zusätzlich könnten durch die Synthese von P- und L-Proteinen weitere virale P:L-Komplexe (RdRp) zur Verfügung gestellt werden, die die Transkription unterstützen sollten. Dagegen könnte die Vermehrung eines N-Gen-defizienten Vektors wegen der fehlenden Verpackung naszierender Genome nicht stattfinden, wodurch die Ausschleusung neuer Viruspartikel aus der Zielzelle unterbunden wäre. Am Anfang der Arbeit war wegen des gegebenen Rationales, dass das N-Protein für die virale Transkription nicht essentiell ist, ein N-Gen-defizienter SeV Vektor der bevorzugte Kandidat für die Etablierung eines replikations-defizienten viralen Vektors.

Das SeV P-Protein und das L-Protein sind mittels mehrerer funktioneller Domänen sowohl an der Transkription, als auch an der viralen Replikation beteiligt. P- oder L-Gen-defiziente Vektoren sollten theoretisch ebenfalls mit Hilfe der Zelllinie H29 amplifiziert werden können. Nach Infektion von Zielzellen sollte es durch die auf der N:RNA transferierten P:L-Komplexe zu einer primären Transkription der kodierten Antigene kommen, wodurch eine Immunantwort induziert werden könnte. Wegen der Deletion der Gene P oder L können in infizierten Zielzellen keine funktionellen Polymerase-Komplexe mehr gebildet werden. Zum einen ergibt sich dadurch, dass die virale Transkription, anders als bei einem N-Gen-defizienten Vektor, nicht weiter unterstützt werden kann, zum anderen aber ist damit eine Ausbreitung des Vektors in der Zielzelle auch mit Sicherheit unterbunden.

Alle drei viralen Vektoren SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P, - Δ L konnten initial in Zellkultur bei Expression der viralen Proteine N, P oder L mit einer Effizienz von 56 %, 27 % und < 5 % im Vergleich zu

rekombinanten SeV Viren hergestellt werden (2.8). Die biologische Funktionalität der Vektoren wurde dadurch überprüft, dass diese zusammen mit SeV wt Viren durch „virale Transkomplementation“ erfolgreich vermehrt werden konnten (3.3.1). Mit Hilfe der rekombinanten Vaccinia Viren, welche die SeV Proteine N, P und L exprimieren, konnten anhand von Koinfektions- und Transkomplementationsversuchen die für die Vermehrung der einzelnen Vektoren notwendigen Hilfsproteine ermittelt werden (3.3.2).

Wird eines der Gene N, P oder L aus dem viralen SeV Genom entfernt, muss das entsprechende Protein eventuell zusammen mit einem zweiten viralen Protein für eine effiziente Vermehrung der Vektoren *in trans* durch ein geeignetes Helfersystem bereitgestellt werden. Als erstes Vermehrungssystem für die drei Gen-defizienten Vektoren bot sich die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Helferzelllinie H29 an, welche die Proteine N, P und L in einem Verhältnis N:P:L von 5:10:<5 im Vergleich zu SeV infizierten CV-1 Zellen exprimiert (Willenbrink & Neubert, 1994). Mit Hilfe der H29 Helferzellen sollte es demnach theoretisch möglich sein, alle drei Vektoren SeVV-eGFP- Δ N, - Δ P und - Δ L vermehren zu können, da die zur Vermehrung erforderlichen Hilfsproteine (3.3.2), N- und P-Protein im Fall von SeVV-eGFP- Δ N, P-Protein im Fall von SeVV-eGFP- Δ P und P- und L-Protein im Fall von SeVV-eGFP- Δ L zur Verfügung gestellt werden. Neben der Expressionsstärke der einzelnen Proteine in H29 Zellen sind auch die molaren Verhältnisse der Proteine N und P bzw. P und L für eine erfolgreiche Vermehrung von SeVV-eGFP- Δ N bzw. SeVV-eGFP- Δ L von Bedeutung.

Nach Infektion von H29 Zellen mit SeVV-eGFP- Δ N oder SeVV-eGFP- Δ L kam es aber in keinem Fall zur Ausbreitung der viralen Vektoren in der Kultur. Lediglich eine Expression des Reportergens eGFP in den infizierten H29 Zellen konnte detektiert werden. Daraus lässt sich folgern, dass die virale Transkription, zumindest des proximal liegenden eGFP-Gens, durch die zelluläre Bereitstellung der entsprechenden SeV Proteine positiv unterstützt wird. Da die biologische Intaktheit der Vektoren SeVV-eGFP- Δ N und SeVV-eGFP- Δ L durch Transkomplementation mit SeV wt bestätigt worden war (3.3.1), ergibt sich, dass die vom Helfersystem synthetisierten Mengen der drei SeV Proteine für eine erfolgreiche Amplifikation dieser beiden Vektoren nicht geeignet sind.

Im Fall des Vektors SeVV-eGFP- Δ P konnte aber eine Vermehrung durch zelluläre Transkomplementation mit Hilfe der Zelllinie H29 erreicht werden. Die Expression des P-Proteins in H29 Zellen entspricht einem um etwa 90 % verminderten Expressionslevel im Vergleich zu SeV wt infizierten CV-1 Zellen, dennoch reicht die in H29 Zellen synthetisierte P-Proteinmenge aus, um SeVV-eGFP- Δ P mit einer Effizienz von mehr als 40 % im Vergleich zu SeV wt infizierten H29 Zellen zu amplifizieren (3.3.3.3).

Für das P-Protein wurden bisher zwei Funktionen beschrieben: Es liegt in Form eines Tetramers, komplexiert mit monomerem L-Protein vor und dieser als RdRp bezeichnete Komplex wandert während der viralen Transkription auf dem mit N-Protein verpackten viralen Genom, um die mRNA Synthese durchzuführen. Zum anderen wird das P-Protein während der Replikation benötigt: Das P-Protein komplexiert mit dem viralen N-Protein zu einem so genannten N⁰:P-Komplex, welcher an das im RdRp vorhandene L-Protein bindet. Während der Replikation gibt der N⁰:P-Komplex das N-Protein ab, welches für die Verpackung naszierender RNA-Genome verwendet wird. Da eine P-Proteinmenge von nur 10 % (im Vergleich zu SeV infizierten Zellen) in H29 Zellen ausreicht, um SeVV-eGFP-ΔP mit guter Effizienz zu vermehren, könnte angenommen werden, dass das P-Protein während dieses Prozesses nicht verbraucht wird und nach Abgabe des N-Proteins wieder funktionell zur Verfügung steht und für weitere N⁰:P-Komplexierungen oder P:L-Formationen verwendet werden kann.

Mit dem Vektor SeVV-eGFP-ΔP war es erstmals gelungen, ein für die virale Replikation essentielles Gen aus dem viralen Genom zu entfernen, und dennoch eine effiziente Vermehrung des viralen Vektors mit Hilfe der Helferzelllinie H29 zu erreichen.

Da H29 Zellen an sich schlechte Virusproduzenten sind (3.3.3.1.4) sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden eine weitere Helferzelllinie zur Amplifikation von SeVV-eGFP-ΔP zu etablieren. Für deren Herstellung wurden CHO-Zellen verwendet, die SeV etwa 7 Mal effizienter vermehren als H29 Zellen (3.3.3.1.4) und dem GMP-Standard entsprechen. Unter Verwendung geeigneter Promotor- und Enhancer-Elemente wurde die Helferzelllinie CHO-P14 etabliert. CHO-P14 Helferzellen exprimieren das SeV P-Protein in etwa genauso stark wie H29 Zellen, die erhoffte Steigerung der P-Expression in stabil transfizierten CHO-Zellen konnte folglich nicht erreicht werden. Ein Grund für die fehlende Steigerung der P-Proteinexpression durch eine Helferzelle könnte darin liegen, dass die in der Zelle vorliegende Menge an P-Protein ab einer gewissen Konzentration nachteilig für deren Wachstumsverhalten ist.

Alle Versuche, den Vektor SeVV-eGFP-ΔP mit Hilfe der Zelllinie CHO-P14 zu vermehren, blieben erfolglos (3.3.4.5). Um eine mögliche Ursache für die fehlende Transkomplementation zu untersuchen, wurde die zelluläre Gensequenz des P-Gens mittels PCR-Reaktion vervielfältigt und sequenziert. Es konnten aber keine Mutationen identifiziert werden, die einen Aminosäureaustausch bewirkt hätten. Dieses Ergebnis zeigt erneut, dass die Etablierung von Helferzelllinien zur Vermehrung von P-Gen-defizienten SeV Mutante ein aufwendiges und komplexes Verfahren ist. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass in der Literatur nur zwei Veröffentlichungen für Helferzellen zu finden sind, die Bereitstellung der MeV N- und P-Protein synthetisierenden Zelllinie zur Herstellung rekombinanter MeV (Singh & Billeter, 1995) und die von Willenbrink durchgeführte, langwierige Selektion der Helferzelllinie H29 (Willenbrink & Neubert, 1994).

Mithilfe der Helferzelllinie H29 kann eine ausreichende Menge an SeVV-eGFP- Δ P zur Verfügung gestellt werden, um vorklinische Studien durchführen zu können. Es konnte deshalb mit den durch die Helferzelle vermehrten Vektoren weitergearbeitet werden und die Expression der Vektor-kodierten Gene nach Infektion von Zielzellen untersucht werden.

4.3 Expression der Vektor-kodierten Transgene in der Zielzelle

Vorstellungen zur Expression von Antigenen bzw. Transgenen in einer SeVV-eGFP- Δ P infizierten Zielzelle können von der Situation in einer wt-infizierten Zelle abgeleitet werden: Im Zytoplasma einer SeV wt infizierten Zelle liegt, bei entsprechender MOI, zunächst meist nur ein mit P:L-Komplexen (RdRp) und N-Proteinen assoziiertes, negativsträngiges RNA-Genom vor. An diesem einzelnen Nukleokapsid erfolgt nun die Synthese von mRNA-Molekülen, katalysiert durch die RdRp-Aktivität. Von den entstehenden mRNA-Transkripten werden im weiteren Verlauf die entsprechenden Proteine translatiert. Bevor ein neues, zunächst positivsträngiges RNA-Genom für die Initiierung der Replikation synthetisiert und verpackt werden kann, müssen mehrere zehntausend N-Proteine in der infizierten Zelle angehäuft werden. Dieser Prozess setzt eine hohe Aktivität der initial vorhandenen P:L-Komplexe voraus oder aber beinhaltet die Bereitstellung neuer P:L-Komplexe durch die stattfindende Genexpression.

In diesem Zusammenhang ist die Halbwertszeit der Nukleokapside von entscheidender Bedeutung, d.h. die Zeit, in der das Nukleokapsid nach Infektion der Zelle transkriptionsaktiv bleibt. Die einzige Abschätzung zur Halbwertszeit eines Nukleokapsids kommt von einem Experiment von Mottet et al. (1994). Hier wurde gezeigt, dass nach Infektion von Zellen mit defektiven-interferierenden Partikeln (DIP) von Sendai- oder Masernvirus 1 bis 3 Tage vergehen dürfen, um durch Superinfektion mit dem entsprechenden Wildtyp Virus noch eine Replikation der DIP-Genome zu erreichen. Da die virale Genomreplikation als noch aufwendiger als die Genomtranskription angesehen wird, kann von einer Halbwertszeit der Genomtranskription von ebenfalls mindestens 1 bis 3 Tagen ausgegangen werden. Dieser Zeitraum sollte bei einer Anwendung im Vakzinierungsbereich ausreichend sein, um die Synthese viraler Antigene zu gewährleisten.

Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob SeV Nukleokapside bis zum Zeitpunkt des Replikationsstartes auch ohne das Vorhandensein neu synthetisierter P:L-Komplexe (RdRp) transkriptionskompetent sind („nicht-unterstützte Transkription“) und somit eine ausreichende Expression viraler Gene bewirken oder, ob zur Unterstützung der Transkription neu synthetisierte P:L-Komplexe benötigt werden („unterstützte Transkription“). Im Fall von SeVV-eGFP- Δ P kann die virale Transkription nur durch die wenigen, mit dem Nukleokapsid transferierten P:L-Komplexen erfolgen. Es musste ermittelt

werden, ob diese „nicht-unterstützte“ Transkription in infizierten Zielzellen bereits ausreicht, um eine effiziente Transgenexpression zu detektieren.

Durch Infektion von Zielzellen (Verzellen) mit dem Vektor SeVV-eGFP- Δ P (MOI 1) konnte diese Frage geklärt werden: Weder zwei Tage nach der Infektion der Zielzellen noch zu einem späteren Zeitpunkt konnte visuell oder durch Western Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt) eine Expression des Reportergens eGFP detektiert werden. Demzufolge reicht die „nicht-unterstützte“ Transkriptionsleistung nicht aus, um Proteinnengen in einer Größenordnung von 1×10^6 eGFP-Molekülen pro Zelle herzustellen, die für eine Lichtreaktion als erforderlich angesehen werden (mündliche Mitteilung, Firma Clontech).

Bei Erhöhung der Anzahl von SeVV-eGFP- Δ P Nukleokapsiden pro infizierte Zielzelle (Infektion MOI 3) konnte eine eGFP-Expression dann in 0,01 % der infizierten Zellen erzielt werden (3.4.1). Aufgrund der niedrigen Zahl an spezifisch leuchtenden Zielzellen handelt es sich hierbei offensichtlich um jene Zellen, die aufgrund der statistischen Verteilung (Poisson) mit 15 oder mehr viralen Vektoren infiziert wurden. Es konnte also gefolgert werden, dass in einfach SeVV-eGFP- Δ P infizierten Zielzellen eine initiale Transkriptionsleistung stattfindet, diese aber nicht ausreicht, um Transgene nachweislich zu exprimieren.

Daher musste versucht werden, den viralen Vektor derart zu modifizieren, dass auch durch ein einzelnes transferiertes Nukleokapsid eine effiziente Transkription in der Zielzelle zu erreichen ist. Da durch Deletion des P-Gens auch die virale Transkription drastisch reduziert ist, musste überlegt werden, welche Teile des P-Proteins kodiert werden könnten, ohne die Vektoren wieder replikationskompetent zu machen. Der rekombinante Einbau des gesamten P-Gens würde die Replikationsfähigkeit des Vektors regenerieren, bietet daher keine Möglichkeit die Transkription in der Zielzelle zu verbessern. Weiterhin befinden sich im P-Gen alle Leserahmen der SeV Nichtstrukturproteine. Durch Deletion des P-ORF werden auch alle Leserahmen der Nichtstrukturproteine aus dem viralen Genom entfernt, diese stehen so in der infizierten Zielzelle nicht mehr zur Verfügung. Durch zusätzliche Kodierung der Nichtstrukturproteine V oder W auf dem Vektor würden in beiden Fällen gleichzeitig die Proteine C, Y1 und Y2 mitkodiert werden. Der Leserahmen des C'-Gens beginnt einige Nukleotide vor dem ATG-Codon der Leserahmen der Proteine V und W und wird wegen der Integration der *Xho I*-Restriktionsschnittstelle in SeVV-eGFP- Δ P um zwei Aminosäuren verlängert und damit in abgewandelter Form ebenfalls kodiert. Bis auf das X-Protein könnten also alle Nichtstrukturproteine in der infizierten Zielzelle bereitgestellt und dadurch unter Umständen die Vektor-induzierte Genexpression in der Zielzelle gesteigert werden.

Dieser Weg zur Verbesserung der Expression in der Zielzelle, der Einbau der genetischen Information von Nichtstrukturproteinen, brachte keine Erfolge mit sich: Wurden Zielzellen (Verzellen) mit SeVV-eGFP- Δ P-V oder -W mit einer MOI von 1 infiziert, kam es, analog zu den Infektionsversuchen mit

SeVV-eGFP- Δ P, in keiner der infizierten Zellen zu einer detektierbaren Expression des Reportergens eGFP. Demzufolge kann die zusätzliche Kodierung der Gene der SeV Nichtstrukturproteine die Transkription in der Zielzelle nicht positiv unterstützen.

Eine weitere Möglichkeit, die Expression der Vektor-kodierten Gene in der Zielzelle zu unterstützen, wurde dann darin gesehen, eine N-terminal verkürzte Form des P-Proteins in den Vektor einzusetzen: Curran und seine Mitarbeiter hatten durch *in vitro*-Untersuchungen eine N-terminale Domäne des P-Proteins (As 1-77) identifiziert, die für die Verpackung naszierender RNA-Genome und damit für die Genomreplikation verantwortlich gemacht wurde (Curran et al., 1994). Für die Replikation, im speziellen die Verpackung von neu synthetisierten SeV RNA-Genomen oder Antigenomen in infizierten Zellen, müssen funktionelle Komplexe aus P-Protein und N-Protein gebildet werden, so genannte N⁰:P-Komplexe. Die N⁰:P-Komplexe sollen sich während der Replikation an das L-Protein der RdRp anlagern; das N-Protein soll während der Synthese von RNA-Genome vom N⁰:P-Komplex abgegeben und zur Verpackung der naszierenden Genome verwendet werden.

Für die Komplexierung zwischen N⁰- und P-Protein sollen die N-terminalen 77 Aminosäuren des P-Proteins verantwortlich sein. P-Proteine, denen die N-terminalen 77 Aminosäuren fehlen, sind *in vitro* nicht zur N⁰:P-Komplexbildung fähig, können daher die Verpackung neuer Genomstränge nicht mehr unterstützen, sind dabei aber noch zur mRNA Synthese in der Lage (Curran et al., 1994; Curran, 1996).

Sollten die vorhandenen *in vitro*-Daten auf die geplante *in vivo*-Situation übertragen werden können, könnte ein viraler Vektor, der ein P-Protein exprimiert, dem die N-terminalen 77 Aminosäuren fehlen, in der Lage sein ausschließlich die Transkription in infizierten Zielzellen zu unterstützen. Eine entsprechende Mutante SeVV-eGFP-P Δ 1-77 wurde rekombinant hergestellt. Während der Vermehrung des Vektors SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in H29 Zellen liegen beide Formen des P-Proteins (P zellulär, P Δ 1-77 viral) vor. Der Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 vermehrt sich wie SeVV-eGFP- Δ P mit gleicher Effizienz, es kommt also weder zu einem transdominant negativen Effekt durch das verkürzte P-Protein noch zu einer merklichen Reduktion der viralen Replikation. Daraus lassen sich verschiedene Schlüsse ableiten: Zum einen kann gefolgert werden, dass nur der N⁰:P-Komplex, bestehend aus N-Protein und unverkürztem P-Protein, während der Genomreplikation an das L-Protein binden kann, nicht aber verkürztes P-Protein. Die L-Bindedomäne auf dem P-Protein wird für den Bereich der Aminosäuren 412-478 des P-Proteins vorgeschlagen (Smallwood et al., 1994). Würde verkürztes P Δ 1-77-Protein an das L-Protein binden, würde die Andockstelle für weitere N⁰:P-Komplexe kompetitiv besetzt sein und somit die Verpackung naszierender RNA-Genome in H29 Zellen behindert werden. Die hier erhaltenen Ergebnisse unterstützen somit auch Vorstellungen, nach denen es durch die N⁰:P-Bindung zu einer Konformationsänderung des P-Proteins kommt und P-

Protein erst in dieser Form mit dem L-Protein interagieren kann. Weiterhin ist auch anzunehmen, dass verkürztes P-Protein in P-Tetrameren integriert wird und das verkürzte P-Protein dort funktionell aktiv ist: Beide Bindungsstellen P:RNP (As 479-568) und P:L (As 411-445), sowie die Tetramerisierungsdomäne (As 320-433) sind auf dem verkürzten P-Protein P Δ 1-77 präsentiert. P Δ 1-77 behindert die virale Replikation von SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in H29 Zellen nicht. Wäre P Δ 1-77 während der Genomreplikation nicht funktionell, d.h. müsste während dieses Prozesses das gesamte P-Protein zellulären Ursprungs (Wildtyp Protein) sein, müsste sich ein entsprechender Effekt bei der viralen Transkription in der Zielzelle zeigen.

Erfreulicherweise ergab sich, dass der Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 nach Infektion von Zielzellen (Verozellen) viral-kodierte Transgene, wie das eGFP-Gen oder das HN-Gen, effizient über mehrere Tage hinweg exprimiert. Die Transgenexpression ist im Vergleich zur Expression in wt infizierten Verozellen um etwa Faktor 10 reduziert (3.6.2 und 3.6.3.), was sicherlich auf die fehlende Vermehrung des viralen Genoms zurückgeführt werden kann. Das verkürzte P-Protein P Δ 1-77 wird nach Infektion von Zielzellen synthetisiert und für eine Unterstützung der Transkription funktionell gefaltet. Nach Komplexbildung mit dem L-Protein bilden sich P:L-Komplexe aus, welche die Transkription weiter unterstützen. Durch die hier vorliegenden Ergebnisse konnten die von Curran und Mitarbeitern erhaltenen *in vitro*-Daten zur Expressionsfähigkeit von P Δ 1-77:L-Komplexen erstmals durch *in vivo*-Studien bestätigt werden.

Durch die Transkriptionsleistung des Vektors SeVV-eGFP-P Δ 1-77 werden nach Infektion von Zielzellen Proteinmengen erreicht, die einen ausreichenden immunogenen Stimulus erwarten lassen. Die abschließende Klärung einer ausreichenden Immunstimulation muss in vorklinischen Untersuchungen erfolgen.

4.4 Der Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 ist replikations-defizient

Durch die Integration der genetischen Information einer Teilsequenz des P-Gens (86 %) in den Vektor SeVV-eGFP- Δ P gelang es, die durch den viralen Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 hervorgerufene virale Transkription in der Zielzelle substanziell zu verbessern. *In vitro* kann das verkürzte P-Protein die Replikation von genomischer viraler RNA nicht unterstützen (Curran et al., 1994). Im Fall der Infektion von Zellen mit dem viralen Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 handelt es sich aber um ein *in vivo*-System. Da *in vitro*- und *in vivo*-Analysen auf sehr unterschiedlichen Voraussetzungen beruhen, kann die Funktion eines veränderten viralen Proteins erst im Rahmen eines komplexen Systems beurteilt werden. Um die für den Vektor angestrebten Sicherheitskriterien zu erfüllen, war eine sorgfältige Überprüfung der gewünschten Replikations-Defizienz im zellulären System erforderlich.

Eine Vermehrung replikationsfähiger SeV, welches das Reportergen eGFP exprimieren, kann in Zellkultur durch die Zunahme grün fluoreszierender Zellen in den Folgetagen nach einer Infektion beobachtet werden. Ebenso dient der HAD-Test, durchgeführt an verschiedenen Tagen nach der initialen Infektion von Zellen dazu, sekundär infizierte Zellen anhand einer Komplexierung von humanen Erythrozyten an der Zelloberfläche zu detektieren.

Folglich kann die Replikations-Defizienz des Vektors SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in infizierten Zielzellen durch die fehlende Zunahme fluoreszierender bzw. HAD-positiver Zellen untersucht werden. Um diese Replikations-Defizienz des viralen Vektors SeVV-eGFP-P Δ 1-77 in Zellkultur sicher nachzuweisen, wurden insgesamt vier Untersuchungen durchgeführt, die auf den drei virologischen Methoden Fluoreszenzdetektion, ZID-Test und HAD-Test basieren.

Zunächst wurden Verozellen mit einer MOI von 0,5 mit dem Vektor infiziert und die eGFP-Expression, als Indiz für eine mögliche Verbreitung des Vektors in den bereitgestellten Zellen, über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Im Zeitraum von 21 Tagen konnte visuell keine Zunahme der Anzahl infizierter Zellen mittels eGFP-Detektion festgestellt werden. Wäre der Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 zu einer Ausbreitung im infizierten Zellrasen in der Lage, so sollten sich spätestens 2 d nach Infektion um die initial infizierte, und damit fluoreszierende Zelle weitere fluoreszierende Zellen detektieren lassen. Eine solche Entwicklung konnte nicht beobachtet werden, vielmehr wurde ab dem 12. Tag der Inkubation eine Reduktion der Intensität der Fluoreszenz festgestellt, der einer Abnahme funktioneller eGFP-Proteine zugrunde liegt und die ein Indiz dafür ist, dass die Transkription in SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infizierten Zellen nach mehrtägiger Inkubation abnimmt. 21 Tage nach Inkubationsstart konnten keine fluoreszierenden Zellen mehr detektiert werden, demnach wurden auch die zuvor translatierten eGFP-Moleküle abgebaut und es fand keine Neusynthese der viral-kodierten Proteine statt. In einem zweiten Versuch wurden Verozellen mit dem Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 infiziert (MOI 0,5) und die Zellkulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten auf infektiöse virale Vektoren untersucht (Grundlage ZID-Test, siehe 5.2.2.7). Im Überstand vorhandene Vektorpartikel sollten die zur Verfügung stehenden Verozellen infizieren und diese neu infizierten Zellen könnten wegen der eGFP-Expression detektiert werden. Auch in diesem Ansatz konnte zu keinem Zeitpunkt eine Ausbreitung fluoreszierender Zellen beobachtet werden.

In einer dritten Versuchsreihe wurden Verozellen mit einer MOI von 0,001 infiziert. Diese geringe Anzahl an Vektorpartikeln wurde gewählt, um nach der Infektion eine derart kleine Anzahl an fluoreszierenden Zellen zu haben, dass sich diese in weitem Abstand zueinander befinden und somit eine eventuelle Ausbreitung auf nebenliegende Zellen erkannt werden könnte. Die infizierten Zellen wurden über 12 Tage inkubiert; wiederum konnte die Replikations-Defizienz des Vektors bestätigt werden, da es bei keiner der initial infizierten Zellen zur Ausbreitung des Vektors auf umliegende Zellen kam.

In einem letzten Versuch sollte die Replikations-Defizienz des viralen Vektors mittels einer gleich bleibenden Anzahl HAD-positiver Zellen verifiziert werden. Verozellen wurden mit dem Vektor infiziert und 5 bzw. 9 Tage nach Infektion wurde ein HAD-Test mit humanen Erythrozyten durchgeführt, um die Anzahl infizierter Zellen durch die Komplexierung der Erythrozyten mit den auf der Zelloberfläche exprimierten HN-Proteine zu detektieren. Auch hier konnte nur eine Verminderung der HN-Expression im Laufe der Inkubationsphase beobachtet werden: Banden am Tag 5 nach der Infektion noch 10 bis 70 Erythrozyten an der Zellmembran infizierter Zellen, so konnten am Tag 9 nach der Infektion nur noch 5-20 Erythrozyten auf diesen Zelloberflächen ermittelt werden. Eine Zunahme HAD-positiver Zellen, ein Indiz für eine Ausbreitung des viralen Vektors, konnte wiederum ausgeschlossen werden.

Somit konnten die veröffentlichten *in vitro*-Daten (Curran, 1994) im Hinblick auf die fehlende Unterstützung der Replikation durch ein N-terminal um 77 Aminosäuren verkürztes SeV P-Protein erfreulicherweise ebenfalls durch *in vivo*-Daten bestätigt werden.

Erstmals in der Entwicklung von rekombinanten Sendai-Viren konnte so ein *in vivo* transkriptionsfähiger und zugleich replikations-defizienter SeV Vektor bereitgestellt werden. Dieser Vektor SeVV-eGFP-PΔ1-77 kann mit Hilfe der Helferzelllinie H29 vermehrt und in Mengen bis zu 10^8 Partikel pro ml Zellkulturüberstand bereitgestellt werden. Diese Virusmenge ermöglicht die Durchführung vorklinischer Studien, in denen die Sicherheit und die Wirksamkeit der Prototyp-Vakzine im Tiermodell bestätigt werden soll. Von diesen vorklinischen Studien werden auch Antworten zu weiteren Sicherheitsaspekten erwartet, die jetzt nur theoretisch erörtert werden können.

In Punkt 4.2 wurde bereits eine mögliche Remobilisierbarkeit Gen-defizienter Viren durch Koinfektion mit verwandten Viren als mögliche Gefahr bei der Anwendung rekombinanter Viren im Vakzinierungsbereich beschrieben. Im beschriebenen Fall handelt es sich um ein F-Gen-defizientes SeV, welches nach Infektion von Zielgewebe unter Umständen durch eine Koinfektion mit einem verwandten Paramyxovirus das fehlende F-Protein *in trans* zur Verfügung gestellt bekommen könnte und so remobilisiert werden könnte. Es ist bekannt, dass Oberflächengene verschiedener Paramyxoviren untereinander ausgetauscht werden können (Schmidt et al., 2001; Sascha Bossow persönliche Mitteilung) und in heterologen Viren funktionell sein können. Entsprechende Austausche von Kapsid-Proteinen zwischen verwandten Paramyxoviren konnten bislang nur in beschränkten Formen vorgenommen werden. Pelet und Kollegen gelang im Zellkultursystem die Erzeugung rekombinanter defektiver-interferierender Sendai Viruspartikel durch die T7-gesteuerte Expression der Nukleokapsidproteine N, P und L von PIV3 (Pelet et al., 1996), aber nur bei Auswechslung aller drei Proteine in Kombination. Eine Remobilisierung des Vektors SeVV-eGFP-PΔ1-77 durch eine

Anwesenheit paramyxoviraler P-Proteine in infiziertem Zielgewebe sollte demnach nicht stattfinden, falls, ist die Halbwertszeit von Nukleokapsiden zu beachten: Ein SeVV-eGFP-PΔ1-77 Nukleokapsid bzw. die damit infizierte Zelle sollte nach Applikation innerhalb weniger Tage vom menschlichen Immunsystem eliminiert werden worden sein und stellt somit keinen Vektor mehr zur Verfügung, der durch die Anwesenheit anderer paramyxoviraler P-Proteine remobilisiert werden könnte.

Ein weiterhin bei vielen Virusarten beobachtetes Phänomen ist das Auftreten von Rekombinationsereignissen. Würde es bei einer Doppelinfektion von Zielgewebe mit dem Vektor SeVV-eGFP-PΔ1-77 und einem verwandten Paramyxovirus zu einer Rekombination homologer Sequenzabschnitte kommen, könnte das replikations-defiziente SeV Virus seine Replikationsfähigkeit wiedererlangen und sich im Gewebe ausbreiten. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Untersuchungen zu Rekombinationsereignissen zwischen SeV durchgeführt (Sascha Bossow, persönliche Mitteilung). Bei Koinfektion von Zellen mit Viren, die in je einem Oberflächen-Gen F oder HN defizient waren, konnten keine Rekombination und damit keine Reversionen zum Wildtyp beobachtet werden.

Ein wesentlicher Punkt, weshalb Rekombinationsereignisse bei Paramyxoviren, wie dem SeV, kaum auftreten sollten, ist die Tatsache, dass das Genom von SeV immer als ein Vielfaches von Sechs vorliegen muss, da es nur so funktionell mit N-Proteinen verpackt werden kann. Zum einen erschwert also die N-Protein-Verpackung des viralen Genoms selbst bereits das Auftreten von Rekombinationsereignissen, weiterhin müsste das Rekombinationsereignis entsprechend der „rule of six“ erfolgen, d.h. die Polymerase müsste das eine Nukleokapsid an einem bestimmten Punkt verlassen und dann am identischen Punkt die Synthese der RNA auf dem anderen Nukleokapsid fortsetzen.

Das Auftreten eines solchen Ereignisses kann als sehr unwahrscheinlich angenommen werden, falls aber entgegen dieser Überlegungen Rekombinationsereignisse zwischen Vakzine und Wildtyp Viren stattfänden, was könnten die Folgen sein: Würde eine Person mit dem Vakzine-Prototyp geimpft, würden die infizierten Zellen im Regelfall vom Immunsystem eliminiert werden, da sich eine zelluläre Immunantwort gegen die kodierten Antigene ausgebildet hat. Eine nachfolgende Infektion mit verwandten Viren könnte durch die vorhandene Immunantwort schnell vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Würden die mit dem Vektor infizierten Zellen nicht vom Immunsystem entfernt werden, sollten die eingesetzten SeVV-eGFP-PΔ1-77 Nukleokapside entsprechend ihrer Halbwertszeit nach wenigen Tagen von selbst abgebaut werden.

Eine Aktivierung des viralen Vektors durch Verwandte Viren kann demnach nahezu vollständig ausgeschlossen werden. Der hier entwickelte Vakzine-Prototyp soll deswegen bei Risikogruppen sicher anzuwenden sein.

4.5 Der Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77: Erreichtes Ziel und weiterführende Experimente

Mit Hilfe rekombinanter Technik und umfassender Grundlagenforschung konnte der Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 als ein neuartiger Vakzine-Prototyp etabliert werden. Er stellte eine moderne Zwischenform zwischen einem klassisch attenuierten Impfstoff und einem abgetöteten viralen Erreger dar. Attenuierte Lebendimpfstoffe vermitteln eine lebenslange Immunität, hervorgerufen durch humorale und zelluläre Immunantwort. Abgetötete Erreger vermitteln eine humorale, meist zeitlich beschränkte Immunisierung. Der Vektor SeVV-eGFP-P Δ 1-77 vereint mehrere der charakteristischen Merkmale dieser Impfstoff-Typen miteinander.

Durch diesen Vakzine-Prototyp sollte es möglich sein, eine humorale und auch eine zelluläre Immunantwort im Geimpften zu erlangen. Die induzierte Immunantwort sollte zum Aufbau eines protektiven Immunstatus führen. Dieser hält möglicherweise nicht lebenslang an, da aus Gründen der Anwendungssicherheit die Vermehrung des viralen Vektors nachhaltig blockiert wurde. Damit ist erfreulicherweise auch die Ausbildung persistierender Infektionen unterbunden. Der Einsatz von reverser Genetik ermöglicht es, durch einen einzelnen Impfvektor eine Immunantwort gegen mehrere Virustypen gleichzeitig zu erzeugen.

Der modifizierte virale Vektor muss nun in vorklinischen Studien auf seine Funktionalität im Tiermodell getestet werden. Es muss bestätigt werden, dass die bei gleichzeitiger Replikations-Defizienz hervorgerufene Expression verschiedener Antigene eine spezifische Immunantwort in einem geeigneten Tiermodell induziert. In Reinfektionsversuchen muss bestätigt werden, dass die durch den Vektor induzierte Immunität eine nachfolgende Infektion mit entsprechenden Wildtyp Viren wirkungsvoll verhindert. Gleichzeitig muss auch im Tiermodell die Sicherheitsüberprüfung des Vektors nochmals sehr intensiv wiederholt werden. Parallel hierzu müssen die Kombinationen viraler Antigene experimentell bestimmt werden, die ohne gegenseitige negative Beeinflussung von einem Vektor exprimiert werden können. In Tiermodellen werden auch erste Studien zur optimalen Applikationsroute verfolgt werden. Unter 2.1 wurden bereits einige Vorteile einer Applikation des viralen Vektors in Form von Nasenspray erläutert. In Tierversuchen könnte diese Art der Darreichung mit anderen Formen verglichen werden und deren Effizienz am Modell bestimmt werden.

Nach erfolgreich durchgeführten vorklinischen Studien und der Bestätigung einer lang andauernden Immunität gegenüber den eingesetzten Antigenen könnte die Vermehrung des Vektors durch die Etablierung einer neuen Helferzelllinie (nach GMP-Standard) weiter optimiert werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material und Bezugsquellen

5.1.1 Chemikalien

Agarose high EEO	Biomol
Acrylamid	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Riedel de Haen
Desinfektionsmittel Intersporol	TAD Cuxhafen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	J.T. Baker B.V.
1, 4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethanol absolut	Riedel de Haen
Ethidiumbromid	Biomol
Glycerin	Merck
Glycin	Merck
Isoamylalkohol	J.T. Baker
Isopropanol	Riedel de Haen
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhexacyanoferrat	Sigma
Kaliumhexacyanoferrit	Sigma
Kristallviolett	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol p. A.	Merck
β -Mercaptoethanol	Pharmacia
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natrium-Deoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck

Natriumhydroxid	Merck
Natriumpyruvat	Gibco BRL
Natriumtartrat	Merck
Paraformaldehyd	Merck
Phenol pH 7,5-8	Roth
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma
Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)	Sigma, Pharmacia
RNAse-Inhibitor	Boehringer
N, N, N', N' -tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
Triton X-100	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel-de Haën
Trypanblau	Biochrom
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosid)	Boehringer

5.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase, Shrimp (SAP)	Roche Diagnostics
Expand High Fidelity (DNA-Polymerase)	Roche Diagnostics
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics
	MBI-Fermentas
	New England Biolabs
	Amersham Biosciences
Taq DNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics
Proteinase K	Amersham Biosciences

5.1.3 Nukleinsäuren und Plasmide

DNA-Marker 1 kb-Leiter	MBI-Fermentas
DNA-Marker 100 bp-Leiter	Roche Diagnostics
dNTPs	Roche Diagnostics
	MBI-Fermentas
Oligonukleotide	MWG-Biotech
Plasmid pTM-eGFP	S. Bossow, Martinsried
Plasmid pcDI18-M	S. Fischer, München
Plasmid pTM-P/C ⁻	H. Graef, Wuppertal
Plasmid pTM-L	H. Graef, Wuppertal
Plasmid pTM-N	Ch. Buchholz, Zürich
Plasmid pRS-3G	R. Sedlmeier, Martinsried
Plasmid pRS-3Gg	R. Sedlmeier, Martinsried
Plasmid pUC29	V. Benes, Prag

5.1.4 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue	Stratagene
E. coli Ultrakompetente Zellen XL-2 Blue	Stratagene

5.1.5 Medien und Zusätze für Prokaryonten

Ampicillin	Roche Diagnostics
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Hefeextrakt	Difco
Ampicillin	Sigma Aldrich

5.1.6 Zelllinien

CHO	(Hamsteroovarzellen)	ATCC:CCL
HeLa	(humane Cervixkarzinomzellen)	ATCC:CCL 2
Vero	(Affennierenzellen)	ATCC:CCL 18
H29	stabil N, P und L-produzierende Zelllinie	

basierend auf 293 Zellen
 Fibroblasten Primärkultur aus Hühnerembryonen

W. Willenbrink, Wien
 J. Kramer, Bavarian Nordic

5.1.7 Medien und Zusätze für Eukaryonten

Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Merck
<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Gibco BRL
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco BRL
→ 30 min bei 56 °C Komplement inaktiviert	
Geneticin G418	Gibco BRL
Kanamycin	Sigma
OptiMEM	Gibco BRL
Medium F12	GibcoBRL
Medium M199	Gibco BRL
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5% / 0,2)	Gibco BRL
Trypsin, acetyliert	Sigma

5.1.8 Antikörper

Meerrettich-Peroxidase (POD)-konjugierte Antikörper:

Antikörper Anti-rabbit Ig	Dako
Antikörper Anti-mouse Ig	Dako

Monoklonale Antikörper:

Anti-P 713	W. Willenbrink, Wien
Anti-HN (α HN VII 3c-4F)	W. Willenbrink, Wien
Anti-L	H. Einberger

Anti-Gesamt-Sendai-Serum (rabbit)	AG Neubert
GFP-Antiserum (rabbit) R970-01	Invitrogen

5.1.9 Transfektionsreagenzien

Lipofect ACE™	Gibco BRL
LipofectAMIN™	GibcoBRL
LipofectAMIN 2000™	GibcoBRL

5.1.10 Nachweis- und Präparationssysteme

<i>Expand High Fidelity</i> PCR-Kit	Roche Diagnostics
<i>QIAquick Gel Extraction-Kit</i> , DNA-Fragmente	Qiagen
Plasmid-Präparations-Kit	Qiagen
<i>QIAquick PCR Purification-Kit</i>	Qiagen
Western Blot Detektions-Reagenzien (ECL)	Amersham Pharmacia

5.1.11 Viren

Sendai-Virus, Stamm D52 (Fushimi)	ATCC:VR 105
Vaccinia Virus MVA-T7, rekombinant	G. Sutter, Neuherberg
Vaccinia Virus VV-N, VV-P	D. Kolakofsky, Genf
Vaccinia Virus VV-L	H. Graef, Wuppertal

5.1.12 Liste der verwendeten Geräte

Durchflußcytometer: FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Einfriermaschine für Zellen Cryoson TRA5	Cryoson
ELISA-Reader MR7000	Dynatech
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Feinwaage <i>Mettler AE100</i> Type AE100S	Mettler-Toledo
Geldokumentationsanlage <i>Image Master</i> VDS	Amersham Pharmacia
Heizblock Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf
Photometer DU® 640 Spectrophotometer	Beckmann
Quarzküvette	Hellma
Schüttelinkubator innova™ 4200	New Brunswick
Thermocycler Stratagene Robocycler™ Gradient 40	Stratagene
Ultraschallgerät Sonifier Cell Disruptor B15	Branson

UV-Leuchtschirm Typ IL-200-M
Wasserbad Thermomix 1441

Bachofer GmbH
B. Braun Melsungen AG

5.1.13 Sonstiges

Absättigungsreagenz <i>Roti-Block</i>	Roth
Diafilme Ektachrom ASA 400	Kodak
Erythrozyten, human, Blutgruppe 0	M. Auer, S. Bossow, S. Schlecht, M. Wiegand
Film für Sofortbildkamera (3200 Iso/36 °C)	Polaroid
Hyperfilm-ECL (Röntgenfilm)	Amersham Pharmacia
Filterpapier 3MM	Whatman
Kryoröhrchen	Nunc
Mineralöl	Sigma
Polystyrolröhrchen (6 ml)	Falcon
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon
Proteinmolekulargewichtsmarker	Amersham Pharmacia
PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid)	Immobilon
Reaktionsgefäße Safe Lock	Eppendorf
Zellkulturflaschen	TPP
Zellkulturschalen 6-well (35 mm), 12-well (21 mm)	Peske
Zellkulturschalen (96-well)	Nunc

5.2 Methoden

5.2.1 Zellbiologische Methoden

5.2.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Die Kultivierung von adhärenenten Säugerzelllinien wurde in Kunststoff-Rouxflaschen mit *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM), supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), in 5 %iger CO₂-Atmosphäre und 89 % relativer Luftfeuchtigkeit bei 37 °C durchgeführt. Bei Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit PBS oder DMEM ohne FKS [DMEM (-)] gewaschen, mit Trypsin/ EDTA abgelöst und in der Regel in einer Verdünnung von 1:20 neu ausgesät.

Zur Langzeitlagerung bei -120 °C wurden 5 x 10⁶ Zellen in 1 ml Einfriermedium in Kryoröhrchen transferiert, 3 h bei 0 °C und über Nacht bei -70 °C adaptiert und dann in einen mit Stickstoff gekühlten Kryobehälter transferiert.

Trypsin/EDTA:

0,5	%	Trypsin
0,2	%	EDTA

Einfriermedium:

40	%	FKS
10	%	DMSO
50	%	DMEM

PBS (Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung):

80,0	g	NaCl
2,0	g	KCl
14,4	g	Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O
2,0	g	KH ₂ PO ₄
ad 1 l H ₂ O bidestilliert + autoklavieren		

5.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl in Suspension

Die Bestimmung der Zellzahl in Suspension erfolgt durch Anfärben der Zellen und anschließendes Auszählen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu werden 50 µl einer homogenisierten Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung (0,5 %ig in physiologischer Kochsalzlösung) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wird die Zellsuspension unter das Deckglas der Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es gibt 4 Sektoren mit jeweils 16 Quadraten. Es werden nun die Zellen in den 16 Quadraten ausgezählt und anschließend der Mittelwert gebildet. Dieser wird dann mit 2 (wegen 1:1-Verdünnung mit Trypanblau) und mit 10^4 (ergibt sich aus dem Volumen der Zählkammer) multipliziert. Die Formel lautet also: Mittelwert $\times 2 \times 10^4 =$ Zellzahl pro ml.

5.2.1.3 Bestimmung der Hemmkonzentration für die Selektion von Zellklonen

Für die Selektion von stabil transfizierten Zellklonen musste die letale Konzentration des zur Selektion verwendeten Antibiotikums für nicht-resistente Zellen bestimmt werden.

Dazu wurden CHO-Zellen in einer Dichte von 7×10^5 Zellen pro 35 mm-Schale ausgelegt. Nach 24 h Wachstum wurde pro Vertiefung Selektionsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Antibiotikum zugegeben (Verdünnungsreihe). Mediumwechsel erfolgt alle 3 - 4 d. Nach 10 -14 d ist zu erkennen, bei welcher Konzentration die Zellen ohne Resistenzplasmid absterben. Diese Konzentration wurde zur Selektion stabil transfizierter Zellen angewendet.

5.2.1.4 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Die Transfektion der Zellen erfolgte durch die Methode der Lipofektion, die einen sehr effizienten Nukleinsäure-Transfer ermöglicht (PMID: 2823261). Bei der Durchführung wurde das Reagenz LipofectACETM verwendet, mit dem ein DNA-Transfer über Liposomen (kationische Lipide) zustande kommt. Dabei wird die zu transfizierende Plasmid-DNA an positiv geladene Lipide gebunden, die sich zu kugelförmigen Liposomen zusammenlagern. Diese Liposomen können leicht mit der Zellmembran der Zelle verschmelzen und auf diese Weise DNA ins Zellinnere freisetzen.

Die zu transfizierenden Zellen sollten zu 70 – 80% konfluent gewachsen sein. Zuerst wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) die DNA vorgelegt. Nach Zugabe und Mischen von 600 µl OptiMEM konnte das Lipofektionsreagenz zugegeben werden. Dabei richtet sich die Menge nach der eingesetzten DNA-Menge: pro 5 µg DNA, 15 µl LipofectACE. Der Ansatz wurde nochmals gut gemischt, kurz abzentrifugiert und bei Raumtemperatur (RT) für 15 – 20 min inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Liposomen-Mix auf die vorher gewaschenen Zellen gegeben. Nach Zugabe von 1 ml OptiMEM pro Transfektionsansatz erfolgte eine Inkubation bei 33 °C für 15 – 18 h. Danach wurde der Transfektionsmix abgenommen, die Zellen 2x mit DMEM gewaschen und frisches Medium

zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 24 h bei 33 °C inkubiert.

5.2.1.5 Selektion von transfizierten, eukaryontischen Zellen

Finden im Zellkern Rekombinationsereignisse statt, die zum Einbau der Plasmide ins Genom der Zelle führen, spricht man von einer stabil transfizierten Ziellinie. Stabil transfizierte Zellklone können durch ein geeignetes, auf dem Expressionsplasmid lokalisiertes Antibiotikum selektioniert werden. Die resistenten Zellklone einer 35 mm-Schale wurden mit 15 µl Trypsin/ EDTA mit Hilfe einer Automatikpipette vom Schalenboden gelöst und in je eine Vertiefung einer 96-Lochplatte gegeben und unter Antibiotikum selektioniert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Klone schrittweise in größere Kulturschalen umgesetzt.

5.2.1.6 Monoklonalisierung von transfizierten Zellklonen

Um homogene Kulturen von stabil transfizierten Zelllinien zu erhalten, wurden diese subkloniert. Dazu wurden je 100 µl der Zellsuspension nach Trypsinieren in einer seriellen 10-fach Verdünnung in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten ausgelegt. Dabei sollte bis zu einer Dichte von 0,3 Zellen /100 µl verdünnt werden. Nach 7-10 d Inkubation bei 37 °C unter Selektionsbedingungen wurden die Vertiefungen markiert, welche nur einen Zellklon beinhalten. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellklone schrittweise in größere Kulturschalen passagiert und bei Vorliegen einer ausreichenden Zellzahl im Western Blot (5.2.4.4) getestet.

5.2.1.7 FACS-Analyse

Die Expressionsstärke des viral exprimierten Fluoreszenzproteins „*enhanced green fluorescent protein* (eGFP)“ [Emissionsmax: 508 nm, Extinktion: 489 nm] wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Calibur Gerätes bestimmt. Hierzu wurden 1×10^5 Zellen mit replikations-defizienten, eGFP-exprimierenden viralen Vektoren infiziert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 33 °C wurden die Zellen gewaschen und mit 1 ml DMEM + 10 % FKS überschichtet. Die infizierten Zellen wurden bei 33 °C für bestimmte Zeitphasen inkubiert, danach erfolgte die Ablösung der Zellen mit einem geeigneten Volumen Trypsin/ EDTA vom Kulturschalenboden. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet nach einmaligem Waschen mit DMEM + 10 % FKS in 200-300 µl PBS aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden in FACS-Analyseröhrchen überführt und sofort im Durchflußcytometer auf die Anzahl fluoreszierender Zellen untersucht. In dem FACS-Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit. In diese Trägerflüssigkeit wird die Probe eingebracht. Durch die höhere Strömungsfeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen vereinzelt und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt. Das Argon-Laserlicht führt zu einer Anregung der

Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Die Auswertung der erfassten Rohdaten erfolgt per Computer.

5.2.2 Virologische Methoden

5.2.2.1 Vermehrung und Titrierung von Vaccinia Virus MVA-T7

Konfluente Primärkulturen von Hühnerembryofibroblasten wurden in mehreren T175-Flaschen mit einer Virusverdünnung von MVA-T7 (10-fach Verdünnung) in 2-4 ml M199-Medium ohne FKS bei 37 °C infiziert. Nach Zugabe von 20 ml M199 mit 2 % FKS wurden die Zellen so lange bei 37 °C inkubiert, bis sich der zytopathische Effekt (CPE) zu 100 % ausgebreitet hat. Die Zellen wurden in das verbliebene Medium geschabt und bei 2.500 rpm für 10 min pelletiert (Sorvall-Zentrifuge) und in 5 ml BPS (5.2.1.1) pro T175-Flasche resuspendiert. Dieser Virusstock wurde durch sequentielles Einfrieren und Auftauen und 3 min Ultraschallbehandlung im Eiswasserbad (Branson Sonifier B15) aufgeschlossen. Nach Titration wird der Stock aliquotiert und bei -120 °C in der Dampfphase über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Nach dem Auftauen sollte die Virussuspension nochmals mit Ultraschall behandelt werden (30 sec). Die Titration der infektiösen Partikel erfolgte über den Nachweis von β -Galaktosidase, welche nach Infektion mit MVA-T7 in den Zellen synthetisiert wird. Zur Titration werden konfluente HeLa-Zellen in 35mm-Schalen eingesetzt, Diese wurden mit einer seriellen 10-fach Verdünnung des MVA-T7 in 2 ml Medium ohne FKS für 24 h infiziert und anschließend für 5 min bei 4 °C mit einem Formaldehydgemisch fixiert. Die Zellen wurden nach dem Fixieren gründlich mit PBS gewaschen und mit einer X-Gal-haltigen Färbelösung überschichtet. Nach 2-24 h Inkubation bei 37 °C konnten die blauen Zellen ausgezählt werden. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte der Virustiter (pfu/ ml) ermittelt werden.

5.2.2.2 Herstellung rekombinante Sendai-Viren

Für die Herstellung rekombinanter SeV wurden standardmäßig HeLa-Zellen verwendet. Dazu wurden die zu 60-80 % konfluenten Zellen einer 35 mm Schale zweimal mit DMEM^{-FKS} gewaschen und mit rekombinantem Vaccinia Virus MVA-T7 mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 10 für 1 h bei 33 °C infiziert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Transfektion (5.2.1.4) der Zellen mit den Plasmiden pTM-N (5,4 µg), pTM-P (2,9 µg), pTM-L (0,26 µg) und dem genomischen SeV cDNA Konstrukt (15 µg). Als Transfektionsreagenz wurden 47 µl des Reagenzes LipofectACE eingesetzt. Der Transfektionsansatz wurde 12 - 18 h bei 33 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, die Zellen dreimal mit DMEM (-) gewaschen und für weitere 24 - 30 h in 1 ml DMEM (-) bei 33 °C inkubiert.

Während der Inkubation sollten rekombinante Sendai-Viren aus den transfizierten HeLa-Zellen ins Medium abgegeben worden sein. Der Überstand, in dem sich die rekombinanten Sendai-Viren befinden, wird als initialer Überstand bezeichnet.

5.2.2.3 Infektion von Zellen mit virushaltigem Überstand

Während der Inkubation sollten rekombinante Sendai-Viren aus den transfizierten HeLa-Zellen ins Medium abgegeben worden sein. Um diese weiter zu vermehren und gleichzeitig das ebenfalls noch im Medium vorkommende Vaccinia Virus zu entfernen wurden Verozellen mit den initialen Zellkulturüberständen der Transfektion infiziert. Die weitere Behandlung der rekombinanten SeV hängt davon ab, welches F-Protein die rekombinanten SeV synthetisieren: Handelt es sich um ein F-Protein, das für seine Aktivierung Acetyl-Trypsin (AcT) benötigt, muss AcT (4 µg/ ml) im Medium anwesend sein, um initial hergestellte oder neu entstandene Sendai-Viren zu aktivieren und dadurch die Ausbreitung der Infektion zu ermöglichen. Handelt es sich um rekombinanten Sendai-Viren, die das so genannte F_{mut}-Protein synthetisieren, welches durch eine ubiquitäre Protease (Furin), wie sie in jeder Säugerzelle zu finden ist, gespalten und aktiviert werden kann, kann auf die Anwesenheit von AcT im Medium verzichtet werden. Mit einem Zellschaber wurden die infizierten und transfizierten HeLa-Zellen vom Boden der Kulturschale abgelöst und mit dem Medium zusammen in ein steriles 2,0 ml ERG überführt. Der initiale Überstand wurde für 5 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert, um vorhandene Zellen oder Zellreste abzutrennen. Von jedem HeLa-Überstand wurden, falls nötig, zur F-Aktivierung 500 µl in ein neues ERG gegeben und 2 µl Acetyl-Trypsin-Lösung (1 µg/ µl) zugefügt. Dieser Ansatz wurde bei RT mindestens 30 min inkubiert.

Währenddessen wurden die Verozellen, die eine Konfluenz von 100% aufwiesen, zweimal mit je 1 ml DMEM (-) gewaschen. Der Infektionsmix wurde anschließend auf die Indikatorzellen gegeben und für 1 h erfolgte die Adsorption der Viren bei 33 °C. Nach Abnahme des Überstandes und zweimaligem Waschen wurden die Zellen für 48 – 96 h in 1 ml DMEM (-) mit 4 µg/ml AcT (F) oder DMEM (+) (F_{mut}) bei 33 °C inkubiert.

Um eine Amplifikation der Viren in Zellkultur zu erreichen, wurden mehrere Zell-Zell-Passagen von virushaltigen Überständen auf neuen Indikatorzellen nach gleichem Schema durchgeführt. Die Menge an Überstand, die für eine weitere Viruspassage eingesetzt wurde, richtete sich nach dem Ausmaß des zytopathischen Effekts (CPE). Die letzte Viruspassage wurde in T 75-Flaschen (~20 x 10⁶ Zellen) durchgeführt, um eine höhere Virusausbeute zu bekommen. Dabei musste nach der einstündigen Adsorptionsphase das Infektionsvolumen auf 4 ml angepasst werden, um die Zellen vollständig zu bedecken. Nach 48 – 72 h wurde der Überstand abgenommen und mit 5 % FKS versetzt, um vorhandenes Trypsin zu inaktivieren und die Stabilität der Viren beim anschließenden Einfrieren zu erhöhen.

5.2.2.4 Vermehrung und Titrierung von rekombinantem Vaccinia Virus

Die Vermehrung und Titrierung von rekombinantem Vaccinia Virus (VV), welcher die SeV Proteine N, P oder L exprimiert VV-N, VV-P und VV-L erfolgte nach der Methode von Elroy-Stein & Moss PMID: 1347793 (1992). Für die Vermehrung wurden CV1-Zellen verwendet, für den Plaque-Test Verozellen.

Pro Virus wurden sechs T 175 Flaschen, die jeweils einen konfluenten Zellrasen enthielten, mit 0,1 pfu pro Zelle infiziert und bei 37 °C inkubiert. 48-72 h nach Infektion wurden die Zellen abgeschabt und bei 2000 rpm 2 min in einer Sorvall-Zentrifuge pelletiert. Da sich der größte Teil der Viren in den Zellen befindet, wurde das Medium verworfen und die Zellen in 2 ml FKS-freiem M199-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden durch drei Gefrier-/Tau-Zyklen aufgeschlossen, das Zelldebris abzentrifugiert (2 min, 2000 rpm) und die Zahl der infektiösen Viruspartikel im Überstand durch einen Plaque-Test quantifiziert. Gewöhnlich wurden Titer von 10^9 pfu/ml erhalten. Da Vaccinia Viren größtenteils adhären an der Zytoplasmamembran infizierter Zellen verbleiben und zudem aufgrund ihrer Größe eine geringe Diffusionsgeschwindigkeit aufweisen, konnte beim Plaque-Test auf eine Übersichtung der Zellen mit agarhaltigem Medium verzichtet werden. Konfluente Verozellen in 35 mm-Schalen wurden mit FKS-freiem Medium gewaschen und mit 0,5 ml Virusverdünnung (serielle 10-fach Verdünnung) infiziert. Anschließend wurde die Virussuspension durch FKS-haltiges Medium ersetzt. Nach 36-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Zellrasen mit Kristallviolett-Lösung gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt. Die Plaques wurden als helle runde Flecken deutlich sichtbar. Der Titer der Virussuspension wurde durch Auszählen der Plaques unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnungsfaktoren erhalten.

5.2.2.5 Hämadsorptionstest (HAD-Test)

In diesem Test wird die Synthese des HN-Proteins in einzelnen Zellen durch Nachweis der Hämadsorptionsaktivität überprüft. Zellen einer 35 mm-Schale, bei denen die Synthese des HN-Proteins nachgewiesen werden sollte, wurden mit Medium gewaschen und mit 0,5 ml einer 1 %igen Erythrozytensuspension (human, Blutgruppe 0) überschichtet. Nach der Inkubation bei 4 °C für 1 h wurde 5 x mit PBS gewaschen und die Zahl der Erythrozyten adsorbierenden Zellen unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

1% ige Suspension von Erythrozyten:

100 µl mit PBS gewaschene Erythrozyten (2 000 g, 2 x 5 min)

→ ad 10 ml mit Medium

Erythrozyten werden in Alsever's Lösung bei 4 °C gelagert.

Alsever's Lösung (Lagerung der Erythrozyten):

0,42 % NaCl

0,8 % Natriumcitrat

2,05 % Glucose

→ mit 10 %iger Zitronensäure auf pH 6,1 einstellen, steril filtrieren

5.2.2.6 Kulturinfektionsdosistest (KID-Test)

Der KID ist ein einfacher Test zur Quantifizierung infektiöser Viruspartikel (VP) in einer Virussuspension (Chanock & Johnson, 1964). Die Einheiten sind relativ und nur bei identischem Testaufbau untereinander vergleichbar. In einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit konkavem Boden wurden 25 µl einer Virusverdünnung (serielle Zweifach-Verdünnung in Medium) vorgelegt und je $1,0 \times 10^4$ Verozellen in 50 µl Medium mit 5 % FKS zugegeben. Der Ansatz wurde 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 25 µl einer 1 %igen Erythrozytensuspension (human, Blutgruppe 0) wurde der Test für 1 h bei 4 °C inkubiert. Im Falle einer Infektion wird in den Zellen das HN-Protein synthetisiert und zur Zelloberfläche transportiert. Die Erythrozyten werden an die Zellen adsorbiert, die HN-Proteine auf ihrer Oberfläche besitzen und können sich nicht mehr im Zentrum der konkaven Vertiefung sammeln. Die Virusverdünnung, bei der gerade noch eine Adsorption zu beobachten ist, enthält definitionsgemäß eine KID Einheit. Eine KID-Einheit entspricht etwa $5,5 \times 10^4$ pfu.

5.2.2.7 Zellinfektionsdosistest (ZID-Test)

Der ZID-Test wurde etabliert zur Quantifizierung infektiöser Viruspartikel, die nach Zellinfektion die einfach detektierbaren Reporterproteine „enhanced green fluorescent protein (eGFP)“ oder DsRed exprimieren, durch Anregung des zu untersuchenden Präparates mit Licht im entsprechenden nm-Bereich (eGFP: 489 nm; DsRed: 558 nm) kommt es in eGFP- oder DsRed-exprimierenden Zellen zur Emission von grünem (508 nm) bzw. rotem (583 nm) Licht.

In einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit konvexem Boden wurden 25 µl einer Virusverdünnung (serielle vierfach- oder Zweifach-Verdünnung in Medium) vorgelegt und je 3×10^4 Zellen in 50 µl Medium mit 5 % FKS zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von etwa 36 h bei 33 °C konnten die infizierten und somit fluoreszierenden Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes detektiert werden und unter Einbeziehung der entsprechenden Verdünnungsstufe der Titer der Virussuspension in Viruspartikel (VP) pro ml ermittelt werden.

5.2.3 Molekularbiologische Methoden

5.2.3.1 Transformation von E.coli

Die Plasmid-DNA (10-100 ng) wurde mit 50 µl, auf Eis aufgetauten, kompetenten E.coli-Zellen (XL-2 Blue) gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 45 sec. bei 42 °C. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden pro Ansatz 450 µl NZY⁺-Medium zugegeben. Zur Regeneration wurden die Zellen im Schüttler für 1 h bei 37 °C inkubiert und davon anschließend 100 – 400 µl auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.

LB-Medium (Luria Bertani):

10	g	Bacto-Trypton
10	g	Hefeextrakt
5	g	NaCl
ad 1 l H ₂ O bidestilliert, autoklavieren		

LB^{Amp}-Agarplatten:

wie LB-Medium + 15 g Bacto-Agar
ad 1 l H₂O destilliert, autoklavieren
nach Abkühlung (50 °C) Ampicillin (75 mg/ml) zugeben

NZY⁺-Medium:

10	g	NZ-Aminosäuren
5	g	Hefe-Extrakt
5	g	NaCl
→ mit NaOH auf pH 7,5 einstellen		
→ ad 1 l mit H ₂ O bidest. auffüllen, autoklavieren		
12,5	ml	MgCl ₂ (1 M)
12,5	ml	MgSO ₄ (1 M)
20,0	ml	Glucose, 20% (w/v)
→ steril filtrieren		

5.2.3.2 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen (XL-2 Blue)

Für die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen (XL-2 Blue) wurde mit einer Übernacht-Kultur eine Tageskultur angeimpft und bis zu einer OD₅₆₀ von 0,6 inkubiert. Nach dem Pelletieren der Zellen (10 min, 2500 rpm, 4 °C, Sorvall) wurde das Zellpellet in eiskaltem TSB gelöst und 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Aliquotieren wurden die Zellen bei -70 °C gelagert.

TSB:

10	%	Polyethylenglykol (MW 3350)
5	%	DMSO
10	mM	MgCl ₂
10	mM	MgSO ₄

→ in LB-Medium, steril filtrieren

5.2.3.3 Präparative Isolierung von Plasmiden

In dieser Arbeit wurden alle benötigten Plasmide durch Isolierung mit Plasmid-Präparations-Systemen (Qiagen) gewonnen (*DNA Mini Prep-Kit*, *DNA Maxi Prep-Kit*). Das Protokoll wurde vom Hersteller mitgeliefert.

5.2.3.4 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Es wurden zwei verschiedene RNA-Präparationsmethoden zur Aufreinigung von RNA durchgeführt. Zum einen handelte es sich um den *RNeasy-Kit* (Qiagen) und zum anderen um die *Trizol*-Methode (Gibco BRL). Das Protokoll wurde vom Hersteller mitgeliefert.

5.2.3.5 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen Nukleinsäurelösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die DNA-Lösung wurde dazu mit dem gleichen Volumen Phenol (puffergesättigt, pH 7,5 - 8) gemischt. Nach dem Zentrifugieren (Eppendorf-Tischzentrifuge, 4000 g, 10 min, RT) wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues ERG überführt. Es wurde ein Volumen Phenol/Chloroform zugegeben, gut gemischt und abzentrifugiert (12000 g, 5 min, RT). Die wässrige Phase wurde wieder in ein frisches ERG gegeben und mit einem Volumen Chloroform gemischt und abzentrifugiert (12000 g, 5 min, RT). Der Überstand der wässrigen Phase wurde in einem neuen ERG mit 1/10-Volumen Kaliumacetat (3 M) gemischt, danach mit 0,7 Volumen Isopropanol (100 %) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT und 30 – 60 min Inkubation bei – 20 °C wurde die DNA abzentrifugiert (14000 g, 30 min, 4 °C). Nach vorsichtigem Abziehen des Überstandes wurde das Pellet mit 100 – 200 µl Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (14000 g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 20 – 50 µl EB resuspendiert.

5.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt (Beckman-Photometer). Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht der Absorptionswert von

1,0 einer Konzentration von ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotiden (Sambrook & Russell, 2001).

5.2.3.7 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Die zur vollständigen Spaltung der DNA einzusetzende Enzymmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Enzymmenge (U)} = \frac{\text{Schnittstellen in Plasmid-DNA}}{\text{Schnittstellen in Lambda-DNA}} \times \frac{\text{kb Lambda-DNA}}{\text{kb Plasmid-DNA}} \times \mu\text{g DNA}$$

5.2.3.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation der freien Enden eines geschnittenen DNA-Fragments zu verhindern wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen abgespalten. Auf diese Weise konnte die Religation verhindert werden. Dazu wurde die DNA in 1/10 Volumen Alkalische-Phosphatase-Puffer und 1 µl Alkalische Shrimp Phosphatase (1 U) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die behandelten Fragmente über ein präparatives Gel mit anschließender Gelextraktion (*QIAquick Gel Extraction-Kit*, Qiagen) gereinigt.

5.2.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Gereinigte DNA-Fragmente, die nach Restriktionsspaltung und anderen Modifikationen durch präparative Agarose-Gelelektrophorese erhalten worden waren, wurden mit Hilfe des T4 Rapid DNA Ligation-Kit kovalent verknüpft. Für die Ligation wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von ca. 1:4 eingesetzt (Dugaicyk et al., 1975 PMID: 169355), um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen. In einem Gesamtvolumen von 21 µl lagen 10 µl Vektor und Insert in DNA-Verdünnungs-Puffer, 10 µl Ligations-Puffer und 1 µl Enzym (5 U) vor. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert. Für die anschließende Transformation wurden 8 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

5.2.3.10 Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und anschließend isoliert werden (Sambrook & Russell, 2001).

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit 1 – 2 % Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 65 °C in eine Elektrophorese-Apparatur gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Die Proben (20 - 500 ng je Fragment) wurden mit 1/6

ihres Volumens mit Auftragspuffer versetzt, in die vorgeformten Taschen gegeben und bei 5 - 10 V/cm aufgetrennt.

TBE-Puffer:

90	mM	Tris
90	mM	Borsäure
2,5	mM	EDTA
0,1	µM	Ethidiumbromid

Auftragspuffer:

0,25	%	Bromphenolblau
0,25	%	Xylencyanol
40	%	Glycerin
30	mM	EDTA

5.2.3.11 Nachweis von Nukleinsäuren im Agarosegel

Nukleinsäuren werden durch die Fluoreszenz des in sie eingelagerten Ethidiumbromids unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Dazu wurde der TBE-Puffer (5.2.3.10), der als Laufpuffer und zum Giessen des Gels verwendet wurde, mit Ethidiumbromid versetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel unter UV-Licht durch einen Rotfilter mit einem hochempfindlichen Polaroidfilm (Iso 3000/36 °) photographiert.

5.2.3.12 Isolierung von DNA-Fragmenten (< 10 kb) aus Agarosegelen

DNA-Fragmente bis 10 kb Länge konnten aus Agarosegelen (0,8 – 2 %) nach der elektrophoretischen Auftrennung isoliert werden. Dazu wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNA nach dem Protokoll des *QIAquick Gel Extraction-Kits* (Qiagen) isoliert.

5.2.3.13 Isolierung von DNA-Fragmenten (≥ 10 kb) aus Agarosegelen

Da bei Isolierung von DNA-Fragmenten über 10 kb Länge die Kapazität der Säulenreinigung (Qiagen) erreicht ist, vor allem aber die Gefahr von DNA-Strangbrüchen entsteht, wurde für deren Isolierung eine schonendere Methode verwendet (Sambrook & Russell, 2001).

Die DNA-Fragmente wurden bei 16 °C über *low melting point* (LMP)-Agarosegele (1 %) aufgetrennt, ausgeschnitten und in fünf Volumina Tris (20 mM, pH 8)/EDTA (1 mM) aufgenommen. Die gewünschten Fragmente mittels des *QIAquick Gel Extraction-Kits* (Qiagen) aufgereinigt.

5.2.3.14 Aufstellung der verwendeten DNA-Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge [nt]	Sequenz 5' → 3'	Tm [°C]
XI = M13 = ΔNI	19	GGAAACAGCTATGACCATG	54
X II	57	GGCTTCAAGGTACTAATGATCCGTAGTAAGAAAACTT AGGGTGAAAGTATTCCACC	64
X I (+)	59	GGATCATTAGTACCTTGAAGCCTCGTAGATCGCGGCCG CGTGAACCTTTGGCAGCAAAG	56
XX	44	GGAAGGAAAAGCGGCCGCCGCGGGATCATACGAGGC TTCAAGG	61
XX (+)	57	CCTGTGTTTCTGCGGCCGCCGTTTCGCGAGGCCGCGCCG TGAACCTTTGGCAGCAAAGC	61
<i>Not I</i> eGFP	44	CGCGGGCCCCGGGGCGGCCCGTCGCCACCATGGTGAGC AAGGGC	60
eGFP <i>Not I</i> (+)	26	GATGCATGCTCGAGCGGCCGCTTAC	58
<i>SgrA I</i> eGFP	36	GGATTACTATCGCCGGCGGTCGCCACCATGGTGAGC	61
eGFP <i>SgrA I</i> (+)	37	CGCTAACTGTGCGCCGGCGTTACTTGTACAGCTCGTCC	63
<i>Fse I</i> DsRed	36	CGGATCAAGTGCCGGCCGTCGCCACCATGGTGCGC	59
DsRed <i>Fse I</i> (+)	42	CGCGAATATCGGCCGGCCAAGTCTACAGGAACAGGTG GTGGC	63
ΔNI (+)	35	CGGTGCGGGCCCGCACGTGAACTTTGGCAGCAAAGC	50
ΔNII	28	G TTCACGTGCGGGCCCGATCATACGAGG	44
ΔNII (+) =P-2892 (+)	19	CGCGTCTCGGGATGATTCG	62
ΔPI = NP- 578	17	CCCTGACACACTCCTTC	54
ΔPI (+)	31	GCGCCGCTCGAGGCGGTAAGTGTAGCCGAAG	64
ΔPII	34	GGCGACGCGTCAGTCTCACAGCCTAATTCG	64
ΔPII(+)=F-5430 (+)	20	CATCATTCACGAAATCCTGG	58
F-4871	20	AGCATATATCCAGAGGTCAC	58
ΔLI (+)	38	GGGACTAATTAGTCGGGCCCGACC	58
ΔLII	31	GCACTTGGGCCCGACTAATTAGTCCCTC	60
ΔLII (+) = pSeV-18873 (+)	21	CGAATGGCGCGCTGATGCGG	64
NP- 819 (+)	18	CCATGAGAGATACAAGGC	54
NP-1028 (+)	18	GGTAGGTGTCTATGAGGC	
V- <i>MluI</i> - <i>Fs eI</i> - <i>Xho I</i>	43	CCCTTACGCGTGGCCGGCCTCGAGATGGATCAAGATG	64

Bezeichnung	Länge [nt]	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]
		CCTTCATTC	
V- <i>SphI</i> - <i>FseI</i> - <i>XhoI</i> (+)	58	CCCTTTGCATGCGGCCGGCCTCGAGTTATTACGAGCGG AAGATTTCTCGGCAGAAAAGGATC	62
<i>XhoI</i> -W	34	CCCTTTCTCGAGATGGATCAAGATGCCTTCATT	54
W- <i>XhoI</i> (+)	77	CCCTTTCTCGAGTTACTACTAGGCACCACGCTTAGTACTATCG GTCTCTAGACCCGGGTGGATTGGGCGGCCGTTGG	56
V-edit-knock	31	CGTGGTCATAGGGAGAACACATCATCTATG	48
V-edit-knock (+)	67	CATAGATGATGTGTTCTCTCTATGACG	50
<i>KpnI</i> -N	30	CCCCGGGGTACCCCGATGGCCGGGTTGTTG	60
N- <i>XhoI</i> (+)	33	GGCCGCTCGAGCTAGATTCCTCCTATCCCTGC	60
<i>KpnI</i> -P	33	CCCCGGGGTACCCCGATGGATCAAGATGCCTTC	64
P- <i>XhoI</i> (+)	35	GCCTCTCGAGCTAGTTGGTCAGTGACTCTATGTCC	72
F-5716 (+)	17	GGATCTTCACAGACAGG	52
F-5904	16	GCCCCAGGGATCCCGC	58
F-6600 (+)	18	CTATGCCTGCTTTACAAG	56
pSeV- 2230	19	CGCCAAGCTTAAGACGTCG	60
pSeV- 4285 (+)	19	GGAGGGGACAGAAGCTGGC	64

Die Bezeichnung der Primer mit spezifischer Nummerierung gibt das Gen und die Nukleotidposition des ersten Nukleotides im SeV-Genom an, mit dem das Oligonukleotid hybridisiert. Falls ein Primer nach der Plasmid-kodierten Genomsequenz von SeV hybridisiert, wird die entsprechende Nukleotidposition angegeben (pSeV = RS-3Gg). Ein (+) bezeichnet Primer mit reverser Orientierung des Primers zur genomischen RNA. T_M gibt die spezifische Hybridisierungstemperatur an. Die Primer mit Bezeichnungen von spezifischen Bereichen aus dem SeV-Genom sind synthetisierte Primer, die durch Fusions-PCR neue Genom-Sequenzen bereitstellen.

5.2.3.15 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR können *in vitro* DNA-Bereiche spezifisch amplifiziert werden. Auf diese Weise können in geringen Konzentrationen vorliegende DNA-Sequenzen um mehrere Zehnerpotenzen vermehrt werden.

eingesetzte Mengen für 100 µl-Ansatz:

Template DNA		10 – 100 ng
Puffer	(10 x)	10 µl
dNTPs	(10 mM)	2,0 µl
MgCl ₂	(25 mM)	6,0 µl
Primer	(20 pmol/ µl)	je 2,5 µl
Enzym	(3,5 U/ µl)	1,5 µl
H ₂ O	(bidest.)	ad 100 µl

In 50 µl-Ansätzen wurden die angegebenen Mengen entsprechend halbiert. Es wurde sowohl die Taq-Polymerase als auch der Enzym-Mix aus dem *Expand High Fidelity-Kit* als Enzym verwendet. Da die Taq-Polymerase eine ~10 x höhere Fehlerrate besitzt, wurde für Ansätze, die im Anschluss kloniert oder sequenziert wurden, der genauere *Expand High Fidelity-Kit* eingesetzt.

Für Amplifikationen von Fragmenten zwischen 300 und 3000 Basenpaaren (bp) Länge wurde vom Hersteller ein 100 µl-Maßstab empfohlen. Ansätze mit der Taq-Polymerase (5 units/ ml) wurden im 50 µl-Maßstab durchgeführt.

PCR-Ablauf, 30 Zyklen:

erste Denaturierung	4 min	94 °C
Denaturierung	1 min	94 °C
Hybridisierung	45 sec	T _m der Primer
Synthese	1 min/ kb	72 °C
letzte Synthese	4 x 1 min/ kb	72 °C

5.2.3.16 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Abtrennung restlicher Primer, Enzyme usw. wurden PCR-Produkte mit dem *QIAquick PCR Purification-Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

5.2.3.17 Fusions-PCR Reaktion

Zur Fusion zweier artifiziell hergestellter PCR-Produkte wurden die beiden Reaktionsansätze wie unter 5.2.3.16 beschrieben aufgereinigt und deren Konzentration bestimmt. Nun wurde eine weitere PCR-Reaktion angesetzt, in welcher die Produkte im molaren Verhältnis 1:1 in einer Menge von 10 – 40 ng zugegeben wurden.

eingesetzte Mengen für 100 µl-Ansatz:

Template PCR		10 – 40 ng
Puffer	(10 x)	10 µl
dNTPs	(10 mM)	2,0 µl
MgCl ₂	(25 mM)	6,0 µl
Enzym	(3,5 U/µl)	1,5 µl
H ₂ O	(bidest.)	ad 100 µl

Fusions-PCR Ablauf, 20 Zyklen:

erste Denaturierung	4 min	94 °C
Denaturierung	1 min	94 °C
Hybridisierung	55 sec	T _m
Synthese	1 min/ kb	72 °C
letzte Synthese	4 x 1 min/ kb	72 °C

In den 20 Zyklen erfolgt die Verschmelzung beider PCR-Fragmente in ihrem komplementären Bereich. Die Polymerase füllt während der Synthesezeiten die Stränge in 5'-3' Richtung auf. Nach Ablauf wird eine variablen Menge des Fusionsproduktes (5-15 µl) in einer nachgeschalteten PCR als Template verwendet. Für diese PCR wurde vorzugsweise ein Paarpaar verwendet, deren Sequenz in dem zu amplifizierenden Bereich lag. Die Reaktionsbedingungen dieser PCR entsprachen den unter 5.2.3.15 beschriebenen Konditionen.

5.2.3.18 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von den Firmen Medigenomix GmbH, Martinsried, und MWG biotech, Ebersberg, durchgeführt. Es wurden fertig editierte DNA-Sequenzen und die dazugehörigen Elektropherogramme geliefert, die mit der Software „DNA-Star“ und „Chromas“ (5.2.5) nachbearbeitet werden konnten.

5.2.3.19 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Proteinase K Puffer:	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	25 mM	EDTA, pH 8,0
	0,5 %	SDS

kurz vor Gebrauch Zugabe von Proteinase K (0,1mg/ ml)

Die hier dargestellte Methode wurde erstmals von Gross-Bellard et al. (1973, PMID: 4200179) beschrieben und basiert auf der Proteindenaturierung durch SDS bei gleichzeitigem proteolytischem Verdau mittels Proteinase K.

Eukaryontische, adhärenente Zellen wurden mit Trypsin/ EDTA vom Kulturboden abgelöst, abzentrifugiert (Heraeus Tischzentrifuge, 1000 rpm, 5 min, 4 °C), zweimal mit 1ml kaltem PBS gewaschen und das trockene Zellpellet in 250 µl Proteinase K Puffer aufgenommen. Unter leichtem Schütteln wurde die Zellsuspension über Nacht bei 45 °C inkubiert. Zur Proteinextraktion wurde anschließend 1 Vol Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25/ 24/ 1) zugegeben, kurz geschüttelt um eine mechanische Scherung der chromosomalen DNA zu vermeiden und der Ansatz für 2 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung der Proteinextraktion wurden Phenolspuren aus der DNA-Lösung dreimalig mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24/ 1) extrahiert und die chromosomale DNA durch Zugabe von 1/ 10 Vol 3M NaAcetat und 2 Volumeneinheiten Ethanol bei Rt gefällt. Das deutlich sichtbare DNA-Knäuel konnte mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein ERG überführt werden. Die DNA wurde anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen, 20 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das entstandene Pellet getrocknet. Die DNA wurde im Anschluss in einem adäquaten Volumen Elutionspuffer aufgenommen und bei 65 °C gelöst. Nach der Konzentrationsmessung wurde die DNA mittels analytischer Agarosegelelektrophorese auf ihre Intaktheit überprüft und bei 4 °C gelagert.

5.2.4 Proteinchemische Methoden

5.2.4.1 Proteinisolierung aus eukaryontischen Virus-infizierten Zellen

Die infizierten Zellen werden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Zellyse direkt in der Vertiefung durch Zugabe von 200 µl kalten RIPA-Puffer. Nach kurzem vorsichtigem Resuspendieren wurde das Lysat in ein ERG überführt und direkt auf Eis gelagert.

Danach wurde das Zellysats mit kontinuierlichem Ultraschall (Branson Sonifier, 60 %) für 2 min behandelt, um die mitisolierte genomische DNA zu scheren. Die entstandenen DNA-Fragmente werden dann bei 4 °C und 14 000 g für 10 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert. Die Proteinlösung wurde bei -20 °C gelagert.

RIPA-Puffer:

150	mM	NaCl
1	%	Na-Deoxycholat
1	%	TritonX-100
0,1	%	SDS
10	mM	Tris, pH 8
→ ad 100 ml H ₂ O		

5.2.4.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung nach Peterson (1983) beruht auf dem Prinzip der Reduktion eines Chromogens in einer schnellen Reaktion mit aromatischen Aminosäuren (Tyr, Trp) und in einer langsamen Reaktion mit Kupfer-Chelatkomplexen der Aminosäurekette und polaren Seitengruppen (Lowry et al., 1951).

Als Eichstandard wurden BSA-Lösungen eingesetzt (0,2 – 2,0 µg/ µl). In 1,5 ml ERG wurde eine Verdünnungsreihe von 2 µg bis 20 µg des Standards in 2 µg-Abständen gegeben und jede Verdünnung mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Von den zu bestimmenden Proteinextrakten wurden je 10 µl in 190 µl H₂O gemessen. Nach Zugabe von 200 µl Lösung A pro Vertiefung wurde die Lösung für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe und Mischen von 100 µl Lösung B erfolgte ein Inkubation für weitere 30 min bei RT. Die OD wurde bei 750 nm bestimmt.

Lösung A:

10	ml	CTC (s.u.)
10	ml	SDS (10 %)
8	ml	NaOH (1 N)
12	ml	H ₂ O

Lösung B:

20	%	Folin Ciocalteu's Phenol Reagenz in H ₂ O
----	---	--

CTC (Copper-Tartrat-Carbonat) :

I:	0,1	g	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
	0,2	g	Natriumtartrat
	→ in 45 ml H ₂ O		

II:	10	g	Na ₂ CO ₃
	→ in 45 ml H ₂ O (erhitzen beim Lösen)		
	→ Lösung II langsam zu Lösung I geben; ad 100 ml H ₂ O		

5.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese nach Laemmli (1970) werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden diskontinuierliche Gele mit einem Sammelgel (5 %) und einem Trenngel (10 %) gegossen. Die Proteinproben wurden mit einem gleichen Volumen an Proteinprobenpuffer (2-Fach-konzentriert) versetzt und in die Taschen des Gels (14 x 16 x 0,15 cm) geladen. Die Elektrophorese bei 15 mA mit einem Gel bzw. bei 30 mA mit zwei Gelen für 15 h. Die relative elektrophoretische Mobilität wurde durch Vergleich mit Protein-Molekulargewichtsmarkern bestimmt.

Sammelgel, 5 %:

7,0	ml	H ₂ O
1,65	ml	Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung (30:0,8)
1,25	ml	Tris (1 M) / HCl, pH 6,8
0,1	ml	SDS (10 %)
0,05	ml	APS (10 %)
16	µl	Temed

Trenngel, 10 %:

7,25	ml	H ₂ O
10	ml	Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (30:0,8)
11,25	ml	Tris (1 M)/ HCl, pH 8,7
0,3	ml	SDS (10 %)
0,15	ml	APS (10 %)
22,5	µl	Temed

Elektrophoresepuffer:

25	mM	Tris
150	mM	Glycin
0,1	%	SDS

Proteinprobenpuffer (2 x):

130	mM	Tris/ HCl, pH 6,8
10	%	SDS
20	%	Glycerin
10	%	β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
0,01	%	Bromphenolblau

5.2.4.4 Proteintransfer auf Membran (Western Blot)

Für den immunologischen Nachweis der in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, wurden diese durch Elektrotransfer auf eine Polyvenyldifluorid- Membran (PVDF) transferiert (Towbin et al., 1979). Dafür wurde der Reihenfolge nach folgender Aufbau durchgeführt:

(-) – Schwamm – Filterpapier – Gel – PVDF– Filterpapier – Schwamm – (+)

Der Zusammenbau erfolgt in Transferpuffer, unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen. Dieser „Sandwich“-Aufbau wurde zwischen zwei perforierte Kunststoff-Platten so in einer mit Transferpuffer gefüllten Apparatur (Höfer-Kammer, große Ausführung) positioniert, dass ein elektrisches Feld senkrecht zur Gelebene angelegt werden konnte. Der Transfer der negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wurde bei 400 mA für 5 – 6 h durchgeführt.

Transferpuffer:

20 mM Tris/HCl, pH 8,7
150 mM Glycin

5.2.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die PVDF-Membran mit gebundenem Antigen wurde nach dem Proteintransfer für 1 h bei 4 °C mit Rotiblock-Lösung abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in der entsprechenden Verdünnung erfolgte ebenfalls in Rotiblock-Lösung unter leichtem Schwenken für 1 h bei RT. Nicht gebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit 1 x TBST entfernt: 1 x 1 min, 2 x 10 min, 2 x 5 min. Der Nachweis erfolgte mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline, die in einer Verdünnung von 1:2000 in TBST für 1 h auf die Membran gegeben wurden. Nach erneuten fünf Waschschritten mit TBST erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper mit Hilfe einer Chemolumineszenz-Substanz (ECL-Mix) für 1 – 2 min bei RT. Nach kurzem Trocknen der Membran und Einschlagen in eine Plastikfolie wurde das emittierte Licht durch Auflegen eines Röntgen-Films (ECL) in einer Fotokassette (1 – 45 sec) sichtbar gemacht.

Rotiblock-Lösung:

10 x-Konzentrat mit H₂O 1:10 verdünnen

TBST-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
0,05 % Tween 20

ECL-Mix:

Lösung 1 und Lösung 2 1:1 mischen (s. Angaben des Herstellers)

5.2.4.6 Lösen einer Ag-Ak-Komplexierung von einer PVDF- Membran

Nach dem immunologischen Nachweis eines Proteins auf einer Membran mit einem Antikörper kann dieser wieder entfernt werden, und weitere Proteine auf der gleichen Membran können mit anderen Antikörpern nachgewiesen werden.

Für die Entfernung der Antikörper wurde die Membran mit Stripping-Puffer versetzt und für 30 min bei 50 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Membran (2 x 10 min in H₂O, 1 x 10 min in TBST) konnte wieder ein immunologischer Nachweis nach 5.2.4.5 durchgeführt werden.

Stripping-Puffer:

2	%	SDS
62,5	mM	Tris pH 6,7
100	mM	β-Mercaptoethanol

5.2.4.7 Nachweis von lacZ-Expression

Der Nachweis der β -Galactosidase-Synthese in transfizierten Zellen kann durch Färbung der Zellen mit einem X-Gal-haltigen Färbereagenz (X-Gal = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid) erfolgen. Für die Färbung der Zellen wurden diese zunächst mit einem Formaldehyd-Gemisch für 5 min bei 4 °C fixiert, 2 x mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Färbereagenz überschichtet. Durch die enzymatische Reaktion der β -Galactosidase für 2 – 24 h bei 37 °C wird das Substrat X-Gal zu einem blauen Indigofarbstoff hydrolysiert, so dass alle LacZ-exprimierenden Zellen ein Blaufärbung aufweisen. Durch Auszählen der blaugefärbten Zellen kann die Effizienz der Transfektion und das Vorhandensein des Vaccinia Helferviruses, das u.a. für β -Galactosidase kodiert, ermittelt werden.

Fixierlösung:

2	%	Paraformaldehyd
0,2	%	Glutaraldehyd
→ in PBS		

X-Gal-Lösung:

40	mg/ ml in DMF (bei -20 °C lagern)
----	-----------------------------------

Färbelösung:

- 1 mg/ ml X-Gal
 - 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
 - 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{H}_2\text{O}$
 - 2 mM MgCl_2
- in PBS

5.2.5 Computerprogramme

Zur analytischen Bearbeitung von Nukleinsäuresequenzen wurde das Programm DNA-Star (DNA-Star) verwendet. Um Elektropherogramme von Sequenzierungsreaktionen zu lesen wurde das Programm Chromas (Entelechon GmbH) verwendet. Die Auswertung der FACS-Analysen erfolgte durch das Programm Cellquest.

5.2.6 Sicherheitsbestimmungen

Alle Experimente mit infektiösen Viruspartikeln wurden gemäß dem Infektionsschutzgesetz in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe II in entsprechenden *Laminar Air Flow*-Werkbänken durchgeführt. Kontaminierte Geräte und Gefäße wurden in Lorasol (2 %) desinfiziert und so weit wie möglich autoklaviert. Die Handhabung von gentechnisch veränderten Organismen erfolgte nach den Bestimmungen des Gentechnikgesetzes (GenTG).

6 Literaturverzeichnis

Auer, M. (2003). Vermehrungssysteme für Gen-defiziente Sendai Viren: Herstellung und Charakterisierung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helfierzelle. Doktorarbeit. Technische Universität München.

Balachandran, S., Roberts, P.C., Kippermann, T., Bhalla, K.N., Compans, R.W., Archer D.R. & Barber, G.N. (2000). Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/caspase-8 death signaling pathway. *J. Virol.*, **74**, 1513 – 1523.

Banerjee, A.K. & Barik, S. (1992). Gene expression of Vesicular Stomatitis genome RNA. *Virology*, **188**, 417 – 428.

Bermann, S. & McIntosh, M. (1985). Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XXI. Acute respiratory infections. *Rev. Infect. Dis.*, **7**, 674 – 691.

Birnbaum, M.J., Clem, R.J. & Miller, L.K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/ His sequence motifs. *J. Virol*, **68**, 2521 – 2528.

Bitzer, M., Prinz, F., Bauer, M., Spiegel, M., Neubert, W.J., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. & Lauer, U. (1999). Sendai-Virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (flice) and caspase-3 (CPP32). *J. Virol.*, **73**(1), 702 – 708.

Black, B.L. & Lyles, D.S. (1992). Vesicular Stomatitis matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo. *J. Virol.*, **66**, 4058 – 4064.

Blanchard, L., Tarbouriech, N., Blackledge, M., Timmins, P., Burmeister, W.P., Ruigrok, R.W. & Marion, D. (2004). Structure and dynamics of the nucleocapsid-binding domain of the Sendai virus phosphoprotein in solution. *J. Virol.*, **319**(2), 201-11.

Blondel, D., Harmison, G. & Schubert, M. (1990). Role of matrix protein in cytopathogenesis of Vesicular Stomatitis virus. *J. Virol.*, **64**, 1716 – 1725.

Blumberg, B.M., Leppert, M. & Kolakofsky, D. (1981). Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell*, **23**, 837-845.

Brennan, C.M. & Steitz, J.A. (2001). RNA and mRNA stability. *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 266 – 277.

Buchholz C.J., Retzler, C. Homann, H. & Neubert, W.J. (1994). The carboxy-terminal domain of Sendai-Virus nucleocapsid protein is involved in complex formation between phosphoprotein and nucleocapsid-like particles. *Virology*, **204**, 770 – 776.

Bukreyev, A., Camargo, E. & Collins, P.L. (1996). Recovery of infectious respiratory syncytial virus expressing an additional, foreign gene. *J. Virol*, **70**, 6634-6641.

Calain, P. & Roux, L. (1993). The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai-Virus defective interfering RNA. *J. Virol.*, **67**, 4822 – 4830

Calain, P. & Roux, L. (1995). Functional characterization of the genomic and antigenomic promoters of Sendai-Virus. *Virology*, **212**, 163 – 173.

Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M.A. & Cattaneo, R. (1998). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO J.*, **17**, 3899-3908.

Chandrika, R. M. & Johnson, K. M. (1964). Parainfluenza viruses; in: Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases, 470-486. American Public Health Association, New York.

Chanock, R.M. & Johnson, K.M. (1964). Parainfluenza viruses. *Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases*, 480 – 486. American Public Health Association, New York.

Chapman, B.S., Thayer, R. M., Vincent, K. A. & Haigwood, N. L. (1991) Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **19**(14):3979-86.

Chou, J. & Roizman B. (1992). The gamma gene of herpes simplex virus 1 precludes neuroblastoma cells from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death in neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 3266 – 3270.

- Clem, R.J., Fechheimer, M. & Miller, L.K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, **254**, 1388 – 1390.
- Clem, R.J. & Miller, L.K. (1993). Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. *J. Virol.*, **67**, 3730 – 3738.
- Colonno, R.J. & Banerjee A.K. (1978). Complete nucleotide sequence of the leader RNA synthesized in vitro by the Vesicular Stomatitis virus. *Cell*, **15**, 93 – 101.
- Conzelmann, K.K. (1998). Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu.Rev.Genet.*, **32**, 123-162.
- Cortese, C. K., Feller, J. A. & Moyer, S.A. (2000) Mutations in domain V of the Sendai virus L polymerase protein uncouple transcription and replication and differentially affect replication in vitro and in vivo. *Virology*, **277**(2), 387-96.
- Curran, J. & Kolakofsky, D. (1988). Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai-Virus P/C mRNA. *EMBO J.*, **7**, 245 – 251.
- Curran, J. & Kolakofsky, D. (1989). Scanning independent ribosomal initiation of the Sendai-Virus Y-proteins in vitro and in vivo. *EMBO J.*, **8**, 521 – 526.
- Curran, J., Homann, H., Buchholz, C., Rochat, S., Neubert, W. & Kolakofsky, D. (1993). The hypervariable C-terminal tail of the Sendai paramyxovirus nucleocapsid protein is required for template function but not for RNA encapsidation. *J. Virol.*, **67**, 4358-4364.
- Curran, J., Pelet, T. & Kolakofsky, D. (1994). An acidic activation-like domain of the Sendai virus P protein is required for RNA synthesis and encapsidation. *Virology*, **202**(2):875-84.
- Curran, J., Boeck, R., Lin-Marq, N. Lupas, A. & Kolakofsky D. (1995a). Paramyxovirus phosphoproteins form homotrimers as determined by an epitope dilution assay, via predicted coiled coils. *Virology*, **214**, 139-149.

Curran, J., Marq, J.-B. & Kolakofsky, D. (1995). An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J Virol.*; **69**(2), 849-55.

Curran, J. (1996). Reexamination of the Sendai virus P protein domains required for RNA synthesis: a possible supplemental role for the P protein. *Virology*, **221**, 130-140.

Curran, J. (1998). A role for the Sendai virus P protein trimer in RNA synthesis. *J Virol.*, **72**(5), 4274-80.

Delenda, C., Taylor, G., Hausmann, S., Garcin, D. & Kolakofsky, D. (1997). Sendai viruses with altered P, V, and W protein expression. *Virology*, **242**(2):327-37.

Doms, R.W., Lamb, R.A., Rose J.K. & Helenius A. (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology*, **193**, 545 – 562.

Dugaiczyk, A., Boyer, H.W. & Goodman, H.M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.*, **96**, 171 – 178.

Einberger, H., Mertz, R., Hofschneider, P. H. and Neubert, W. J. (1990). Purification, renaturation, and reconstituted protein kinase activity of the Sendai virus large (L) protein: L protein phosphorylates the NP and P proteins in vitro. *J Virol.*, **64**(9), 4274-80.

Engelhorn, M. Stricker, R. & Roux, L. (1993). Molecular cloning and characterization of a Sendai-Virus internal deletion defective RNA. *J. Gen. Virol.*, **74**, 137 – 141.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. & Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 7413 – 7417.

Feller, J.A. , Smallwood, S. , Horikami, S. M. & Moyer, S. A. (2000) Mutations in conserved domains IV and VI of the large (L) subunit of the sendai virus RNA polymerase give a spectrum of defective RNA synthesis phenotypes. *Virology*; **269**(2):426-39.

Fields (2001): *Virology. Lippincott Williams & Wilkins*, Vierte Auflage.

- Fischer, S. (1998). Herstellung von Verpackungszelllinien zur Transkomplementation der drei viralen Hüllproteine bei der Erzeugung rekombinanter replikations-defizienter Sendai-Viren. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Flanagan, E.B., Zamparo, J.M., Ball, L.A., Rodriguez, L.L. & Wertz, G.W. (2001). Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *J. Virol.*, **75** (13), 6107-6114.
- Foley, H.D., McGettigan, J.P., Siler, C.A., Dietzschold, B. & Schnell, M.J. (2000). A recombinant rabies virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fails to protect against rabies virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (26), 14680-14685.
- Fürst, T.R., Niles, E.G., Studier F.W. & Moss, B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 8122 – 8126.
- Fukuhara, N., Huang, C., Kiyotani, K., Yoshida, T. & Sakaguchi, T. (2002). Mutational analysis of the Sendai virus V protein: importance of the conserved residues for Zn binding, virus pathogenesis, and efficient RNA editing. *Virology*, **299**(2), 172-81.
- Gadaleta, P., Vacotto, M. & Coulombié, F. (2002). Vesicular Stomatitis virus induces apoptosis at early stages in the viral cycle and does not depend on virus replication. *Virus Research*, **86**, 87 – 92.
- Gagliardini, V., Fernandez P.-A., Lee, R.K., Drexler, H.C., Rotello, R.J., Fishman M.C. & Yuan, J. (1994). Prevention of vertebrate neuronal death by the *crmA* gene. *Science*, **263**, 826 – 828.
- Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curran, J. & Kolakofsky, D. (1995). A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J.*, **14** (24), 6087 – 6094.
- Garcin, D., Taylor, G., Tanabayashi, K., Compans, R. & Kolakofsky, D. (1998). The short Sendai-Virus leader region controls the induction of programmed cell death. *Virology*, **243**, 340 – 353.

- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schafer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E. & Klenk, H.D. (1994). Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie*; **76** (3-4):217-25.
- Glazier, K., Raghow, R. & Kingsbury, D.W. (1977). Regulation of Sendai-Virus transcription: evidence for a single promoter in vivo. *J. Virol.*, **21**, 863 – 871.
- Glezen, W.P., Loda, F. & Denny, D.W. (1989). Parainfluenza viruses. *Viral infections of humans*, 493 – 507. (Evans, S.A. ed.) Plenum medical book company, New York.
- Graef, H. (1995). Funktionelle Charakterisierung des rekombinanten Sendai Virus Large (L) Proteins. Doktorarbeit. Eberhard-Karl-Universität Tübingen.
- Gupta, K.C., Patwardhan, S. (1988). ACG, the initiator codon for a Sendai virus protein. *J Biol Chem.*, **263** (18),8553-6.
- Gupta, K.C. & Kingsbury, D.W. (1984). Complete sequences of the intergenic and mRNA start signals on the Sendai-Virus genome: Homologies with the genome of Vesicular Stomatitis virus. *Nucl. Acid. Res.*, **12**, 3829 – 3841.
- Hamaguchi, M., Nishikawa, K., Toyoda, T., Yoshida, T., Hanaichi, T. & Nagai, Y. (1985). Transcriptive complex of Newcastle Disease virus. II. Structural and functional assembly associated with the cytoskeletal framework. *Virology*, **174**, 295 – 308.
- Hasan, M.K., Kato, A., Shioda, T., Sakai, Y., Yu, D. & Nagai, Y. (1997). Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase from 3'proximal first locus. *J.Gen.Virol.*, **78**, 2813-2820.
- Heminaway, B.R., Yang, Y., Tanaka, Y., Panin, M., Huang, Y.T. & Galinski, M.S. (1995). Role of basic residues in the proteolytic activation of Sendai virus fusion glycoprotein. *Virus Res.*, **36** (1):15-35.
- Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G. & Rickenson A. (1993). Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 8479 – 8483.

- Hinshaw, V.S., Olsen C.W., Dybdahl-Sissoko, N. & Evans D. (1994). Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J. Virol.*, **68**, 3667 – 3673.
- Hirata, T., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Kitazato, K., Kato, A., Nagai, Y. & Hasegawa, M. (2002). An improved method for recovery of F-defective Sendai virus expression foreign genes from cloned cDNA. *J. of Virological Methods*, **104**, 125-133.
- Homann, H., Hofschneider, P.H. & Neubert W.J. (1990). Sendai-Virus gene expression in lytically and persistently infected cells. *Virology*, **177**, 131 – 140.
- Horikami, S.M., Curran, J., Kolakofsky, D. & Moyer, S.A. (1992). Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J. Virol.*, **66** (8), 4901-4908.
- Horikami, S.M., Moyer, S.A. (1995). Alternative amino acids at a single site in the Sendai virus L protein produce multiple defects in RNA synthesis in vitro. *Virology* , **211** (2), 577-82.
- Horikami, S.M., Hector, R.E., Smallwood, S. & Moyer, S.A. (1997). The Sendai virus C protein binds the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *Virology* , **235** (2), 261-70.
- Hosaka, Y., Kitano, H. & Ikeguchi, S. (1966). Studies on the pleomorphism of HVJ virions. *Virology*, **29**, 205 – 221.
- Huang, C., Kiyotani, K., Fujii, Y., Fukuhara, N., Kato, A., Nagai, Y., Yoshida, T. & Sakaguchi, T. (2000). Involvement of the zinc-binding capacity of Sendai virus V protein in viral pathogenesis. *J Virol.*, **74**(17), 7834-41.
- Iseni, F., Garcin, D., Nishio, M., Kedersha, N., Anderson, P. & Kolakofsky, D. (2002). Sendai-Virus trailer RNA binds TIAR, a cellular protein involved in virus-induced apoptosis. *EMBO J.*, **21**, 5141 – 5150.
- Johansson, K., Bourhis, J.-M., Campanacci, V., Cambillau, C, Canard, B & Longhi, S. (2003). Crystal structure of measles virus phosphoprotein domain responsible for the induced folding of the C-terminal domain of the nucleoprotein. *J. Bio. Chem.*, **278**, 44567-44573.

- Jensen, K.E., Minuse, E. & Ackermann, W.W. (1955). Serologic evidence of American experience with newborn pneumonitis virus (type Sendai). *J. Immunol.*, **75**, 71 – 77.
- Jeurissen, S.H., Wagenaar, F., Pol J.M., van der Eb, A.J. & Noteborn, M.H. (1992). Chicken anemia virus causes apoptosis in thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. *J. Virol.*, **66**, 7383 – 7388.
- Kamita, S.G., Majima, K. & Maeda, S. (1993). Identification and characterization of the p35 gene of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *J. Virol.*, **67**, 455 – 463.
- Katayama, Y., Kohso, K., Nishumura, A., Tatsuno, Y., Homma, M. & Hotta, H. (1997). Detection of Measles Virus mRNA from autopsied human tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 299-301.
- Kato, A., Kiyotani, K., Sakai, Y., Yoshida, T., Nagai, Y. (1997). The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis., *EMBO J.*, **16** (3), 578-87.
- Kato, A., Kiyotani, K., Sakai, Y., Yoshida, T., Nagai, Y. (1997). Importance of the cysteine-rich carboxyl-terminal half of V protein for Sendai virus pathogenesis., *J Virol.*, **71**(10), 7266-72.
- Kato, A., Kiyotani, K., Hasan, M.K., Shioda, T., Sakai, Y., Yoshida, T. & Nagai, Y. (1999). Sendai-Virus gene start signals are not equivalent in reinitiation capacity: moderation at the fusion protein gene. *J. Virol.*, **73**, 9237 – 9246.
- Klenk, H.D. & Choppin, P.W. (1969). Lipids of plasma membranes of monkey and hamster kidney cells and Parainfluenza virions grown in these cells. *Virology*, **38**, 255 – 268.
- Klenk, H.D. & Choppin, P.W. (1970). Plasma membrane lipids and Parainfluenza virus assembly. *Virology*, **40**, 939 – 947.
- Klenk, H.D. & Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.*; **2** (2):39-43.

- Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curran, J. & Roux, L. (1998). Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol.*, **72**(2), 891-899.
- Kolakofsky, D., Le Mercier, P., Isenid, F. & Garcin, D. (2004). Viral RNA polymerase scanning and the gymnastics of Sendai virus RNA synthesis. *Virology*, **318**, 463-473.
- Kopecky, S., Willingham, M. & Lyles, D. (2001). Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with Vesicular Stomatitis virus. *J. Virol.*, **75**, 12169 – 12181.
- Koyama, A.H. (1995). Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of Vesicular Stomatitis virus. *Virus Research*, **37**, 285 – 290.
- Krakauer, D. & Payne, R. (1997). The evolution of virus-induced apoptosis. *Proc. R. Soc. Lond.*, **264**, 1757 – 1762.
- Kurilla, M.G. & Keene, J.D. (1983). The leader RNA of VSV is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell*, **34**, 837 – 845.
- Kuroya, M., Ishida, N. & Shiratori, T. (1953). Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. Report: The isolation of a new virus possessing hemagglutinin activity. *Yokohama med. Bull.*, **4**, 217 – 233.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 – 685.
- Lamb, R.A. & Kolakofsky, D. (2001). Paramyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1305 – 1340.
- Latorre, P., Cadd, T., Itoh, M., Curran, J., Kolakofsky, D. (1998). The various Sendai virus C proteins are not functionally equivalent and exert both positive and negative effects on viral RNA accumulation during the course of infection. *J. Virology*, **72**(7), 5984-93.
- Lee, S., Rodriguez, D., Rodriguez, J. & Esteban, M. (1997). The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2, and involves ICE-like proteases. *Virology*, **231**, 81 – 88.

- Leppert, M., Rittenhouse, L., Perrault, J., Summers, D.F. & Kolakofsky, D. (1979). Plus and minus strand leader RNAs in negative strand virus-infected cells. *Cell*, **18**, 735 – 747.
- Levine, B., Huang, Q., Isaacs, J.T., Reed, J.C., Griffin, D.E. & Hardwick J.M. (1993). Conversion of lytic to persistent Alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature*, **361**, 739 – 742.
- Levine, B., Goldman, J., Jiang, H., Griffin, D. & Hardwick, J. (1996). Bcl-2 protects mice against fatal Alphavirus encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 4810 - 4815
- Lewis J., Wesselingh S.L., Griffin D.E. & Hardwick J.M. (1996). Alphavirus-induced apoptosis in mouse brains correlates with neurovirulence. *J. Virol*, **70**, 1828 – 1835.
- Leyrer, S. (1998). Herstellung rekombinanter Sendai-Viren: ein neuer Zugang für die virologische Grundlagenforschung und für medizinische Anwendungen. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Leyrer, S., Neubert, W.J., Sedlmeier, R. (1998). Rapid and efficient recovery of Sendai-Virus from cDNA: factors influencing recombinant virus rescue. *J. Virol. Methods*, **75(1)**, 47 – 58.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 – 275.
- Lu, Y.Y., Koga, Y., Tanaka, K., Sasaki, M. Kimura, G. & Nomoto, K. (1994). Apoptosis induced in CD4+ cells expressing gp160 of Human Immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, **68**, 390 – 399.
- Masaki, I., Yonemistu, Y., Komori, K., Ueno, H., Nakashima, Y., Nakagawa, K., Fukumura, M., Kato, A., Hasan, M.K., Nagai, Y., Sugimachi, K., Hasewaga, M. & Sueishi, K. (2001). Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector for vascular system. *FASEB J.*, **15** (7), 1294-1296.
- Masters, P.S., Banerjee, A.K. (1988). Complex formation with vesicular stomatitis virus phosphoprotein NS prevents binding of nucleocapsid protein N to non-specific RNA. *J. Virol.*, **62**, 2658-2664.

- Matsuoka, Y., Curran, J., Pelet, T., Kolakofsky, D., Ray, R. & Compans, R.W. (1991). The P gene of human parainfluenza virus type 1 encodes P and C proteins but not a cysteine-rich V protein. *J. Virol.*, **65**, 3406-3410.
- Mochizuki, Y., Tashiro, M. & Homma, M. (1988). Pneumopathogenicity in mice of Sendai-Virus mutants TS_{rev}-58 is accompanied by in vitro activation with trypsin. *J. Virol.*, **62**, 3040 – 3042.
- Modrow, S., Falke, D. & Truyen, U. (2003). *Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer*, Heidelberg-Berlin.
- Myers, T.M., Pieters, S. & Moyer S.A. (1997a). A highly conserved region of the Sendai virus nucleocapsid protein contributes to the NP-NP binding domain. *Virology*, **229**(2), 322 – 35.
- Myers, T.M. & Moyer, S.A. (1997b). An amino-terminal domain of the Sendai virus nucleocapsid protein is required for template function in viral RNA synthesis. *J. Virol.*, **71**(2), 918-24.
- Nagai, Y. (1999). Paramyxovirus replication and pathogenesis. Reverse genetics transforms understanding. *Rev. Med. Virol.*, **9**, 83 – 99.
- Nagai, Y. & Kato, A. (1999). Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. *Microbio.Immunol.* , **43**, 613-624.
- Ohuchi, M. & Homma, M. (1976). Trypsin action on the growth of Sendai-Virus in tissue culture cells. IV. Evidence for activation of Sendai-Virus by cleavage of a glycoprotein. *J. Virol.*, **18**, 1147 – 1150.
- Paterson, R.G., Leser, G.P., Shaughnessy, M.A. & Lamb, R.A. (1995). The paramyxovirus SV5 protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology*, **206**, 116-125.
- Pelet, T., Marq, J. B., Sakai, Y., Wakao, S., Gotoh, H. & Curran, J. (1996). Rescue of Sendai virus cDNA templates with cDNA clones expressing Parainfluenza virus type 3 N, P and L proteins. *Journal Gen. Virol.*, **77** , 2465-2469.
- Peluso, R. W. & Moyer, S. A., 1988. Viral proteins required for the in vitro replication of vesicular stomatitis virus defective interfering particle genome RNA. *Virology*, **162**, 369-376.

- Perrault, J. (1981). Origin and replication of defective interfering particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **93**, 151 – 207.
- Pinkenburg, O., Vogelmeier, C., Bossow, S., Neubert, W.J., Lutz, R.B., Ungerechts, G., Lauer, U.M., Bitzer, M. & Bals, R. (2004). Recombinant Sendai virus for efficient gene transfer to human airway epithelium. *Exp. Lung. Res.*, 30 (2), 91-101.
- Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L. & Tordo, N. (1990) Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol.*, **71** (Pt 5), 1153-62.
- Poirot, M.K., Schnitzlein, W.M. & Reichmann, M.E. (1985). The requirement of protein synthesis for VSV inhibition of host cell RNA synthesis. *Virology*, **140**, 91 – 101.
- Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenber, D., Korsmeyer, S. & White, E. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 7742 – 7746.
- Rautenberg, P. & Ullman, U. (1986). Klinik der meningo-enzephalitischen Viruskrankheiten. *Klinische Virologie*. (Gsell, O., Kech, U. & Mohr, W. eds.) Urban & Schwarzenberg, München.
- Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet T.A., Sleath P.R. Salvesen, G.S. & Pickup, D.J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme. *Cell*, **69**, 597 – 607.
- Re, G.G. (1990). Deletion mutants of paramyxoviruses. *The Paramyxoviruses*, 275 – 295. (Kingsbury, D.W. ed.) Plenum, New York.
- Roberts, A & Rose, J. K. (1998). Recovery of negative-strand RNA viruses from plasmid DNAs: a positive approach revitalizes a negative field. *Virology*, **247**, 1-6.
- Roberts, A., Buonocore, L., Kretchmar, E., Jonson, E. & Rose, J.K. (1999). Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J. Virol.*, **73**, 3723-3732.

Sakaguchi, T., Kiyotani, K., Watanabe, H., Huang, C., Fukuhara, N., Fujii, Y., Shimazu, Y., Sugahara, F., Nagai, Y. & Yoshida, T. (2003) Masking of the contribution of V protein to Sendai virus pathogenesis in an infection model with a highly virulent field isolate. *Virology*, **313**(2), 581-7.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanderson, C.M., McQueen N.L. & Nayak D.P. (1993). Sendai-Virus assembly: M protein binds to viral glycoproteins in transit through the secretory pathway. *J. Virol.*, **67**, 651 – 663.

Scheid, A. & Choppin, P.W. (1974). Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology*, **57**, 475-490.

Schnell, M.J., Foley, H.D., Siler, C.A., McGettigan, J.P., Dietzschold, B. & Pomerantz, R.J. (2000). Recombinant rabies virus as potential live-viral vaccines for HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (7), 3544-3549.

Schmidt, A.C., McAuliffe, J.M., Murphy, B.R. & Collins, P.L. (2001). Recombinant bovine/human Parainfluenza virus type 3 (B/h p.i.V 3) expressing the Respiratory Syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and h p.i.V 3. *J. Virol.*, **75**(10), 4594 – 4603.

Schoehn, G., Iseni, F., Mavrakis, M., Bindel, D. & Ruigrok, R. W. (2001). Structure of recombinant rabies virus nucleoprotein-RNA complex and identification of the phosphoprotein binding site. *J. Virol.*, **34**, 550-559.

Shiotani, T., Fukumara, M., Maeda, M., Hou, X., Inoue, M., Kanamori, T., Komaba, S., Washizawa, K., Fujikawa, S., Saito, K., Sakai, Y., Nagai, Y., Kanzaki, J., Hasewaga, M. (2001). Skeletal muscle regeneration after insulin-like growth factor I gene transfer by recombinant Sendai virus vector. *Gene Therapy*, **8** (14), 1043-1050.

Singh, M. & Billeter, M.A. (1999). A recombinant measles virus expressing biologically active human interleukin-12. *J. Gen. Virol.*, **80**, 101-106.

- Smallwood, S., Ryan, K.W. & Moyer, S.A. (1994). Deletion Analysis Defines a Carboxyl-Proximal Region of Sendai Virus P Protein That Binds to the Polymerase L Protein. *Virology*, **202**, 154-163.
- Stricker, R., Mottet, G. & Roux, L. (1994). The Sendai-Virus matrix protein appears to be recruited in the cytoplasm by the viral nucleocapsid to function in viral assembly and budding. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1031 – 1042.
- Strohle, A. & Germann, D. (1995). Mumpsimpfstoffe : Virologische Grundlagen. *Sozial- und Präventivmedizin*, **40**, 102-109.
- Tarbouriech, N., Curran, J., Ruigrok, R.W., Burmeister, W.P. (2000). Tetrameric coiled coil domain of Sendai virus phosphoprotein. *Nat Struct Biol.*, **7**(9), 777-81.
- Tapparel, C. & Roux, L. (1996). The efficiency of Sendai-Virus genome replication: the importance of the RNA primary sequence independent of terminal complementarity. *Virology*, **225**, 163 – 171.
- Tapparel, C., Maurice, D. & Roux, L. (1998). The activity of Sendai-Virus genomic and antigenomic promoters requires a second element past the leader template regions: a motif (GNNNNN)₃ is essential for replication. *J. Virol.* , **72**, 3117 – 3128.
- Thomas, S.M., Lamb, R.A. & Paterson, R.G. (1988). Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of paramyxovirus SV5. *Cell*, **54**, 891-902.
- Tokusumi, T., Iida, A., Hirata, T., Kato, A., Nagai, Y. & Hasewaga, M. (2002). Recombinant Sendai viruses expressing different levels of foreign reporter gene. *Virus Res.*, **86**(1-2), 33-8
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon J. (1979). Elektrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350 – 4354.
- Tropea, F., Troiano, L., Monti, D., Lovato, E., Malorni, W., Rainaldi, G., Mattana, P., Viscomi, G., Ingletti, M., Portolani, M., Cermelli, C., Cossarizza, A. & Franceschi C. (1995). Sendai-Virus and Herpes virus type 1 induce apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp cell research*, **218**, 63 – 70.

Tuckis, J., Smallwood, S., Feller, J.A., Moyer, S.A. (2002). The C-terminal 88 amino acids of the Sendai virus P protein have multiple functions separable by mutation. *J Virol.*, **76**(1):68-77.

Vidal, S. & Kolakofsky D. (1989). Modified model for the switch from Sendai-Virus transcription to replication. *J. Virol.*, **63**, 1951 – 1958.

Vidal, S., Curran, J. & Kolakofsky, D. (1990). A stuttering model of Paramyxovirus P mRNA editing. *EMBO J.*, **9**, 2017 – 2022.

Voulliemoz, D. & Roux, L. (2002). Given the opportunity, the Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase could as well enter its template internally. *J Virol.*; **76**(16), 7987-95.

Waterson, A.P. (1962). Two kinds of myxovirus. *Nature*, **48**, 1163 – 1164.

Weck, P.K., Carroll, A.R., Shattuck, D.M. & Wagner, R.R. (1979). Use of UV irradiation to identify the genetic information of VSV responsible for shutting off cellular RNA synthesis. *J. Virol.*, **30**, 746 - 753.

Weck, P.K. & Wagner, R.R. (1979). Transcription of Vesicular Stomatitis virus is required to shut off cellular RNA synthesis. *J. Virol.*, **30**, 410 – 413.

Willenbrink, W. (1991). Herstellung und Charakterisierung von Sendai Virus NP- und P-Protein exprimierender Helferzelllinien: Eine Voraussetzung für die Herstellung rekombinanter Sendai Viren. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Willenbrink, W. & Neubert, W.J. (1994). Long-Term Replication of Sendai Virus Defective Interfering Particle Nucleocapsids in Stable Helper Cell Lines. *J. Virol.*, 8413-8417.

Yamada, T., Yamaoka, S., Goto, T., Nakai, M., Tsujimoto Y. & Hatanaka, M. (1994). The human T-cell leukaemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the Bcl-2 protein. *J. Virol.*, **68**, 3374 – 3379.

Yu, D., Shioda, T., Kato, A., Hassan, M.K., Sakai, Y. & Nagai, Y. (1997). Sendai virus-based expression of HIV-1 gp120: reinforcement by the V(-) version. *Genes Cells*, **2**(7), 457-466.

Abkürzungen

AcT	Acetyl-Trypsin
Ag	Antigen
AG	Antigenome
Ak	Antikörper
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaar
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	Zytopathischer Effekt
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F-Protein	Fusions-Protein des SeV
FKS	Fötales Kälberserum
F-Stamm	Fushimi-Stamm des Sendai-Virus
g	Erdbeschleunigung
HAD-Test	Hämadsorptions-Test
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (SeV)
h p.i.	<i>hours post infection</i>
hPIV	humanes Parainfluenzaviren
kb	Kilobasen
KID-Test	Kulturinfektionsdosis-Test
L-Protein	<i>Large-Protein (SeV)</i>
LMP-Agarosegel	<i>Low Melting Point-Agarosegel</i>
M	Mol
M-Protein	Matrix-Protein
mA	Milliampere
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol

MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MVA	modifiziertes Vaccinia Virus Ankara
MVA-T7	MVA mit T7-Polymerase-Gen
μl	Mikroliter
NC	Nukleokapsid
N-Protein	Nukleoprotein (SeV)
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
P-Protein	Phosphoprotein (SeV)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
nPCR	nested PCR
pfu	plaque forming units
pH	potentium hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SeV	Sendai-Virus
SeVV	Sendai-Virus Vektor
sek	Sekunde
T _m	spezifische Hybridisierungstemperatur
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	Über Nacht
V	Volt
VP	Viruspartikel
VV	rekombinantes Vaccinia Virus
wt	Wildtyp
ZID	Zell-Infektions-Dosis-Test
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Wolfgang J. Neubert und Herrn Professor Dr. Alfons Gierl am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, in der Abteilung für Molekulare Virologie, angefertigt.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang J. Neubert für die bereitgestellten Mittel, für sein fortwährendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die vielen hilfreichen und motivierenden Gespräche.

Bei Herrn Professor Dr. Alfons Gierl möchte ich mich besonders für die Vertretung der Arbeit vor der Technischen Universität München bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. Erwin Grill möchte ich mich sehr herzlich bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, den Vorsitz bei meiner mündlichen Prüfung zu übernehmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sascha Bossow. Seine konstruktive und hilfsbereite Betreuung mit vielen Kaffee- und Zigarettenpausen haben in erheblichem Maße zur erfolgreichen Anfertigung der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Für die praktischen Ratschläge und eine optimale technische Unterstützung möchte ich mich bei Christine Baumann, Frau Dr. Tsagaan Gantumur, Herrn Dr. Martin Auer, Herrn Marian Wiegand und allen Zivis bedanken.

Den Mitarbeitern im Rechenzentrum möchte ich ebenfalls für Ihre Unterstützung danken, und mich nochmals entschuldigen, dass ich dem altersschwachen Farbdrucker letztendlich den Todesstoß verpasst habe.

Last but not least bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Karin für die immerwährende Unterstützung und bei all meinen Freunden, die mir zu allen Zeiten Rückhalt gegeben haben und mich während meiner Promotion auch mal an andere Dinge denken ließen.

Lebenslauf

Name: Sabine Schlecht
Geburtsdatum: 28.11.1975
Geburtstort: München
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982-1986 Grundschule Germering
1986-1995 Karl-Spitzweg-Gymnasium Germering
Juni 1995 Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

ab Oktober 1995 Studium der Biologie an der Technischen Universität München
November 1997 Diplom-Vorprüfungen
Mai 2000 Diplom-Hauptprüfung
Juni 1999-April 2000 Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Neubert
am Max-Planck-Institut für Biochemie,
Abteilung Molekulare Virologie, Martinsried.
Thema: Herstellung und Charakterisierung von Sendai-Virus
Mutanten mit attenuiertem Replikationsverhalten

November 2000-März 2004 Dissertationsarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Neubert
am Max-Planck-Institut für Biochemie,
Abteilung Molekulare Virologie, Martinsried.
Thema: Entwicklung eines anwendungssicheren Vakzine-Prototyps auf
Basis replikations-defizienter Sendai-Viren zur simultanen Expression
von Antigenen heterologer Viren