

Vermehrungssysteme für Gen-defiziente Sendai Viren: Herstellung und Charakterisierung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle

Martin Auer

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. B. Hock

Prüfer der Dissertation:

1. Priv. Doz. Dr. J. Adamski

2. Univ. – Prof. Dr. J. Bauer

Die Dissertation wurde am 14.07.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 05.09.2003 angenommen.

Erklärung:

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München vorgelegte
Dissertationsarbeit mit dem Titel:

Vermehrungssysteme für Gen-defiziente Sendai Viren: Herstellung und Charakterisierung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle,

angefertigt am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Neubert (MPI für Biochemie, Martinsried) und Herrn PD Dr. Jerzy Adamski (GSF, Neuherberg) ohne sonstige Hilfe 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.

Die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München hat der Veröffentlichung zugestimmt.

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.

München, den 08.07.2003

Unterschrift:

INHALTSANGABE

1	ZUSAMMENFASSUNG DES PROJEKTS	11
2	EINLEITUNG	15
2.1	Das Sendai Virus	16
2.1.1	Wissenschaftliche und medizinische Bedeutung der Paramyxoviren	17
2.1.2	Morphologie und Aufbau des Sendai Virus	18
2.1.3	Die Oberflächenproteine	19
2.1.3.1	Das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN-Protein)	19
2.1.3.2	Das Fusions-Protein (F-Protein)	20
2.1.4	Das Nukleokapsid und der Genomaufbau	21
2.1.5	Der Replikationszyklus des Sendai Virus	22
2.2	Das Sendai Virus als Gentransfervektor	24
2.3	Das Sendai Virus als Gentransfervektor in der leberspezifischen Gentherapie	25
2.4	Die Leber als Zielorgan für gentherapeutische Ansätze und der Asialoglykoproteinrezeptor	26
2.5	HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzellen: Ausgangssituation und Zielsetzung	28
2.6	HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzellen: Problempunkte, zu erwartende Schwierigkeiten und Skizzierung des Lösungsweges	33
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Theoretische Vorüberlegungen	38
3.1.1	Auswahl einer geeigneten Basiszelllinie zur Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle	39
3.1.2	Systeme für die induzierbare Expression von Transgenen in Säugerzellen	39
3.1.2.1	Das GeneSwitch™-System zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen	40

3.1.2.2	Das TREx™-System zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen	43
3.1.2.3	Das Cre/ loxP-System zur regulierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen	45
3.2	Praktische Vorarbeiten	47
3.2.1	Herstellung von Plasmiden und DNA-Konstrukten	47
3.2.1.1	Herstellung des Expressionskonstrukts pGene/V5-His-A-HN für das GeneSwitch™-System	47
3.2.1.2	Herstellung der Expressionskonstrukte für das TREx™-System	49
3.2.1.2.1	Herstellung des Expressionskonstrukts pcDNA5/TO-HN für das TREx™-System	49
3.2.1.2.2	Herstellung der beiden Expressionskonstrukte pcDNA5/TO-HN-1xP und pcDNA5/TO-HN-2xP für das TREx™-System	50
3.2.1.3	Herstellung der Expressionskonstrukte und DNA-Konstrukte für das Cre/ loxP-System	52
3.2.1.3.1	Herstellung des Klonierungsplasmids pDP für Zwischenklonierungen	53
3.2.1.3.2	Herstellung einer von zwei loxP-Sequenzen flankierten Transkriptionsstopkassette für den Einsatz im Cre/ loxP-System	54
3.2.1.3.3	Einbau der von zwei loxP-Sequenzen flankierten Transkriptionsstopkassette aus dem Plasmid pDP-PF49-4xPA in den Expressionsvektor pcDI18-HN	59
3.2.1.3.4	Herstellung des induzierbaren Expressionsplasmids pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP für das Cre/ loxP-System	60
3.2.1.3.5	Herstellung des Konstrukts pcDI18-eGFP	62
3.2.1.3.6	Herstellung des induzierbaren Expressionsplasmids pGene/V5-His-A-Cre für das GeneSwitch™-System	63
3.2.1.3.7	Herstellung des induzierbaren Expressionsplasmids pcDNA5/TO-Cre für das TREx™-System	65
3.2.1.4	Herstellung der HN-Protein Mutante HN ^{41/6A} für den Einsatz bei der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle	66
3.2.2	Optimierung der Transfektionsmethodik	69
3.2.3	Letalitätsbestimmung der verwendeten Antibiotika für verschiedene Zelltypen	71

3.2.4	Transiente und stabile Transfektion von Säugerzellen und Herstellung stabil transfizierter, monoklonaler Zelllinien	73
3.2.5	Herstellung und Charakterisierung der stabil transfizierten, konstitutiv HN-Protein exprimierenden Zelllinie CHO-pcDI18-HN	75
3.2.6	Herstellung und Vermehrung rekombinanter Sendai Viren	77
3.3	Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden Helferzelllinie	82
3.3.1	Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle auf Basis des GeneSwitch™-Systems	83
3.3.1.1	Bestimmung der Basisexpression des GeneSwitch™-Systems	83
3.3.1.2	Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender Helferzellen auf Basis des GeneSwitch™-Systems	84
3.3.1.3	Zusammenfassung der Versuche zur Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden Helferzelle auf Basis des GeneSwitch™-Systems	91
3.3.2	Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle auf Basis eines Tetrazyklin-abhängigen Systems	92
3.3.2.1	Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender CHO-TREx™-Zellen ohne Modifikation des hCMV-Promotors	93
3.3.2.2	Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender CHO-TREx™-Zellen nach Modifikation des hCMV-Promotors mit dem Verstärkerelement Intron A	95
3.3.3	Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden Helferzelle auf Basis des TREx™-Systems: Zusammenfassung der Ergebnisse	101
3.3.4	Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle auf Basis des Cre/ loxP-Systems	102
3.3.4.1	Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Adeno-Cre-Virus	105
3.3.4.2	Expression des eGFP-Proteins in CHO-Zellen: Induktion durch ein kotransfiziertes induzierbares Cre-Rekombinase Expressionsplasmid	106

3.3.4.3	Versuche zur Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender Helferzellen auf Basis des Cre/ loxP-Systems: Zusammenfassung der Ergebnisse	108
3.3.5	Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle auf Basis der Neuraminidase-reduzierten HN-Mutante HN ^{41/6A}	109
3.3.5.1.1	Vergleich der Hämagglutinationsaktivität des HN ^{41/6A} -Proteins und des nicht mutierten HN-Proteins	110
3.3.5.2	Herstellung und Charakterisierung stabil transfizierter, monoklonaler, konstitutiv HN ^{41/6A} -Protein exprimierender Helferzellen	112
3.3.5.3	Einsatz der HN ^{41/6A} -Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Zellklone für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren	116
3.3.5.4	Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle mit Hilfe des HN ^{41/6A} -Proteins: Zusammenfassung der Ergebnisse	118
4	DISKUSSION	119
5	MATERIAL UND METHODEN	139
5.1	Molekularbiologische Methoden	139
5.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	139
5.1.2	Hybridisierung von komplementären Einzelstrang-DNA-Oligonukleotiden zu Doppelstrang-DNA-Fragmenten	139
5.1.3	Sequenzierung	140
5.1.4	Aufreinigung von DNA, Gelextraktion, Restriktionsverdau, Ligation und Klonierung	140
5.1.5	Herstellung chemisch kompetenter Zellen (<i>E. coli</i> XL-1)	141
5.1.6	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen, Picken von Klonen, Animpfen von Mini-Kulturen und Überführung in Maxi-Kulturen	141
5.1.7	Liste der verwendeten Kits zur DNA-Bearbeitung	142
5.1.8	Liste der verwendeten Nukleinsäuren und Plasmide	142
5.2	Expressionssysteme für die Expression von Transgenen in Säugerzellen	143
5.2.1	Das GeneSwitch TM -System	143

5.2.2	Das TREx™-System	143
5.2.3	Induzierbare Expression von Transgenen in Säugerzellen mit Hilfe des Cre/ loxP-Systems	144
5.2.3.1	Das Cre-loxP-System	144
5.2.3.2	Das Adeno-Cre Virus	144
5.3	Zellkulturmethoden	145
5.3.1	Allgemeine Zellkultur	145
5.3.2	Verwendete Zelllinien	145
5.3.3	Zellzählung	146
5.3.4	Kryokonservierung von Zellen	146
5.3.5	Transfektionsmethoden	147
5.3.5.1	Lipofektion	147
5.3.5.2	Calciumphosphatpräzipitation	147
5.4	Proteinchemische Methoden	147
5.4.1	Herstellung von Zellextrakten (Gesamtprotein)	147
5.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	148
5.4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	148
5.4.4	Westernblot – Transfer der Proteine auf eine Membran	148
5.4.5	Immunologischer Nachweis der Proteine auf der Membran	149
5.4.6	Nachweis der β -Galaktosidase-Expression in Zellen	149
5.5	Virologische Methoden	150
5.5.1	Herstellung rekombinanter Sendai Viren	150
5.5.1.1	Das MVA-T7-Virus	150
5.5.1.1.1	Passagierung und Vermehrung des MVA-T7-Virus	150
5.5.1.1.2	Titerbestimmung des MVA-T7-Virus	151
5.5.1.2	Die pRS-cDNA bei der Herstellung rekombinanter Sendai Viren	151
5.5.1.3	Die Herstellung rekombinanter Sendai Viren	151
5.5.2	Hämaadsorptionstest (HAD-Test)	152
5.6	Liste der verwendeten Chemikalien, Substanzen und Lösungsmittel	153
5.7	Liste der verwendeten Enzyme	154

5.8	Liste der verwendeten Geräte	154
5.9	Liste der verwendeten Antibiotika	155
5.10	Zellkulturmedien und Seren	156
5.11	Verbrauchsmaterial	156
5.12	Sicherheitsbestimmungen	156
5.13	Liste der verwendeten Lösungen und Puffersubstanzen	157
5.14	Sequenzen von Primern und Oligonukleotiden	158
6	LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	160
7	LITERATURLISTE	161
8	DANKSAGUNG	171

1 ZUSAMMENFASSUNG DES PROJEKTS

Sendai Viren (SeV) besitzen ein nur sehr geringes humanpathogenes Potenzial, können auch nicht-proliferierende Zellen infizieren und integrieren nicht ins zelluläre Genom. Rekombinante SeV stellen daher ein vielversprechendes System für den *in vivo*-Gentransfer dar. Zudem können HN-defiziente SeV durch die Wechselwirkung zwischen dem F-Protein und dem Asialoglykoproteinrezeptor Leberzellen infizieren und eignen sich daher als gentherapeutisches Vektorsystem für den spezifischen Transfer von Nukleinsäuren in Leberzellen.

Während die initiale Herstellung HN-defizienter SeV mit Hilfe eines zellgestützten Systems ohne Probleme möglich ist, bereitet die für den weiteren experimentellen Einsatz dieser Viren notwendige Vermehrung aufgrund des fehlenden HN-Proteins Schwierigkeiten: Bis heute wurde keine Vorgehensweise für die Vermehrung HN-defizienter SeV beschrieben.

Zur Lösung dieser Problematik sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein zelluläres Hilfssystem etabliert werden: Das HN-Protein sollte für die Vermehrung HN-defizienter SeV in aufeinanderfolgenden Viruspassagen auf Zellen von diesen Helferzellen in ausreichender Menge *in trans* zur Verfügung gestellt werden können. Zu berücksichtigen war dabei, daß für eine effektive Rezeptorbindung des HN-Proteins eine ausreichend hohe Menge an HN-Protein in der Membran nötig ist, zugleich aber die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins bei konstitutiver Expression auf der Zelloberfläche die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus zerstören und so eine Infektion der Zellen im Rahmen der Vermehrungspassagen unmöglich machen würde. Die Schwierigkeit bei der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle würde also darin bestehen, die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins durch eine regulierbare Expression oder durch Verwendung eines modifizierten HN-Proteins vor der Infektion so weit zu reduzieren, daß die zellulären Rezeptoren für das SeV nicht zerstört werden und damit die Infizierbarkeit der Zellen erhalten bleibt, zugleich aber ein für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hoher HN-Protein Expressionslevel erreicht werden kann. Zusätzlich muß die Neuraminidaseaktivität nach Ablauf des Replikationszyklus für eine Loslösung der Sendai Viren von der Zelle ausreichend hoch sein. Eine stabil transfizierte Zelllinie ist dabei aus Gründen der Replikationseffektivität unbedingt erforderlich: Nur so könnte gewährleistet werden, daß alle Zellen der Population zu einer Transkomplementation des HN-Proteins in der Lage sind und zur Vermehrung der HN-defizienten SeV beitragen können.

Eine sehr wichtige Eigenschaft der Helferzelle ist die Aufrechterhaltung der Infizierbarkeit, die durch Absenkung der Neuraminidaseaktivität erreicht werden sollte. Zur Erfüllung dieser Vorgabe wurde aus allen kommerziell angebotenen induzierbaren Expressionssystemen das GeneSwitch™-System ausgewählt, das sich durch eine sehr niedrige Basisexpression auszeichnet; so sollte eine für die Erhaltung der Infizierbarkeit dieser Zellen ausreichende Absenkung der Neuraminidaseaktivität im uninduzierten Zustand sichergestellt werden können. Es konnte eine Vielzahl

stabiler Transfektanten selektioniert werden. Allerdings stellte sich bei der biologischen Charakterisierung der selektionierten Zellen heraus, daß der schwache Promotor des GeneSwitch™-Systems offenbar nicht in der Lage ist, einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hohen HN-Protein Expressionslevel zu gewährleisten. Auch nach Erhöhung der Menge des HN-Expressionsplasmids bei der Transfektion konnte bei Analyse einer sehr großen Zahl stabiler Transfektanten kein einziger Zellklon identifiziert werden, dessen HN-Protein Expressionslevel für eine effektive HN-Protein Transkomplementation und die Entstehung infektiöser Sendai Viren ausreichend hoch gewesen wäre.

Da an der Promotorstärke des GeneSwitch™-Systems nur unter sehr hohem Aufwand Modifikationen vorgenommen werden könnten, wurde zur Fortführung des Projekts das TREx™-System ausgewählt, um auch nach stabiler Transfektion einen für die Entstehung infektiöser Sendai Virus Partikel ausreichend hohen HN-Protein Expressionslevel zu erreichen. Das TREx™-System ist ein Tetrazyklin-abhängiges induzierbares Expressionssystem auf Basis des hCMV-Promotors. Nach Verdoppelung der Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren in diesem Promotor und Modifikation mit dem Verstärkerelement Intron A konnte eine Reihe stabiler Transfektanten mit ausreichend hohem HN-Protein Expressionslevel im induzierten Zustand selektioniert werden. Diese Zelllinien zeigten zugleich aber auch eine sehr hohe HN-Protein Basisexpression. Aufgrund der damit verbundenen Neuraminidaseaktivität waren diese Zellen nicht durch das Sendai Virus infizierbar und somit als Helferzellen für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren unbrauchbar. Eine für die Absenkung der Neuraminidaseaktivität und Aufrechterhaltung der Infizierbarkeit der Zellen ausreichend geringe Basisexpression des TREx™-Systems konnte auch nach Einsatz eines speziellen Tetrazyklin-freien fötalen Kälberserums und Überprüfung einer sehr großen Zahl stabil transfizierter Zellklone nicht erreicht werden.

Um ein induzierbares Expressionssystem zu erhalten, das sowohl die für die Aufrechterhaltung der Infizierbarkeit sehr geringe HN-Protein Basisexpression, als auch die für die Entstehung infektiöser SeV erforderliche HN-Protein Expressionsstärke bietet, wurde ein induzierbares Expressionssystem auf Basis des Cre/ loxP-Systems nun doch völlig neu entwickelt. Dabei sollte ein für diesen Zweck bereits bewährtes, sehr starkes Promotorkonstrukt (hCMV-Promotor + Intron A) einen ausreichenden HN-Protein Expressionslevel gewährleisten. Die Absenkung der Neuraminidaseaktivität im uninduzierten Zustand sollte durch Einbau einer effektiven Transkriptionsstopkassette in das Expressionskonstrukt erreicht werden. Diese Transkriptionsstopkassette ist von zwei loxP-Sequenzen flankiert und sollte somit durch die Cre-Rekombinase entfernt werden können. Die Funktionalität dieses induzierbaren Expressionsmechanismus konnte nach transienter Transfektion gezeigt werden. Die Transkriptionsstopkassette wurde dabei durch eine von einem kotransfizierten induzierbaren Expressionsplasmid (GeneSwitch™-, bzw. TREx™-System) exprimierte Cre-Rekombinase ausgeschnitten. Nach Selektion der Zellen auf stabile Transfektanten war jedoch keine HN-Protein Expression detektierbar. Möglicherweise war die Aktivität der Cre-Rekombinase bei diesem Versuchsaufbau nicht in der Lage, die Transkriptionsstopkassetten

aller ins Genom eingebauten Expressionskonstrukte zu entfernen, so daß die Expression des HN-Proteins unter der Nachweisgrenze blieb.

Somit war es nicht möglich, ein induzierbares Expressionssystem einzusetzen, das einen HN-Protein Expressionslevel bietet, dessen Höhe für die Entstehung infektiöser Nachkommenviren ausreichte und das gleichzeitig in der Lage gewesen wäre, die HN-Protein Basisexpression so niedrig zu halten, daß die Restaktivität der Neuraminidasefunktion eine Infizierbarkeit der Zellen noch zuläßt. Daher sollte als neuer und völlig anderer Weg ein modifiziertes HN-Protein mit reduzierter Neuraminidaseaktivität verwendet werden. Die ausgewählte Proteinvariante trägt die Bezeichnung HN^{41/6A} und besitzt eine um 80 % reduzierte Neuraminidaseaktivität. Dieses Protein sollte mit dem sehr starken, bereits bewährten Promotorkonstrukt hCMV + Intron A zu hohem Level in der Zellmembran exprimiert werden. Dabei sollte die verbleibende Neuraminidaseaktivität zusätzlich mit einem durch ein Lipofektionsreagenz modifizierten Neuraminidaseinhibitor temporär für den Zeitraum der Infektion weiter abgesenkt werden, so daß eine Infektion dieser Zellen durch das SeV ermöglicht wird. Durch die Verpackung in Liposomen sollte die Membrangängigkeit der Substanz erzielt werden können, so daß die Inhibierung der Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins bereits während der Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat erfolgen könnte. Auf diese Weise konnten stabil transfizierte, HN^{41/6A}-Protein exprimierende, durch das SeV infizierbare Zellen generiert werden. Gleichzeitig zeigten diese Zellen ein positives HAD-Signal. Diese Zellen erfüllten also die Anforderungen, die an eine Helferszelle für die Vermehrung HN-defizienter SeV zu stellen sind: Der HN^{41/6A}-Protein Expressionslevel sollte für die Herstellung infektiöser SeV ausreichend hoch sein, während gleichzeitig die Neuraminidaseaktivität des HN^{41/6A}-Proteins durch die Modifikation und den zusätzlich temporär applizierten Neuraminidaseinhibitor so weit reduziert werden konnte, daß eine Infektion dieser Zellen durch das SeV möglich ist.

Im Rahmen wiederholter Versuche zeigte sich beim Einsatz dieser Zellen für die Vermehrung HN-defizienter SeV dann jedoch, daß diese Zellen nicht in der Lage sind, das HN-Protein für die Vermehrung von HN-defizienten SeV in geeigneter Weise zur Verfügung zu stellen. Es konnte keine Vermehrung der initial hergestellten HN-defizienten Sendai Viren beobachtet werden, obwohl die Freisetzung der Sendai Viren von der Zelle durch den Neuraminidaseinhibitor aufgrund dessen kurzer Halbwertszeit (wenige Stunden) nicht behindert werden dürfte. Es muß also noch bisher unbekannt Parameter geben, die für eine effektive zelluläre Transkomplementation des HN-Proteins bei der Vermehrung HN-defizienter SeV auf Helferszellen ein Rolle spielen. Möglicherweise reicht die zelluläre Expression des HN-Proteins nicht aus und es bedarf zur Entstehung funktioneller *budding*-Strukturen des simultanen Vorhandenseins des F-, des M- oder beider Proteine. Womöglich kann die korrekte Faltung des HN-Proteins während der Prozessierung aber auch nur bei gleichzeitiger Präsenz des F-Proteins erfolgen.

In dieser Arbeit wurden erstmals Zellen beschrieben, die bezüglich der HN-Protein Expression die Eigenschaften in sich vereinen, die von einer Helferszelle zur Vermehrung HN-defizienter

SeV zu fordern sind: Die Zellen sind in der Lage, einen für die Herstellung infektiöser Nachkommenviren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel zu erreichen und sind trotzdem in ihrer Neuraminidaseaktivität so weit abgesenkt, daß eine Infektion dieser Zellen durch das SeV ermöglicht wird. Diese Zellen erfüllen bereits zwei wesentliche Anforderungen und werden nach Identifizierung zusätzlicher Parameter und weiteren Optimierungen die Grundlage für die Etablierung eines zellgestützten Hilfssystems für die Vermehrung HN-defizienter SeV bilden.

2 EINLEITUNG

Die Gentherapie stellt für viele Krankheitsbilder einen vielversprechenden Heilungsansatz dar. Dabei soll versucht werden, die Funktion eines defekten Gens durch Einbringen der korrekten genetischen Information in die Zelle zu ersetzen oder zu unterstützen. Für den Erfolg eines *in vivo*-Gentransfers sind die Eigenschaften des verwendeten Vektorsystems von entscheidender Bedeutung. Beim Einsatz von Viren als Gentransfervektoren müssen diese so modifiziert werden, daß sie die genetische Information für ein therapeutisches Transgen zellspezifisch in die Zielzelle einbringen können. Unter der Vielzahl heute beforschter und untersuchter viraler Vektorsysteme weist das Sendai Virus einige vorteilhafte Eigenschaften auf und es kann über die Wechselwirkung des F-Proteins mit dem Asialoglykoproteinrezeptor, der auf Leberzellen exprimiert wird, spezifisch Leberzellen infizieren. Die Leber als größtes endokrines Drüsenorgan des Körpers stellt aufgrund ihrer zentralen Stellung im Intermediär- und Energiestoffwechsel und ihrer vielfältigen metabolischen Aufgaben einen sehr attraktiven Angriffspunkt für gentherapeutische Ansätze dar. HN-defiziente Sendai Viren stellen somit ein vielversprechendes Gentransfersystem für die leberspezifische Gentherapie dar.

Diese Leberzellspezifität ist aber nur für HN-defiziente Sendai Viren gegeben. Ihnen fehlt das virale HN-Protein, das für den Zelleintritt über den klassischen zellulären Rezeptor verantwortlich ist. Während die initiale Herstellung dieser HN-defizienten Sendai Viren ohne Probleme möglich ist, wirft die Virusproduktion zu anwendbaren Mengen Schwierigkeiten auf, da die HN-defizienten Sendai Viren aufgrund des fehlenden Bindeproteins zur Durchführung des klassischen Infektionsweges nicht in der Lage sind.

Zur Lösung dieses Problems sollte im Rahmen dieser Arbeit eine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helfierzelle entwickelt werden. Die Schwierigkeit würde dabei in der Vereinigung dieser beiden Anforderungen liegen: Während die Neuraminidaseaktivität aufgrund ihrer rezeptorzerstörenden Funktion für die Infektion nicht vorhanden sein darf, nach Ablauf des Infektionszyklus für die Loslösung der Sendai Viren von der Zelle aber vorhanden sein muß, ist für die Herstellung infektiöser Sendai Viren im Rahmen des viralen Replikationszyklus ein ausreichend hoher HN-Protein Expressionslevel nötig.

2.1 Das Sendai Virus

Das Sendai Virus wurde erstmals im Jahre 1952 an der Universität von Sendai in Japan von Kuroya und seinen Mitarbeitern isoliert, als sie Mäuse mit Proben eines an Pneumonie verstorbenen Kindes infizierten (Kuroya *et al.*, 1953). Da der Erreger aus einer humanen Quelle stammte, wurde das Virus zuerst als humanpathogen angesehen. Erst später stellte sich heraus, daß das Sendai Virus eigentlich Mäuse infiziert und sich nur selten als opportunistischer Krankheitserreger während einer Lungenentzündung beim Menschen findet (Modrow & Falke, 1998). Der erste isolierte Sendai Virus Stamm erhielt die Bezeichnung "D52", da es damals in die Gruppe der Myxoviren Typ D eingeteilt wurde (Jensen *et al.*, 1955). Erst 1962 wurden die Myxoviren aufgrund der damals entdeckten morphologischen Unterschiede in die beiden Genera Ortho- und Paramyxoviren unterteilt (Waterson, 1962).

Die Familie der *Paramyxoviridae*, in die auch das Sendai Virus gehört, wird zusammen mit den Familien der *Rhabdo-*, der *Filo-* und der erst in jüngerer Zeit charakterisierten *Bornaviridae* in der Ordnung der *Mononegavirales* zusammengefaßt. Alle Mitglieder dieser Ordnung besitzen ein einzelsträngiges, kontinuierliches RNA-Genom.

<u>Unterfamilie</u>	<u>Genus</u>	<u>Vertreter</u>
<u>Paramyxovirinae</u>	Respirovirus	Sendai Virus humanes Parainfluenza Virus Typ 1 und 3
	Rubulavirus	Mumps Virus Newcastle Disease Virus (NDV) humanes Parainfluenza Virus Typ 2, 4a und 4b
	Morbillivirus	Masern Virus
<u>Pneumovirinae</u>	Pneumovirus	humanes Respiratorisches Syncytial Virus
	Metapneumovirus	Avian Pneumovirus

Abbildung 2.1: Unterteilung der Familie der *Paramyxoviridae* (Fields, 2001)

Die Familie der *Paramyxoviridae* wurde im Jahr 2000 vom *International Committee on the Taxonomy of Viruses* in die zwei Subfamilien der *Paramyxovirinae* und der *Pneumovirinae* eingeteilt. Die *Paramyxovirinae* wiederum untergliedern sich in die drei Genera Respirovirus (zu denen auch das Sendai Virus gehört), Rubulavirus und Morbillivirus. Zu den *Pneumovirinae* gehören die beiden Genera Pneumovirus und Metapneumovirus (siehe Abbildung 2.1). Die Klassifizierung beruht auf morphologischen Kriterien, der Genomorganisation, den bio-

logischen Aktivitäten der Proteine und den Sequenzhomologien der kodierten Proteine (Fields, 2001).

2.1.1 Wissenschaftliche und medizinische Bedeutung der Paramyxoviren

Das Sendai Virus stellt ein natürlich vorkommendes Pathogen bei Mäusen dar und konnte sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten als bedeutsames Arbeitsmodell für Paramyxoviren etablieren. So ist es seit 1998 möglich, rekombinante Sendai Viren in Zellkultur unter ausschließlicher Verwendung von entsprechender cDNA herzustellen (Leyrer *et al.*, 1998 b). Seitdem können Mutationen an beliebigen Stellen im Genom des Sendai Virus eingefügt und deren Auswirkungen untersucht werden (Nagai, 1999). Außerdem ermöglichte dieser Durchbruch die Herstellung von rekombinanten Sendai Viren, die für bestimmte Gene defizient sind (Leyrer *et al.*, 1998 a). Bei der Vermehrung solcher defizienten Sendai Viren ist man auf Helferzellen angewiesen, die die entsprechenden Genprodukte *in trans* zur Verfügung stellen.

Paramyxoviren sind weltweit verbreitet und stellen eine der Hauptursachen respiratorischer Infektionskrankheiten bei Kindern und Erwachsenen dar (Canchola *et al.*, 1965; Glezen *et al.*, 1971). Bei Erwachsenen zeigen die Infektionen häufig milde oder asymptomatische Krankheitsverläufe. Die Infektionen treten bevorzugt epidemisch in den Wintermonaten auf und zeichnen sich durch leichte bis lebensbedrohende grippale Infekte mit Fieber und Schnupfen aus.

Das Mumpsvirus (Genus Rubulavirus) kommt nur beim Menschen vor. Es verursacht die bekannte Kinderkrankheit Mumps und ist verantwortlich für epidemische Mumpserkrankungen, die vor allem im Winter und Frühjahr im Abstand von zwei bis sieben Jahren auftreten (Modrow & Falke, 1998). Das Mumpsvirus kann sich in Zellen des zentralen Nervensystems vermehren und dort auch Krankheiten wie Meningoenzephalitis oder Meningitis verursachen (Fields, 2001).

Auch das Masernvirus (Genus Morbillivirus) besitzt kein Reservoir außerhalb des Menschen. Es verursacht eine schwere, hochfieberhafte Erkrankung, bei der es nur selten asymptomatische oder subklinische Verläufe gibt (Fields, 2001). Eine Masernvirusinfektion kann mit verschiedenen Komplikationen wie Pneumonie, Bronchopneumonie oder Mittelohrentzündung einhergehen. Außerdem gibt es einige bekannte Spätfolgen einer masernviralen Infektion, die das Nervensystem betreffen und teilweise sehr gefährliche Krankheiten darstellen, wie beispielsweise die Autoimmunenzephalitis oder die subakute sklerotisierende Panenzephalitis (SSPE) (Modrow & Falke, 1998). Desweiteren wird die Beteiligung des Masernvirus

an diversen Knochenkrankheiten wie Otosklerose oder Paget's Disease diskutiert (Reddy *et al.*, 2001; Ralston & Helfrich, 1999; Mee, 1999).

2.1.2 Morphologie und Aufbau des Sendai Virus

Die infektiösen Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 150 bis 250 nm und sind von einer von der Wirtszelle stammenden Membran umgeben (Klenk & Choppin, 1969; Klenk & Choppin, 1970). Die beiden in diese Membran eingelagerten viralen Glykoproteine sind über ihre cytoplasmatischen Domänen verbunden mit einer Matrixschicht aus M-Proteinen, die unter der Membran liegt und das virale Nukleokapsid enthält. Das Nukleokapsid besteht aus N-, P- und L-Proteinen, die mit dem einzelsträngigen RNA-Genom zu einem helikal angeordneten Nukleoproteinkomplex aggregiert vorliegen (Calain & Roux, 1993). In die virale Hüllmembran sind zwei Typen viraler Oberflächenproteine eingelagert, das HN- und das F-Protein (Modrow & Falke, 1998). Diese Oberflächenproteine sind in der Zellmembran in sogenannten Clustern angeordnet und miteinander assoziiert; das bedeutet, daß die F- und HN-Proteine in der Zellmembran in distinkten Bereichen konzentriert vorliegen und miteinander und mit dem M-Protein der Matrixschicht verbunden sind. Bei der Entstehung dieser distinkten Cluster in der Zellmembran werden zelluläre Proteine durch einen nicht vollständig verstandenen Mechanismus ausgeschlossen (Fields, 2001).

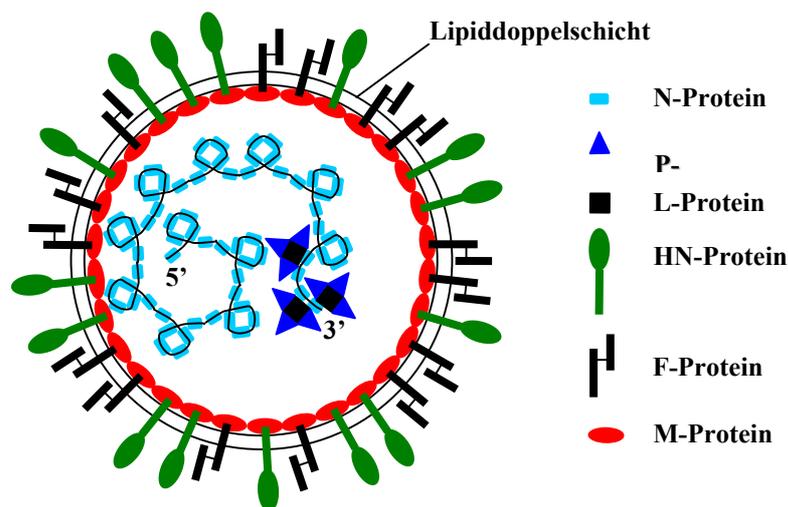


Abbildung 2.2: Morphologie des Sendai Virus

Die Matrixschicht setzt sich aus M-Proteinen zusammen, wobei die M-Proteine mit der Membranhülle assoziiert sind. Das M-Protein interagiert sowohl mit den im Cytoplasma lokalisierten Domänen der beiden Membranproteine HN und F, als auch mit dem N-Protein des Nukleokapsids (siehe Abbildung 2.2). Das M-Protein kann über diese Interaktionen die notwendigen räumlichen Ereignisse bei der Partikelbildung koordinieren und gilt daher als zentraler Organisator der Morphogenese (Ali *et al.*, 2000; Mottet *et al.*, 1999; Stricker *et al.*, 1994; Sanderson *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1976).

2.1.3 Die Oberflächenproteine

Das Sendai Virus besitzt zwei Typen membranständiger Oberflächenproteine. Beide sollen in Aufbau und Funktion kurz erläutert werden.

2.1.3.1 Das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN-Protein)

Das HN-Protein besteht aus 576 Aminosäuren, von denen die ersten 35 aminoterminalen Reste die cytoplasmatische Domäne darstellen. Dieser folgt eine Membran-Anker-Domäne aus 23 Aminosäuren und eine Ektodomäne aus 518 Aminosäuren mit 14 potentiellen Glykosylierungsstellen für N-gebundene Glykosylierung (Kawano *et al.*, 1990), die teilweise genutzt werden (Fouillot-Coriou & Roux, 2000). Das Protein besitzt drei Funktionen: Es vermittelt die Bindung an den zellulären sialinsäurehaltigen Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszellen, es kann Erythrocyten agglutinieren (Hämagglutination) und es weist eine Neuraminidasefunktion auf (Scheid *et al.*, 1972; Scheid & Choppin, 1973; Tozawa *et al.*, 1973). Desweiteren sind auf dem HN-Protein immunogene Epitope für die Antikörperbindung lokalisiert.

Das Sendai Virus nutzt endständige Neuramin-(=Sialin)-säurereste auf zellulären Oberflächenproteinen und Lipiden als Rezeptoren. Die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins spaltet diese endständigen Neuraminsäuren von komplexen Kohlenhydraten ab. Dieser rezeptorstörenden Funktion kommt eine sehr wichtige Rolle bei der Freisetzung der Viruspartikel zu. So wird gewährleistet, daß während des Prozesses der Virusfreisetzung die Viren nicht an noch vorhandenen zellulären Rezeptoren haftenbleiben und sich so von der Zelle lösen können. Außerdem wird durch diesen Mechanismus eine Wiederinfektion schon befallener Zellen verhindert (Superinfektionsschutz) (Fields, 2001). Das HN-Protein liegt in der Membran vorwiegend als Homotetramer vor (Modrow & Falke, 1998).

2.1.3.2 Das Fusions-Protein (F-Protein)

Das Fusionsprotein (566 AS) liegt in der Membran als Heterodimer aus einem F₁- und einem F₂-Anteil vor. Es ist (N-glykosidisch) glykosyliert und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 60-65 kDa (Modrow & Falke, 1998). Es induziert nach HN-Protein vermittelter Adsorption der Viruspartikel an die zellulären Rezeptoren die Fusion der viralen mit der zellulären Membran, so daß das virale Nukleokapsid ins Cytoplasma entlassen werden kann. Das F-Protein wird als Vorläuferprotein F₀ synthetisiert und muß zur Entfaltung seiner enzymatischen Wirkung durch eine proteolytische Spaltung aktiviert werden (Ohuchi & Homma, 1976). Diese Prozessierung des Vorläuferproteins F₀ in den aminoterminalen Anteil F₂ und den carboxyterminalen Anteil F₁ erfolgt während des Transports zur Zellmembran durch eine im Golgi-Bereich lokalisierte zelluläre Protease mit der Bezeichnung Tryptase Clara (Klenk & Garten, 1994; Tashiro *et al.*, 1999). Diese trypsinähnliche Protease wird von den Clara-Zellen im Epithel des Respirationstraktes exprimiert. Der Zelltropismus des Sendai Virus ist also nicht nur vom Vorhandensein des Rezeptors, sondern zugleich von der Verfügbarkeit einer geeigneten Protease abhängig (Mochizuki *et al.*, 1988; Tashiro *et al.*, 1999). Die Spaltstelle liegt zwischen einem Abschnitt basischer Aminosäuren und einer hydrophoben Domäne, die nach der Spaltung exponiert wird und die Membranfusion induziert. Nach der Spaltung bleibt der F₁-Anteil mit der aminoterminalen F₂-Domäne durch eine Disulfidbrücke verbunden (Fields, 2001). Das F-Protein liegt in der Membran vorwiegend als Oligomer vor (meist als Tetramer) (Gorman *et al.*, 1988; Blumberg *et al.*, 1985 a, b).

Neben der zur Aktivierung notwendigen proteolytischen Spaltung des F-Proteins in die Bestandteile F₁ und F₂ durch eine zelluläre Protease im *trans*-Golgi-Netzwerk wird das F-Protein glykosyliert. Es besitzt sechs Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/ Thr) (Bagai & Lamb, 1995 a, b), die durch N-gebundene komplexe Glykosylierung genutzt werden (Morrison & Simpson, 1980; Nakamura *et al.*, 1982; Herrler & Compans, 1982; Lambert, 1988). Die Strukturen der N-gebundenen Oligosaccharide innerhalb des F-Proteins können varriieren, entsprechen aber stets der durch den Asialoglykoproteinrezeptor erkennbaren Form mit terminalen Galaktosylresten (Yoshima *et al.*, 1980). Ob ein Zusammenhang zwischen einer bestimmten Oligosaccharidstruktur und der Lokalisierung im F-Protein besteht, ist bisher nicht geklärt (Yoshima *et al.*, 1981).

2.1.4 Das Nukleokapsid und der Genomaufbau

Das Genom des Sendai Virus hat eine Länge von 15384 Nukleotiden und liegt verpackt als Nukleokapsid vor, wobei ein N-Protein jeweils sechs Nukleotide bedeckt (*rule of six*) (Calain & Roux, 1993; Vulliemoz & Roux, 2001; Pelet *et al.*, 1996). Das Nukleokapsid stellt eine linksgängige Helix dar, die einen Durchmesser von etwa 15 nm hat und einen Hohlzylinder von 5 nm aufweist (Calain & Roux, 1993). Das N-Protein schützt das Genom vor mechanischer und enzymatischer Belastung, interagiert mit dem M-Protein der Matrixschicht und es vermittelt in Wechselwirkung mit den assoziierten P- und L-Proteinen die Transkription und Translation (Fields, 2001).

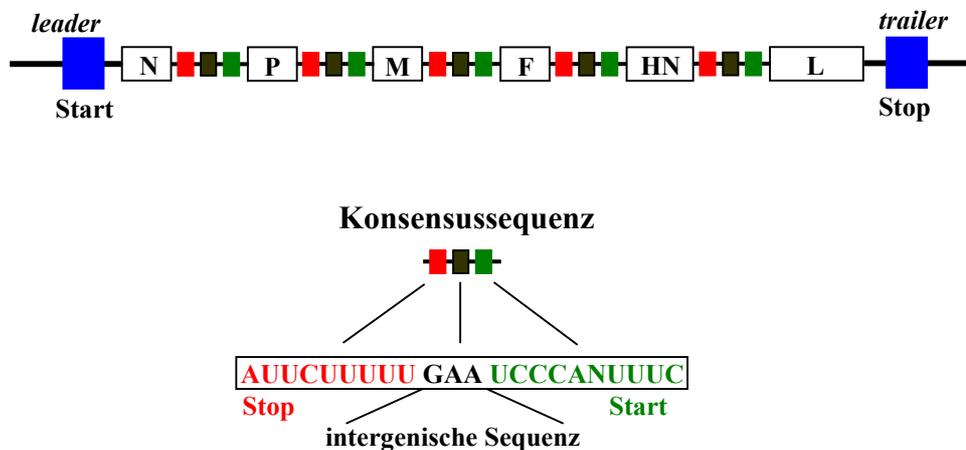


Abbildung 2.3: Genomaufbau des Sendai Virus

Das Genom des Sendai Virus besteht aus einzelsträngiger RNA in Negativstrangorientierung. Die virale genomische RNA kann also nicht direkt als mRNA verwendet werden. Um die initiale Transkription zu ermöglichen, müssen daher die P- und L-Proteine als funktionelle Faktoren des Polymerasekomplexes als Bestandteile des Nukleokapsids bei der Infektion *in trans* mit in die Zelle gebracht werden. Diese sind über nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander und mit den N-Proteinen assoziiert, wobei die P- und L-Proteine vorwiegend am 3'-Ende des Genoms angelagert sind.

Am 3'-Ende des Genoms befindet sich eine kurze, als *leader* bezeichnete Sequenzfolge von 56 Nukleotiden, die transkribiert wird, aber keine Aminosäuren kodiert. Am 5'-Ende des Genoms befindet sich ein 57 Nukleotide langer, nichttranskribierter Bereich, den man *trailer* nennt. In diesen nichttranskribierten Sequenzbereichen liegen die *cis*-aktiven Initiationssignale für den Start der Polymerasereaktion bei der Replikation und zur Verpackung der RNA-

Moleküle während des Zusammenbaus der Viruspartikel. Kurze, nichttranskribierte Sequenzfolgen befinden sich auch zwischen den einzelnen Leserahmen. In dieser Konsensussequenz befinden sich die Start- und Stop-Signale für die Polymerase bei der Transkription (Gupta & Kingsbury, 1984; Nagai *et al.*, 1999) (siehe Abbildung 2.3).

Die Gene sind auf dem Genom in der Reihenfolge 3' - N-P-M-F-HN-L - 5' angeordnet (siehe Abbildung 2.3). Dabei sind neben den relativ einfach erkennbaren Genen weitere Kodierungskapazitäten im P-Gen enthalten, die durch Verwendung alternativer Startcodons oder durch RNA-Editierung gebildet werden (Curran & Kolakofsky, 1988; Curran & Kolakofsky, 1989). Diese Proteine haben verschiedene Aufgaben bei der Feinabstimmung des viralen Replikationszyklus auf die systemischen Gegebenheiten des Wirtsorganismus (Vidal *et al.*, 1990).

2.1.5 Der Replikationszyklus des Sendai Virus

Zur Einleitung eines Infektionszyklus adsorbiert das Sendai Virus über das HN-Protein an neuraminsäurehaltige Oberflächenproteine und Lipide der Wirtszelle. Durch diese Rezeptorbindung gelangen die virale und die zelluläre Membran in sehr enge räumliche Nähe, wodurch die stark hydrophobe Domäne des F₁-Proteins in die zelluläre Membran eintauchen und die Verschmelzung der viralen und der zellulären Membran initiieren kann. Das Nukleokapsid wird ins Cytoplasma entlassen (Penetration), wo alle weiteren Schritte des Replikationszyklus ablaufen (Fields, 2001).

Da das in Negativstrangorientierung vorliegende RNA-Genom des Sendai Virus im Cytoplasma nicht direkt in Protein übersetzt werden kann, muß das Genom zunächst in geeignete mRNA-*species* transkribiert werden. Der Transkriptionskomplex aus N-, P- und L-Proteinen wird bei der Infektion als Bestandteil des Nukleokapsids *in trans* mit in die Zelle gebracht (Hamaguchi *et al.*, 1985). Die initiale Transkription beginnt am 3'-Ende des Genoms mit der *leader*-Sequenz, die vor dem ersten Gen liegt. Von dieser *leader*-Sequenz wird eine kurze komplementäre RNA gebildet, die vor dem Beginn des N-Gens abbricht (*leader*-RNA). Der Polymerasekomplex bleibt mit dem Virusgenom assoziiert, rückt einige Nukleotide weiter bis zum Startsignal der mRNA-Synthese des N-Gens und beginnt hier erneut mit der Polymerisation. Die Reaktion wird am Ende des N-Gens im Bereich der intergenischen Nukleotide gestoppt (siehe Abbildung 2.3); die den Genen zwischengeschalteten, intergenischen Nukleotide werden übersprungen und die Polymerisationsreaktion beginnt erneut beim Startsignal des P-Gens. Diese aufeinanderfolgenden Vorgänge - Start der mRNA-Synthese, Polymerisation,

Ende der mRNA-Synthese, Überspringen der intergenischen Nukleotide und Neustart der Polymerisation am Startsignal des nächsten Gens - wiederholen sich für jeden Genbereich, so daß am Ende sechs verschiedene mRNA-*species* für die Gene N, P, M, F, HN und L vorhanden sind. Dieser sich im Verlauf der mRNA-Synthese wiederholende Vorgang ist nicht bei jedem Übergang erfolgreich: manchmal fällt der Polymerasekomplex beim Überspringen der intergenischen Sequenz von der RNA-Matrize ab, so daß sich in Transkriptionsrichtung ein Gradient an mRNA-Transkripten ausbildet: vom N-Gen am 3'-Ende des Genoms liegen am meisten vor, während für das L-Protein die geringste mRNA-Menge vorliegt. Die Mengenverhältnisse der entsprechenden Proteine sind ähnlich (Glazier *et al.*, 1977; Homann *et al.*, 1990). Der virale Polymerasekomplex versieht alle mRNA-Moleküle mit einem 5'-Cap und einem 3'- Polyadenylierungssignal.

Neben der Herstellung der einzelnen mRNA-*species* muß die Polymerasefunktion des L-Proteins aber auch die Synthese eines durchgehenden RNA-Moleküls in Positivstrangorientierung bewerkstelligen, das seinerseits als Matrize für die Synthese neuer genomischer RNA-Stränge dienen kann. Das bedeutet, daß neben den verschiedenen einzelnen mRNA-*species* auch RNA-Moleküle gebildet werden müssen, deren Synthese an den intergenischen Sequenzen nicht abbricht, sondern diese mit enthält. Das Umschalten des L-Proteins vom Transkriptions- in den Replikationsmodus ist von der vorhandenen Menge an N-Proteinen abhängig (Vidal & Kolakofsky, 1989). Liegen diese in ausreichender Menge vor, interagieren sie mit der *leader*-RNA und verhindern so den Stop der Transkription an den intergenischen Sequenzfolgen, die nun überlesen werden. Durch diesen Vorgang der Antitermination entsteht ein durchgehendes RNA-Molekül ("Antigenom"), das wie das "richtige" Genom über seine ganze Länge mit N-Protein komplexiert ist. Eine ausreichende Menge an N-Proteinen sorgt aber auch für eine Modifikation der Aktivität des L-Proteins, so daß die Entstehung durchgehender Antigenome gefördert wird. Durch diesen Regulationsmechanismus wird sichergestellt, daß die Replikation erst dann einsetzen kann, wenn die Transkription für die Expression der viralen Proteine ausreichend lange abgelaufen ist (Modrow & Falke, 1998).

Die im Cytoplasma vorliegenden Antigenome werden als Matrizen für die Produktion neuer Virusgenome verwendet, die auch von N-Protein komplexiert werden. Gleichzeitig schreitet die Translation der anderen viralen Proteine voran. Die membranständigen Proteine HN und F werden während ihres Transports zur Zelloberfläche in der entsprechenden Weise modifiziert (Sanderson *et al.*, 1993), die M-Proteine lagern sich an der Innenseite der Zellmembran an und bilden in Wechselwirkung mit den in der Membran lokalisierten HN- und F-

Proteinen eine Matrixschicht aus. Die Matrixschicht interagiert ihrerseits mit dem Nukleokapsid, das aus der viralen genomischen RNA und den Proteinen N, P und L besteht. Das M-Protein vermittelt und kontrolliert so in seiner Rolle als zentraler Organisator der Morphogenese den Zusammenbau der Viruspartikel (*assembly*).

Die Zellmembran stülpt sich schließlich in diesen Bereichen aus und die Viruspartikel werden durch Abknospung (*budding*) an der Zelloberfläche freigesetzt. Dabei verhindert die Neuraminidasefunktion des HN-Proteins durch Entfernen der endständigen Sialinsäuren auf zellulären Oberflächenproteinen in der Membran eine nochmalige Infektion derselben Zelle und gewährleistet ein effektives Ablösen der Viren von der Zellmembran (Superinfektionsschutz) (Fields, 2001).

2.2 Das Sendai Virus als Gentransfervektor

Ziel der Gentherapie ist eine Substitution von genetisch bedingten Insuffizienzen oder die Korrektur von Aberrationen auf Nukleinsäureebene durch das Einbringen der Erbinformation für die korrekte Genfunktion in die entsprechenden Zellen. Entscheidende Kriterien für die erfolgreiche Durchführung eines Gentransfers stellen dabei vor allem die Eigenschaften des verwendeten Transfersystems dar.

Virale Vektorsysteme für die gewebespezifische Gentherapie zeichnen sich in der Regel durch eine hohe Infektionseffizienz und einen hochspezifischen Zelltropismus aus. Diese Eigenschaften werden aber meist teuer erkaufte Nachteile wie eine stark ausgeprägte Immunogenität oder Insertionsmutagenese, die durch unspezifischen Einbau der Nukleinsäure ins Genom Störungen der Regulation von Genen bewirken kann, die an der Koordination des zellulären Teilungsverhaltens beteiligt sind (Robbins *et al.*, 1998).

Das Sendai Virus vereint in sich eine Reihe positiver Eigenschaften, die es als *in vivo*-Gentransfervektor als besonders geeignet erscheinen lassen. So schließt die fehlende nukleäre Phase im sendaiviralen Replikationszyklus zelluläre genomische Schäden durch Insertionsmutagenese aus. Trotz des episomalen Vorliegens des Nukleokapsids kann aber eine recht lange Expressionsdauer erreicht werden, da sich das Nukleokapsid im Cytoplasma selbst repliziert (Erhaltungsreplikation) und die neuen Nukleokapside bei der Zellteilung sogar an die Tochterzellen weitergegeben werden können (Garcin *et al.*, 1994). Außerdem konnte bis heute für das mäusepathogene Sendai Virus kein Krankheitsbild beim Menschen assoziiert werden. Primaten zeigten nach einer intranasalen Infektion mit einem Sendai Virus lediglich eine leichte lokale Entzündungsreaktion an der Stelle der Infektion in der nasalen Mucosa, aber

keine klinischen Symptome. Bei den Tieren konnte keine Ausbreitung des Sendai Virus über das initial infizierte Gewebe hinaus beobachtet werden (Kano *et al.*, 2002). Das Sendai Virus besitzt weiterhin keine strikte Größenbeschränkung bezüglich der transferierbaren Nukleinsäure, die von sterischen Problemen bei der Verpackung in ein Nukleokapsid herrührt, wie es beispielsweise bei den Adenoviren der Fall ist. Beim Sendai Virus wird die maximal mögliche Beladung mit Fremd-DNA von den Replikationsmechanismen bestimmt. So ist es bis heute möglich, rekombinante Sendai Viren mit etwa 10 kb an Fremd-DNA zu beladen, ohne eine Einbuße der infektiösen Eigenschaften und der Effizienz der Transgenexpression befürchten zu müssen.

2.3 Das Sendai Virus als Gentransfervektor in der leberspezifischen Gentherapie

Zusätzlich zu dem oben beschriebenen klassischen Infektionsweg kann das Sendai Virus über einen alternativen Weg spezifisch Leberzellen infizieren (Leyrer *et al.*, 1998 a; Bagai & Sarkar, 1993 b; Bagai *et al.*, 1993). Das F-Protein des Sendai Virus ist, so wie viele andere zelluläre membranständige und sezernierte Proteine, mit komplex verzweigten, N-gebundenen Kohlenhydratketten modifiziert. Diese werden kotranslational im Golgi-Apparat und im Endoplasmatischen Retikulum angefügt (Stryer, 1998). Sie besitzen endständige Galaktosylreste an komplexen N-glykosidisch verknüpften Glykosylierungsstrukturen (Yoshima *et al.*, 1981) und entsprechen den strukturellen Erfordernissen für eine Bindung an den Asialoglykoproteinrezeptor auf Leberzellen. Diese Bindefähigkeit des F-Proteins an den Asialoglykoproteinrezeptor konnte auch für die Sendai Virus Mutante ts271 gezeigt werden. Es handelt sich hierbei um eine temperatursensitive HN-Mutante, der ein funktionelles HN-Protein und somit auch die Hämagglutinations- und Neuraminidaseaktivität fehlt, wenn das Sendai Virus bei 38°C kultiviert wird. Es konnte gezeigt werden, daß dieses HN-defiziente Sendai Virus nicht zu einer Infektion klassischer Helferzellen in der Lage ist. Allerdings kann dieses HN-defiziente Sendai Virus HepG2-Zellen, die den Asialoglykoproteinrezeptor exprimieren, infizieren (Markwell *et al.*, 1985).

Dieser alternative Zelleintrittsweg des Sendai Virus über den Asialoglykoproteinrezeptor erfolgt offensichtlich nicht über den normalen endocytotischen Internalisierungsweg des Asialoglykoproteinrezeptors. Das Sendai Virus gelangt also nicht in intrazelluläre Vesikel, die angesäuert werden und mit Endosomen verschmelzen. Vielmehr dient dieser Rezeptor als „Ersatzrezeptor“ für das Sendai Virus. Nach erfolgter Bindung des F-Proteins an diesen Rezeptor kann die Membranfusion nach dem klassischen Modell eingeleitet (Modrow & Falke,

1998) und das Nukleokapsid ins Cytoplasma entlassen werden. Auch für diesen alternativen Weg des Zelleintritts ist also ein aktiviertes, fusogenes F-Protein erforderlich (Leyrer *et al.*, 1998 a; Bitzer *et al.*, 1997; Markwell *et al.*, 1985; Bagai & Sarkar, 1993 a) (siehe auch Kapitel 2.1.3.2).

HN-defiziente Sendai Viren besitzen also einen modifizierten Gewebetropismus. Sie sind aufgrund des fehlenden HN-Proteins zur Durchführung des klassischen Infektionsweges nicht in der Lage und können stattdessen über die Wechselwirkung des F-Proteins mit dem Asialoglykoproteinrezeptor spezifisch Leberzellen infizieren. Rekombinante HN-defiziente Sendai Viren stellen somit eine vielversprechende Basis als Gentransfervektoren für den Einsatz in der leberspezifischen Gentherapie dar.

2.4 Die Leber als Zielorgan für gentherapeutische Ansätze und der Asialoglykoproteinrezeptor

Die Leber ist das größte endokrine Sekretionsorgan des menschlichen Körpers und zugleich das größte Stoffwechselorgan. Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen als metabolisches Bindeglied zwischen Katabolismus und Anabolismus, der zentralen Stellung als Drehscheibe des Intermediär- und Energiestoffwechsels und ihrer wichtigen Rolle in der Organisation und der Regulation des gesamten Metabolismus stellt die Leber ein sehr attraktives Zielgewebe für gentherapeutische Ansätze dar. So könnten verschiedene genetisch bedingte Stoffwechselkrankheiten wie die Familiäre Hypercholesterinämie, Gendefekte bei Blutgerinnungsfaktoren oder Defizienzen von Genen des Steroidmetabolismus, die in Zusammenhang mit Osteoporose oder Infertilität stehen können, durch einen leberspezifischen Gentransfer mit der entsprechenden genetischen Information korrigiert werden (persönliche Kommunikation mit Dr. PD Jerzy Adamski, GSF, Neuherberg).

Der Asialoglykoproteinrezeptor als Rezeptor- und Internalisierungssystem der Leber wurde erstmals von Ashwell und Morell (1974 a, b) im Rahmen einer Untersuchung des Stoffwechsels von Glykoproteinen im Serum beschrieben. Die Aufgabe des Asialoglykoproteinrezeptors ist es, Glykoproteine gemäß ihrer Funktionsfähigkeit beziehungsweise Halbwertszeit aus dem Blutkreislauf zu entfernen. Dazu werden die terminalen Neuraminsäuren von in der Blutbahn zirkulierenden Glykoproteinen durch membranständige Neuraminidasen in den Blutgefäßwänden enzymatisch entfernt. Die so mit der Zeit freigelegten Galaktosylreste können vom Asialoglykoproteinrezeptor erkannt werden (siehe Abbildung 2.4). Nach erfolgter Bindung werden diese von den Leberzellen durch Endozytose internalisiert. Die dabei

entstehenden Vesikel verschmelzen mit Endosomen, in denen es durch eine Erniedrigung des pH-Wertes zu einer Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes kommt.

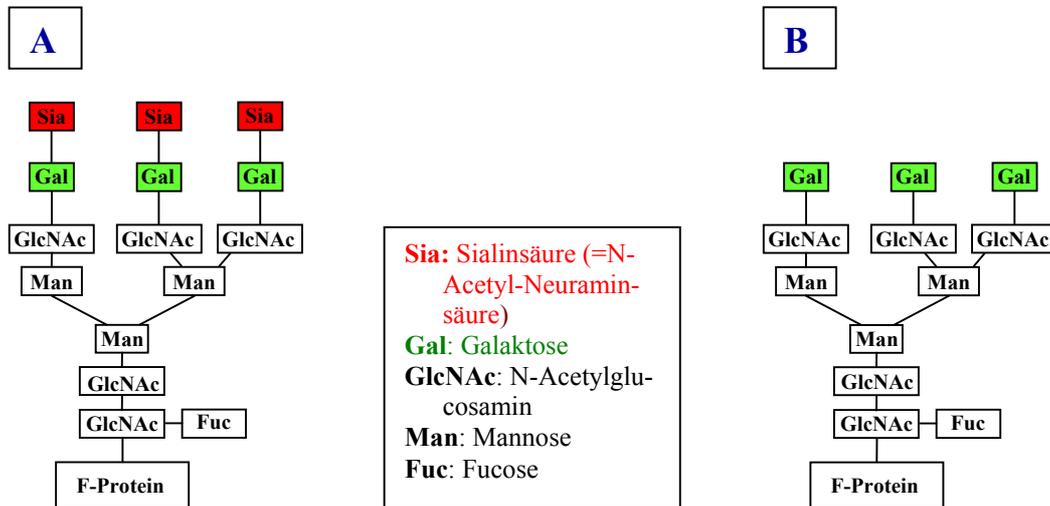


Abbildung 2.4: Struktur der Glykanketten komplexer, N-glykosidisch verknüpfter Kohlenhydratmodifikationen von Glykoproteinen (beispielsweise am F-Protein). **A:** Sialoglykoprotein: bindet nicht an den Asialoglykoproteinrezeptor. **B:** Asialoglykoprotein: bindet an den Asialoglykoproteinrezeptor

Zusätzlich zu dieser allgemeinen Funktion dieses Rezeptors gibt es Hinweise dafür, daß über diesen Weg auch spezifische Ligandenmoleküle, wie beispielsweise das Immunglobulin A, in die Leberzellen aufgenommen werden (Brown & Kloppel, 1989). Die Oligosaccharidketten dieses Immunglobulins enthalten terminale Galaktosylseitenketten (Weigel, 1994). Außerdem gibt es Berichte, nach denen verschiedene Viren, wie beispielsweise das Marburg Virus, den Asialoglykoproteinrezeptor für den Zelleintritt nutzen (Becker *et al.*, 1995).

Die funktionelle Form des Asialoglykoproteinrezeptors besteht aus einem heterooligomeren Komplex aus zwei verschiedenen Untereinheiten, die sich nur geringfügig unterscheiden (Drickamer *et al.*, 1984; Spiess *et al.*, 1985; Spiess & Lodish, 1985; Connolly *et al.*, 1983; Lee & Lee, 1987). Beide Untereinheiten sind nötig, um einen Asialoglykoproteinrezeptor zu bilden, der mit hoher Affinität endständige Galaktosylreste binden kann. Eine hoch-affine Bindung erfordert dabei eine strenge sterische Anordnung der galaktosebindenden Domänen der einzelnen Untereinheiten des Rezeptors. Die Zusammensetzung dieser Unterein-

heiten kann in verschiedenen Geweben variieren und damit auch zu Abweichungen in der Funktion führen (Lodish, 1991; Drickamer, 1996; Townsend *et al.*, 1986).

Der Asialoglykoproteinrezeptor wird in seiner voll funktionsfähigen Form hauptsächlich von parenchymalen Hepatocyten exprimiert (Hubbard & Stukenbrok, 1979). Die Rezeptoren liegen bevorzugt auf der den Blutkapillaren zugewandten sinusoidalen (basolateralen) Seite der Plasmamembran. Dort sind sie in *coated pits* konzentriert (Wall & Hubbard, 1981).

Jahrelang wurde davon ausgegangen, daß funktionelle Asialoglykoproteinrezeptoren ausschließlich auf Leberzellen vorkommen. Neueren Erkenntnissen zufolge werden diese Rezeptoren aber auch von einigen anderen Gewebetypen exprimiert, dann aber meist mit anderer Zusammenstellung der Untereinheiten, anderem Oligomerisierungsgrad und damit auch verändertem Bindungsverhalten. Beispielsweise konnte gezeigt werden, daß Asialoglykoproteine, also Glykoproteine mit entfernten endständigen Sialinsäuren, bei Ratten von peritonealen Makrophagen gebunden und internalisiert werden können (Ozaki *et al.*, 1995). Außerdem konnten einzelne Untereinheiten des Asialoglykoproteinrezeptors bei der Ratte in verschiedenen Geweben während der postnatalen Entwicklung, vor allem in Magen und Niere, sowie in Hirngewebe (hier vor allem Kleinhirn und Stammhirn) (Pacifico *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1998) und Nebenhodengewebe (Monroe & Huber, 1994; Mu *et al.*, 1993) detektiert werden. Als Gründe für diese relativ weite Verbreitung des Asialoglykoproteinrezeptors auf vielen verschiedenen Zelltypen wird unter anderem die Beteiligung von mehreren Zell- und Gewebetypen an der Internalisierung und Reinigung von Serum-Glykoproteinen aus dem Blutkreislauf diskutiert. Allerdings scheint dieser Erklärungsversuch für Gewebetypen wie Klein- und Stammhirn nur schwer haltbar. Trotz Expression des Asialoglykoproteinrezeptors im Klein- und Stammhirn sowie im Hodengewebe konnte aber im Tierversuch mit Mäusen keine Sendai Virus Infektion in diesen Geweben festgestellt werden (Bitzer *et al.*, 2003).

2.5 HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzellen: Ausgangssituation und Zielsetzung

Die initiale Herstellung HN-Protein defizienter Sendai Viren mit Transgenen für den Nachweis, die Therapie oder klinische Anwendungen ist seit einigen Jahren in einem zellgestützten System mit Hilfe des Vaccinia-Expressionssystems unter Verwendung geeigneter HN-defizienter cDNA-Konstrukte problemlos möglich (Leyrer *et al.*, 1998 b; Nagai, 1999; siehe auch Kapitel 3.2.6). Aufgrund ihrer HN-Protein Defizienz können diese Viren aber nicht auf dem normalen Weg mit Hilfe aufeinanderfolgender Passagen auf Helferzellen vermehrt werden, da

ihnen eben das HN-Protein für die Rezeptorbindung an endständige Sialinsäuren auf zellulären Oberflächenproteinen und Lipiden fehlt.

Die denkbar einfachste Vorgehensweise zur Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren wäre der Einsatz von Vermehrungszellen, die den Asialoglykoproteinrezeptor exprimieren. HN-defiziente Sendai Viren sollten diese Zellen über die Wechselwirkung des F-Proteins mit dem Asialoglykoproteinrezeptor infizieren und einen Replikationszyklus einleiten können (siehe Kapitel 2.3). Im Rahmen einer früheren Dissertationsarbeit in dieser Arbeitsgruppe (Leyrer, 1997) wurden entsprechende Versuche zur Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren mit Hilfe von Asialoglykoproteinrezeptor exprimierenden Helferzellen durchgeführt. Bei diesem Vorgehen konnte der Transfer der initial hergestellten HN-defizienten Sendai Viren auf die ersten Helferzellen (HepG2- oder 1-7-1-Zellen) durchgeführt werden. Weitere Viruspassagen mit diesem System waren allerdings erfolglos geblieben. Dieses negative Ergebnis war mit möglichen Wechselwirkungen des bei der initialen Herstellung der rekombinanten HN-defizienten Sendai Viren eingesetzten MVA-T7-Virus mit bestimmten Glykosylierungsenzymen im Endoplasmatischen Retikulum erklärt worden (Mathew *et al.*, 1999): Durch diese Interaktion könnte bei der initialen Herstellung der Sendai Viren am F-Protein ein Glykosylierungsmuster entstanden sein, das durch den Asialoglykoproteinrezeptor erkannt werden konnte. Bei den folgenden Viruspassagen war der Einfluß des MVA-T7-Virus nicht mehr vorhanden und es entstand ein Glykosylierungsmuster am F-Protein, das durch den Asialoglykoproteinrezeptor nicht mehr gebunden werden konnte (siehe Kapitel 2.3 und 2.4). Untermuert wird diese Hypothese durch eine Arbeit aus dem Jahr 2002, in der von einer Einflußnahme des MVA-T7-Virus auf die Prozessierung und Expression der Glykoproteine des Marburg Virus berichtet wurde (Sanger *et al.*, 2001).

Diese Vorgehensweise ist also für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren nicht einsetzbar. Für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren bedarf es daher spezieller Helferzellen, die das HN-Protein für den Replikationszyklus der Viren *in trans* zur Verfügung stellen können, so daß nach einer Viruspassage HN-defiziente Sendai Viren entstehen, die zwar genotypisch HN-defizient, phänotypisch aber HN-Protein haltig sind. Diese genotypisch HN-defizienten Sendai Viren sollten den nächsten Infektionszyklus über den klassischen Sialorezeptor einleiten können (siehe Kapitel 2.1.3.1 und 2.1.5).

In dieser Arbeitsgruppe waren bereits erfolgreich Helferzellen hergestellt und charakterisiert worden, die die N-, P-, und L-Proteine des Sendai Virus exprimieren und damit eine Vermehrung N-, P- und L-defizienter defektiver Sendai Virus Partikel ermöglichten. Die Ex-

pression der N- und P-Proteine war dabei mit Hilfe des Western Blots nachgewiesen worden, während die Expression des L-Proteins in diesen Zellen durch die Vermehrung L-Protein defizienter defektiver Sendai Virus Partikel gezeigt werden konnte (Willenbrink, 1991).

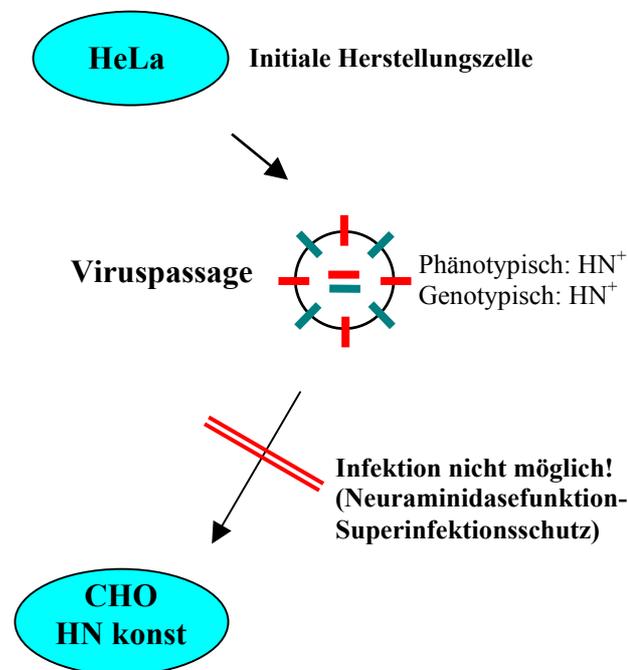


Abbildung 2.5: Blockierung der Infektion bei der Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren mit Hilfe von Helferkellen, die das HN-Protein konstitutiv exprimieren: Die Infektion der Helferkelle ist aufgrund der rezeptorzerstörenden Funktion des HN-Proteins nicht möglich.

Im Rahmen einer weiteren Arbeit in dieser Arbeitsgruppe war versucht worden, M-, F- und HN-Protein defiziente Sendai Viren mittels einer stabil transfizierten Helferkelle, die die M-, F- und HN-Proteine des Sendai Virus exprimiert, zu vermehren. Bei diesem Vorgehen sollten diese Proteine für den Replikationszyklus der defizienten Sendai Viren von der Zelle *in trans* zur Verfügung gestellt werden können. Dabei stellte sich jedoch heraus, daß durch die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins die endständigen Neuraminsäuren auf den zellulären Oberflächenproteinen abgespalten wurden und die Helferkelle somit nicht mehr durch das Sendai Virus infizierbar war (Fischer, 1998) (Superinfektionsschutz; siehe Kapitel 2.1.5; Abbildung 2.5). Eine Infizierbarkeit der Helferkellen ist aber für die Durchführung der Viruspassagen für die Vermehrung der HN-defizienten Sendai Viren auf den Helferkellen unbedingt erforderlich. Eine Helferkelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren müßte also nicht nur in der Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins so weit abgesenkt sein, daß die zellu-

lären Rezeptoren für die Bindung des Sendai Virus intakt bleiben und somit eine Infizierbarkeit der Helferzelle gegeben ist, sondern sie müßte auch in der Lage sein, nach der Infektion einen HN-Protein Expressionslevel zu erreichen, der für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend ist. Zudem müßte nach Ablauf des Replikationszyklus wiederum eine für die Loslösung der Sendai Viren von der Zelle ausreichende Neuraminidaseaktivität vorhanden sein.

Genau an diesem Punkt würde die Schwierigkeit liegen bei der Herstellung einer Helferzelle, die einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hohen HN-Protein Expressionslevel aufweist und trotzdem infizierbar ist: Einerseits muß die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins bis nach der Infektion so weit abgesenkt werden können, daß die zellulären Rezeptoren für die Infektion durch das Sendai Virus intakt bleiben und damit die Infizierbarkeit der Helferzelle gewährleistet ist. Andererseits muß nach der Infektion der Helferzelle aber auch ein ausreichend hoher HN-Protein Expressionslevel für die Entstehung infektiöser Sendai Viren vorliegen. Zusätzlich muß nach Ablauf des Replikationszyklus die Neuraminidasefunktion des HN-Proteins wiederum so aktiv sein, daß eine Loslösung der Sendai Viren von der Zelle gewährleistet ist.

Durch den Einsatz dieser Helferzelle bei der Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren sollten genotypisch HN-defiziente Sendai Viren entstehen, die aber das von der Helferzelle bereitgestellte HN-Protein in der Hülle tragen. Diese genotypisch HN-defizienten, phänotypisch aber HN-Protein haltigen Sendai Viren sollten auf der jeweils nächsten Vermehrungszelle den Infektionszyklus über den klassischen HN-Protein vermittelten Zelleintrittsweg einleiten können (siehe Abbildung 2.6). Durch mehrere aufeinanderfolgende Viruspassagen auf diesen Helferzellen sollten HN-defiziente Sendai Viren zu hohen Titern angereichert werden können. Der letzte Vermehrungsschritt müßte auf Helferzellen ohne HN-Protein Expression erfolgen. Damit sollten HN-defiziente Sendai Viren ohne HN-Protein in der viralen Hülle entstehen, die als HN-defiziente Sendai Viren für den leberzellspezifischen Nukleinsäuretransfer eingesetzt werden können.

Bei einem solchen zellulären HN-Protein Transkomplementationssystem könnte die Zellinfektion beim Passagieren der genotypisch HN-defizienten, phänotypisch aber HN-Protein haltigen Sendai Viren über den klassischen Zelleintrittsweg, das heißt über die Wechselwirkung des HN-Proteins mit dem zellulären Sialorezeptor (endständige Neuraminsäuren auf zellulären Oberflächenproteinen und Lipiden) ablaufen (siehe Kapitel 2.1.3 und 2.1.5).

Somit wäre bei jedem einzelnen Vermehrungsschritt eine optimale Produktivität für die Anzahl der freigesetzten Nachkommenviren gewährleistet.

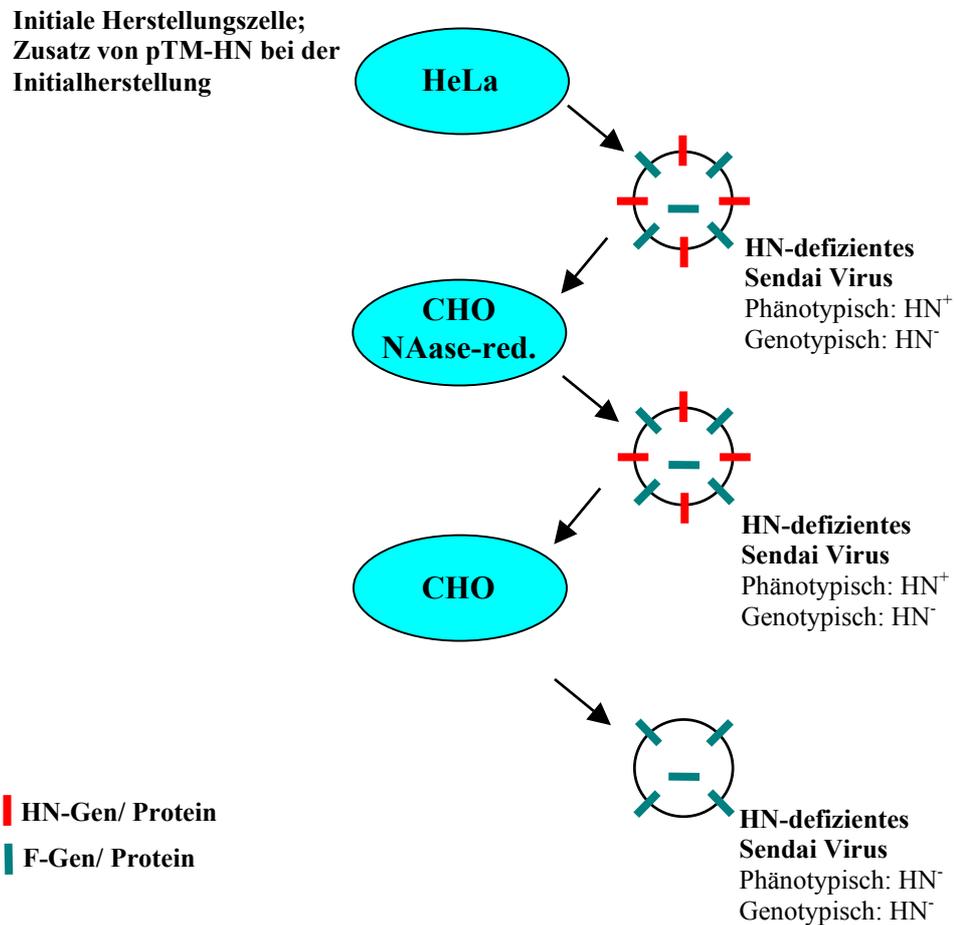


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren mit einem zellulären Hilfssystem: Die initiale Herstellung der HN-defizienten Sendai Viren muß unter Zugabe des Plasmids pTM-HN erfolgen, um den Transfer auf die ersten Passagezellen (CHO-Zellen mit reduzierter Neuraminidaseaktivität) sicherzustellen. Es entstehen genotypisch HN-defiziente, phänotypisch aber HN-haltige Sendai Viren, die die nächsten Passagezellen über den klassischen Sialorezeptor infizieren können. Der letzte Vermehrungszyklus wird auf CHO-Zellen ohne HN-Protein Transkomplementation durchgeführt, so daß aus diesen Zellen genotypisch und phänotypisch HN-defiziente Sendai Viren entlassen werden, die über die Wechselwirkung des F-Proteins mit dem Asialoglykoproteinrezeptor spezifisch Leberzellen infizieren können.

Bis heute konnte keine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle mit den erforderlichen Parametern für eine Unterstützung des Sendai Virus Replikationszyklus beschrieben werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Herstellung einer HN-

Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle. Bei der Herstellung einer Helferzelle mit diesen beiden Eigenschaften sind allerdings bezüglich der Vereinbarkeit dieser beiden erforderlichen Parameter in ein- und derselben Helferzelle einige Schwierigkeiten zu erwarten, die im Folgenden erläutert werden sollen.

2.6 HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzellen: Problempunkte, zu erwartende Schwierigkeiten und Skizzierung des Lösungsweges

Das HN-Protein besitzt zwei funktionelle Eigenschaften: Es vermittelt einerseits die Rezeptorbindung an endständige Neuraminsäuren von Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Zelloberfläche und leitet so den viralen Infektionszyklus ein (siehe Kapitel 2.1.5). Für eine effektive Rezeptorbindefunktion des HN-Proteins ist eine ausreichend hohe Menge des HN-Proteins in der viralen Membran erforderlich. Im Versuch hatte eine schrittweise Absenkung der Menge des HN-Proteins ergeben, daß ein Zehntel der Menge des HN-Proteins bei einem normalen Infektionszyklus für die Herstellung infektiöser Sendai Viren gerade noch ausreicht. Diese Menge war in stabil transfizierten Zellen nur mit einem bestimmten Promotorkonstrukt (hCMV-Promotor + Intron A) zu erreichen und ist durch ein positives Ergebnis im HAD-Test nachzuweisen. Ein positiver HAD-Test zeigte also gleichzeitig einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hohen HN-Protein Expressionslevel an. Die gleichen Experimente hatten aber auch gezeigt, daß trotz Absenkung der Menge des HN-Proteins noch eine sehr starke Neuraminidaseaktivität auf der Zelloberfläche vorhanden war (Fischer, 1998).

Diese Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins spaltet andererseits in der späten Infektionsphase endständige Neuraminsäuren von komplexen Kohlenhydratmodifizierungen des Rezeptors ab und hinterläßt terminale Galaktosylreste. Durch die Zerstörung seiner eigenen Rezeptoren nach Ablauf des Infektionszyklus verhindert das Sendai Virus so ein Haftenbleiben von Nachkommenviren an der Zelle bei der Freisetzung und eine Wiederinfektion bereits befallener Zellen (Superinfektionsschutz; siehe Kapitel 2.1.5). Ein konstitutiv exprimiertes, also permanent in der Zellmembran präsentenes HN-Protein würde, wie oben beschrieben, auf diese Weise für eine Abspaltung der endständigen Neuraminsäuren der Glykoproteine und Glykolipide auf der Zelloberfläche sorgen. Die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus wären zerstört und die Helferzelle durch das Sendai Virus nicht mehr infizierbar. Damit wäre diese Zelle als Helferzelle für die Passagierung und Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren unbrauchbar (Fischer, 1998).

Helferzellen müssen also zur Aufrechterhaltung der Infizierbarkeit in der Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins zumindest bis zum Zeitpunkt der Infektion so weit abgesenkt werden können, daß die endständigen Neuraminsäuren membranständiger Glykoproteine und Glykolipide intakt bleiben und so als zelluläre Rezeptoren für eine Bindung des Sendai Virus genutzt werden können. Nach dem Einbau des von der Helferzelle zur Verfügung gestellten HN-Proteins in das Sendai Virus muß allerdings die Hämagglutinationsaktivität, also die Rezeptorbindefunktion des HN-Proteins voll erhalten sein. Zudem müßte nach Ablauf des Replikationszyklus aber wiederum eine für die Loslösung der Sendai Viren von der Zelle ausreichende Neuraminidaseaktivität vorhanden sein.

Eine denkbare Möglichkeit zum Erreichen dieses Ziel bestünde darin, das HN-Gen durch eine oder mehrere Mutationen zu verändern und damit das resultierende HN-Protein in seinen Aktivitäten so zu modifizieren, daß dessen Neuraminidaseaktivität zwar ausgeschaltet wird, die Rezeptorbindefunktion aber erhalten bleibt. Dabei wäre eine möglichst vollständige Absenkung der Neuraminidaseaktivität bis nach der Infektion ein entscheidender Faktor, da im Versuch schon geringste Mengen des HN-Proteins eine für die Zerstörung der zellulären Rezeptoren ausreichende Neuraminidaseaktivität gezeigt hatten (Fischer, 1998). In der Literatur wurden bereits einige Mutanten des Sendai Virus HN-Proteins beschrieben; keine dieser beschriebenen HN-Mutanten scheint aber geeignet für den Einsatz bei der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle: keine der beschriebenen Mutationen bewirkt eine hundertprozentige Absenkung der Neuraminidaseaktivität; zudem wird bei vielen Mutanten die Rezeptorbindefunktion des HN-Proteins von der Mutation ebenfalls beeinflußt oder das mutierte HN-Protein führt nach dem Einbau in Sendai Virus Partikel nicht zu funktionsfähigen, infektiösen Viruspartikeln (Lyn *et al.*, 1991). Eine eigene Suche nach geeigneten Modifikationen im HN-Protein wäre mit einem enormen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden und würde den Rahmen dieser Arbeit übersteigen; bei Verwendung von bereits bestehenden und charakterisierten Mutanten ohne optimale Eigenschaften wäre ein positiver Ausgang der Experimente ungewiß.

Aus diesem Grund sollte eine andere Methode für die Absenkung der Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins im Rahmen der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle eingesetzt werden: Der Einsatz eines induzierbaren Expressionssystems schien der Ansatz mit dem geringsten Arbeitsaufwand zu sein. Es gibt auf dem Markt eine Vielzahl kommerziell verfügbarer induzierbarer Expressionssysteme, deren Einsatz für die Herstellung einer stabil transfizierten Helferzelllinie ohne großen Aufwand erfol-

gen könnte. Allerdings muß ein induzierbares Expressionssystem einige Anforderungen an die Höhe des erreichbaren Expressionslevels sowie an die Basisexpression im uninduzierten Zustand erfüllen. Diese Anforderungen sollen im Folgenden erläutert werden:

Ein induzierbares Expressionssystem müßte in der Lage sein, die Expression des HN-Proteins und damit auch die Neuraminidaseaktivität bis nach der Infektion so weit herunterzuregulieren, daß dessen rezeptorzerstörende Funktion nicht zur Wirkung kommen kann, um die Infektionsfähigkeit dieser Zellen durch das Sendai Virus zu erhalten. Gleichzeitig muß dieses induzierbare Expressionssystem aber auch die Expression des HN-Proteins nach der Penetration des Sendai Virus hochregulieren können, um so das HN-Protein im Verlauf des viralen Replikationszyklus für den Zusammenbau der viralen Bestandteile *in trans* zur Verfügung zu stellen. Das dafür verwendete induzierbare Expressionssystem muß also einerseits in der Lage sein, die Expression des HN-Proteins vor der Infektion so niedrig zu halten, daß dessen Neuraminidaseaktivität für eine Zerstörung der zellulären Rezeptoren nicht ausreicht. Andererseits muß nach der Infektion aber auch ein so hoher HN-Protein Expressionslevel erreicht werden können, daß die Entstehung infektiöser Nachkommenviren gewährleistet wird. Zudem muß die Neuraminidaseaktivität nach dem Infektionszyklus für eine Loslösung der Sendai Viren von der Zelle ausreichend hoch sein. Die Problematik und Schwierigkeit bei der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle liegt also darin, diese gegensätzlichen Anforderungen in einem einzigen induzierbaren Expressionssystem zu vereinen.

In einer früheren Dissertationsarbeit war festgestellt worden, daß die Herstellung infektiöser Sendai Viren auch mit einem auf zehn Prozent der Menge in akut infizierten Zellen abgesenkten HN-Protein Expressionslevel noch gewährleistet ist (Fischer, 1998). Gleichzeitig ist die möglichst vollständige Unterdrückung der Neuraminidaseaktivität der Helferzelle bis nach der Infektion für die Aufrechterhaltung der Infizierbarkeit, sowie eine für die Loslösung der Sendai Viren von der Zelle ausreichende Neuraminidaseaktivität nach dem Infektionszyklus, ein sehr wichtiger Faktor.

Das GeneSwitch™-System zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen könnte diese beiden Anforderungen in sich vereinen: Die Stärke dieses Systems liegt in erster Linie in einer sehr niedrigen Basisexpression. Diese Eigenschaft ist sehr entscheidend für die Erhaltung der Infizierbarkeit der Helferzelle. Da sich dieses induzierbare Expressionssystem von einem hormonellen System ableitet, ist dabei ein sehr hoher Expressionslevel allerdings nicht zu erwarten. Aufgrund der Ergebnisse von Vorarbeiten (Fischer, 1998) war an-

zunehmen, daß die HN-Protein Expression aber dennoch einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden Level erreichen können sollte. Aus diesen Gründen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zuerst das GeneSwitch™-System zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen eingesetzt werden. Ob der mit diesem System erreichbare Expressionslevel für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreicht, müßte sich im Versuch zeigen.

Sollte die Höhe des HN-Protein Expressionslevels beim GeneSwitch™-System jedoch nicht ausreichend sein, dann müßte ein induzierbares Expressionssystem mit einem stärkeren Promotor eingesetzt werden. Hierfür bieten sich Tetrazyklin-induzierbare Expressionssysteme an, deren Promotorstärke mit verhältnismäßig wenig experimentellem Aufwand erhöht werden könnte. Allerdings würde sich erst nach Etablierung entsprechender monoklonaler Helferzellen zeigen können, ob diese Modifikationen die gewünschte Wirkung zeigen und ob dann die Höhe der Basisexpression in diesem System möglicherweise zu einer so hohen Neuraminidaseaktivität im uninduzierten Status führt, daß die Infizierbarkeit der Helferzellen aufgrund zerstörter Rezeptoren nicht mehr gewährleistet ist.

Für den Fall, daß sich die für die Entstehung infektiöser Sendai Viren erforderliche Höhe des HN-Protein Expressionslevels und die für die Erhaltung der Infizierbarkeit notwendige sehr niedrige Basisexpression im uninduzierten Zustand auch in einem Tetrazyklin-abhängigen induzierbaren Expressionssystem nicht vereinen lassen sollten, dann wäre der Einsatz eines völlig anderen induzierbaren Expressionsmechanismus auf Basis des Cre/ loxP-Systems vorstellbar: Das entsprechende Expressionskonstrukt besitzt einen starken Promotor (hCMV + Intron A), gefolgt von einer Transkriptionsstopkassette, die von zwei loxP-Sequenzen flankiert ist. Durch Zugabe der Cre-Rekombinase sollte diese Transkriptionsstopkassette ausgeschnitten und damit die Expression des HN-Proteins induziert werden können. Dieses System müßte vollständig neu aufgebaut werden und würde daher einen sehr hohen zusätzlichen Arbeitsaufwand erfordern, könnte aber den Vorteil bieten, daß jeder beliebige Promotor durch eine lange und damit ausreichend effektive Transkriptionsstopkassette im uninduzierten Zustand in seiner Aktivität sehr niedrig gehalten werden könnte.

Die Arbeitsschritte zur Überprüfung der Eignung eines Expressionssystems werden stets nach dem gleichen Schema ablaufen: Ein HAD-Test zur Überprüfung der HN-Protein Expression wird sowohl wenige Tage nach der Transfektion, als auch nach der Selektion stabiler Transfektanten durchgeführt werden. Dieser Nachweistest ist mit verhältnismäßig geringem Arbeitsaufwand durchzuführen und wird erst bei Vorliegen einer für die Herstellung in-

fektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Menge positiv (Fischer, 1998). Der HAD-Test eignet sich also sehr gut für die effektive Überprüfung der erforderlichen Parameter der HN-Protein Expression einer Vielzahl an stabil transfizierten Zellklonen.

Bei Vorliegen eines ausreichend hohen HN-Protein Expressionslevels kann nach Monoklonalisierung der so erhaltenen Zelllinien deren Infizierbarkeit überprüft werden: Dies wird durch eine Infektion mit einem Sendai Virus geschehen, das das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) exprimiert und durch Detektion der grünen Fluoreszenz mit einem entsprechenden Fluoreszenzmikroskop leicht nachgewiesen werden kann. Wenn die Zelllinie diese beiden Parameter erfüllt, dann kann sie für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren eingesetzt werden. Dazu werden initial hergestellte HN-defiziente Sendai Viren, die ebenfalls das *enhanced green fluorescent protein* als Transgen enthalten, zur Vermehrung auf diese Helferzellen gegeben. Sollten die Helferzellen in der Lage sein, mit ihrer HN-Protein Expression den Replikationszyklus der HN-defizienten Sendai Viren zu unterstützen, dann würde die von Viruspassage zu Viruspassage ansteigende Anzahl an infizierten Zellen leicht an der grünen Fluoreszenz zu erkennen sein.

Die Arbeitsschritte zum Erreichen des Ziels einer HN-Protein exprimierenden und infizierbaren Helferzelle lassen sich also in folgende Abschnitte gliedern:

1. Auswahl eines geeigneten Zelltyps als Basis für die Herstellung einer stabil transfizierten HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle
2. Bestimmung der minimal-letalen Antibiotikakonzentration für diese Zellen zur Selektion stabiler Transfektanten
3. Optimierung der Transfektionsmethodik zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien
4. Optimierung der Methodik zur Herstellung stabil transfizierter, monoklonaler Zelllinien
5. Auswahl, Herstellung und Modifizierung von induzierbaren Expressionssystemen, die in der Lage sind, einen sehr hohen Expressionslevel des HN-Proteins im induzierten Zustand bei gleichzeitiger sehr niedriger Basisexpression im uninduzierten Zustand zu gewährleisten
6. Klonierung von Expressionskonstrukten für die Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender Helferzellen
7. Herstellung stabil transfizierter HN-Protein exprimierender Helferzellen mit verschiedenen induzierbaren Expressionssystemen und Charakterisierung bezüglich ihrer Induktions- und Expressionsparameter sowie ihrer Infizierbarkeit durch das Sendai Virus

3 ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle. Diese Helferzelle muß einerseits einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel erreichen können und andererseits aber in ihrer Neuraminidaseaktivität zumindest bis nach der Infektion so weit herunterzuregulieren sein, daß es durch die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins nicht zu einer Zerstörung der zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus kommen kann und die Helferzelle somit trotzdem infizierbar bleibt. Zudem muß nach dem Ablauf des Infektionszyklus die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins für die Loslösung der Sendai Viren von der Helferzelle wiederum vorhanden sein.

Für die vorliegende Arbeit waren eine Vielzahl von Vorarbeiten nötig. Um eine leichtere Lesbarkeit und eine bessere Gliederung und Übersichtlichkeit des Ergebnisteils zu gewährleisten, werden diese Vorarbeiten in einem eigenen Kapitel zusammengefaßt.

3.1 Theoretische Vorüberlegungen

Für die Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle ist die Auswahl eines geeigneten Basiszelltyps eine sehr wichtige Entscheidung. Um für die Selektion stabiler Transfektanten eine ausreichende Anzahl von Zellklonen zur Verfügung zu haben, bedarf es desweiteren zunächst der Optimierung der Transfektionsmethodik für den verwendeten Zelltyp und der Bestimmung der korrekten Konzentration des Selektionsantibiotikums.

Außerdem ist für die Herstellung einer solchen Helferzelle die Auswahl beziehungsweise Modifizierung eines induzierbaren Expressionssystems mit geeigneten Eigenschaften entscheidend. Für die induzierbare Expression von Transgenen in Säugerzellen gibt es eine ganze Reihe verschiedener Systeme mit unterschiedlichen Eigenschaften in Bezug auf die Höhe des Expressionslevels nach Induktion, die Basisexpression im uninduzierten Zustand und die Induktionsparameter für die Expression des Transgens.

Im Folgenden sollen die für diese Arbeit notwendigen theoretischen Vorüberlegungen dargestellt werden.

3.1.1 Auswahl einer geeigneten Basiszelllinie zur Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle

Die Auswahl eines geeigneten Zelltyps als Basis für die Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle stellt im Hinblick auf die angestrebte *in vivo*-Verwendung der damit produzierten HN-defizienten Sendai Viren eine wichtige und weitreichende Entscheidung dar. Um unerwünschte Kreuzreaktionen zu vermeiden, sollte die Basiszelle nicht humanen Ursprungs sein, sie sollte keine endogenen Retroviren enthalten und nicht von einer Karzinomzelle abgeleitet sein. Bekannterweise eignen sich Affennierenzellen sehr gut für die Expression viraler Glykoproteine und sie unterstützen auch den Replikationszyklus des Sendai Virus. Da sich Vero-Zellen in den vorliegenden Versuchen als sehr schwer transfizierbar und LLCMK₂-Zellen als zu labil (Daten nicht gezeigt) erwiesen hatten, fiel die Wahl auf CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen als Basis für die Helferzelle. Diese Zellen hatten sich bereits in früheren Versuchen (Fischer, 1998) als geeignet für die Expression viraler Glykoproteine und die Unterstützung des Replikationszyklus des Sendai Virus erwiesen (Berman *et al.*, 1983; Kamboj *et al.*, 1994; Lasky *et al.*, 1986; Malatynska *et al.*, 1995). Außerdem sind CHO-Zellen mit dem Lipofektionsreagenz LipofectAMINE PLUS (Invitrogen) einer Transfektion sehr leicht und mit hoher Effizienz und Ausbeute zugänglich.

3.1.2 Systeme für die induzierbare Expression von Transgenen in Säugierzellen

Die Auswahl eines geeigneten induzierbaren Expressionssystems für die regulierbare Expression des HN-Proteins in der Helferzelle ist eine sehr wichtige Entscheidung: Es muß einerseits einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel nach Induktion aufweisen, andererseits aber auch die Expression des HN-Proteins bis nach der Infektion so niedrig halten können, daß die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins nicht zu einer Zerstörung der zellulären Rezeptoren führt. Zudem muß nach Ablauf des Infektionszyklus die Neuraminidaseaktivität für die Freisetzung der Sendai Viren von der Zelle vorhanden sein. Außerdem sollte das induzierbare Expressionssystem ohne aufwändige Modifikationen schnell einsetzbar sein. Die wichtigste Eigenschaft der Helferzelle schien zu Beginn der Arbeiten die niedrige HN-Protein Basisexpression zu sein, um eine Infizierbarkeit der Helferzellen in jedem Fall gewährleisten zu können. Die Höhe des maximal erreichbaren HN-Protein Expressionslevels wurde als kein allzu kritischer Faktor betrachtet, da in Vorver-

suchen bereits ein Zehntel der HN-Protein Menge in akut Sendai Virus infizierten Zellen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend war (Fischer, 1998).

3.1.2.1 Das GeneSwitchTM-System zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen

Als erste und wichtigste Anforderung an das induzierbare Expressionssystem wurde zu Beginn der Arbeiten eine sehr niedrige Basisexpression erachtet. Diese sollte durch das GeneSwitchTM-System erfüllt werden.

Das GeneSwitchTM-System zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen, das von Wang *et al.* (1994) entwickelt und erstmals beschrieben wurde, basiert auf der Kombination regulatorisch aktiver Komponenten aus humanen Quellen und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Das GeneSwitchTM-Regulationsprotein ist ein Hybrid aus der DNA-Bindedomäne des GAL4-Proteins aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, einer trunkierten Ligandenbindedomäne aus dem humanen Progesteronrezeptor und einer Aktivierungsdomäne aus dem humanen Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dieses hybride Regulatorprotein bindet das synthetische Steroid Mifepristone und agiert als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der sowohl seine eigene Transkription als auch die des Transgens induzieren kann.

Der Promotor des Expressionsplasmids besteht aus der *GAL4-upstream activating sequence* von *Saccharomyces cerevisiae* (Giniger *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1994) und der TATA-Box aus dem adenoviralen *major late* E1b-Gen (Lillie & Green, 1989). Innerhalb der *GAL4-upstream activating sequence* befinden sich sechs Kopien einer Nukleotidsequenz von 17 Basenpaaren Länge, die die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor GAL4 aus *Saccharomyces cerevisiae* darstellen. Das pSwitch-Plasmid exprimiert das hybride Regulatorprotein (GeneSwitchTM-Protein) unter der Kontrolle eines hybriden Promotors, der aus der *GAL4-upstream activating sequence* und einem Minimalpromotor aus dem Thymidinkinasegen des Herpes Simplex Virus besteht (siehe Abbildung 3.1).

Zur induzierbaren Expression des Transgens werden die Zellen mit beiden Plasmiden (dem Expressionsplasmid pGene/V5-His und dem Plasmid, das für das Regulatorprotein pSwitch kodiert) transfiziert. Bei Abwesenheit des Induktors Mifepristone werden geringe Mengen des inaktiven regulatorischen GeneSwitchTM-Proteins von dem Minimal-Thymidinkinasepromotor exprimiert. Das GeneSwitchTM-Protein besitzt eine Kernlokalisationssequenz, so daß es nach der Translation in einer inaktiven Form im Zellkern vorliegt. Nach Zugabe des Induktors Mifepristone bindet dieses mit sehr hoher Affinität an das GeneSwitchTM-Protein

($K_D = 3 \times 10^9$ M) (Vegeto *et al.*, 1992) und bewirkt eine Konformationsänderung in der Ligandenbindedomäne des humanen Progesteronrezeptors, was in einer Dimerisierung und Aktivierung des GeneSwitch™-Proteins resultiert. Das so aktivierte GeneSwitch™-Protein kann nun mit der GAL4-Bindestelle in der GAL4-*upstream activating sequence* im Promotor sowohl des Expressionsplasmids, als auch des pSwitch-Regulationsplasmids, interagieren und so die Expression beider Proteine induzieren. Es entsteht ein autoregulatorischer Rückkopplungsmechanismus, der eine Erhöhung des Expressionslevels beider Proteine bewirkt.

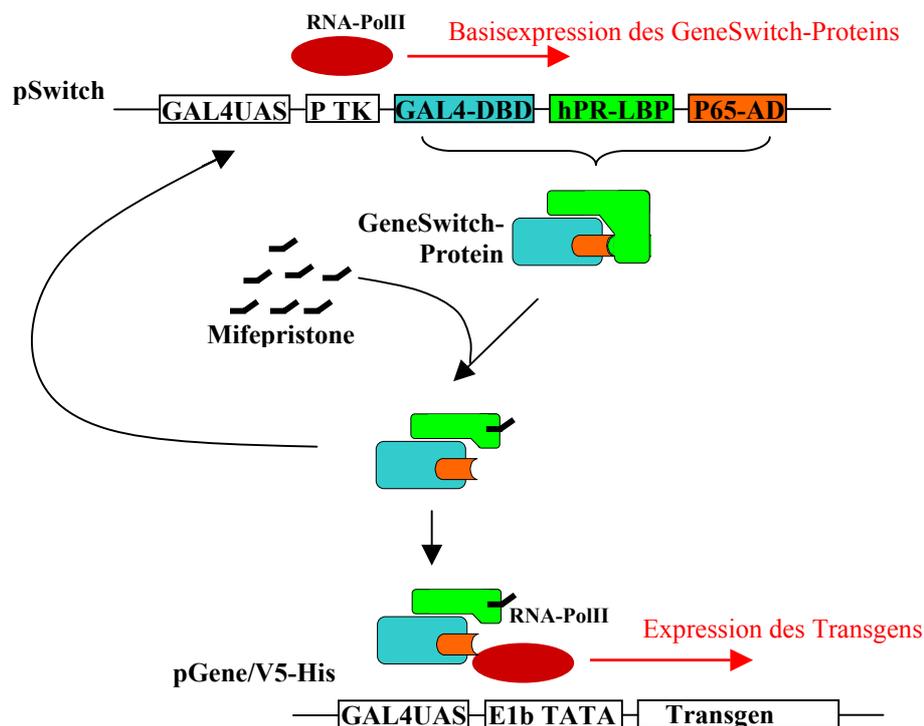


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise des GeneSwitch™-Systems

Die GAL4 DNA-Bindedomäne ist von einem Protein aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* abgeleitet. Daher hat das GeneSwitch™-Protein prinzipiell keinen Effekt auf endogene Gene in Säugerzellen und kann nur die Transkription von Genen aktivieren, deren Expression von einer GAL4-*upstream activating sequence* kontrolliert wird. Die Aktivierungsdomäne aus dem humanen NF- κ B ist ein starker Transkriptionsaktivator, der keine viralen Komponenten beinhaltet. Daher ist auch das Risiko von Pleiotropieeffekten, die mit der Verwendung von viralen Transaktivatoren einhergehen können, als gering einzuschätzen. Die Ligandenbindedomäne aus dem humanen Progesteronrezeptor weist eine 19 Basenpaar-Deletion am Carboxy-

terminus auf. Daher ist diese Domäne nicht mehr in der Lage, an seinen nativen Liganden Progesteron oder an andere endogene Steroide zu binden. Die Bindefähigkeit für das synthetische Steroid Mifepristone bleibt allerdings erhalten (Vegeto *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997).

Bei Verwendung von Zellen, die einem endogenen Drüsengewebe entstammen und daher möglicherweise einen hohen Basislevel an Steroidmetaboliten aufweisen (wie beispielsweise auch CHO-Zellen), sollte aber dennoch vor Beginn der Arbeiten sichergestellt werden, daß die verwendete Zelllinie geeignet ist, die Basisexpression im uninduzierten Zustand möglichst niedrig halten zu können. Das GeneSwitch™-Expressionssystem ist besonders geeignet für Anwendungen, die eine sehr niedrige Basisexpression im uninduzierten Zustand, dafür aber keinen überaus hohen Expressionslevel erfordern. Eine Abhängigkeit des Expressionslevels von der Konzentration des zugegebenen Induktors Mifepristone gibt es in diesem System nicht.

Die Induktion erfolgt standardmäßig durch Zugabe von Mifepristone zu einer Konzentration von 10^{-8} M zum normalen Zellkulturmedium. Mifepristone ist wie alle Steroide stark hydrophob. Es diffundiert problemlos durch die Zellmembran (persönliche Kommunikation mit Invitrogen) und kann sich an seinen Rezeptor binden. Nach spätestens 24 h sollte der maximale Expressionslevel erreicht sein. Entsprechende Nachweisreaktionen können unmittelbar folgen.

Für die vereinfachte Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien werden von der Firma Invitrogen Zelllinien zur Verfügung gestellt, die bereits stabil mit dem Regulatorplasmid pSwitch transfiziert sind. Zur Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie, die induzierbar ein Transgen exprimiert, muß somit nur noch das eigentliche Expressionsplasmid transfiziert werden. In dieser Arbeit kamen CHO-GeneSwitch™-Zellen zum Einsatz.

Die Stärke des GeneSwitch™-Systems zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugierzellen liegt in dessen ausgeprägt niedriger Basisexpression im uninduzierten Zustand, wobei ein sehr hoher HN-Protein Expressionslevel aufgrund des verhältnismäßig schwachen Promotors nicht zu erreichen ist. Damit entspricht es genau den gewünschten Anforderungen für eine Absenkung der Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins bis nach der Infektion. Der erreichbare HN-Protein Expressionslevel sollte aber trotz des relativ schwachen Promotors ausreichend sein, da für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ein HN-Protein Expressionslevel von einem Zehntel des Levels in akut infizierten Zellen ausreicht (Fischer, 1998). Zudem ist das GeneSwitch™-System kommerziell verfügbar und somit sehr schnell einsetzbar.

Um ein entsprechendes induzierbares Expressionskonstrukt zu erhalten, muß lediglich der Leserahmen des HN-Gens in das induzierbare Expressionsplasmid pGene/V5-His einkloniert werden. Mit Hilfe des GeneSwitch™-Systems sollte eine induzierbare HN-Protein Expression in der Helferzelle mit ausreichend niedriger Basisexpression für die Absenkung der Neuramidaseaktivität bis zur Infizierbarkeit der Helferzelle erreicht werden können.

3.1.2.2 Das TREx™-System zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerkzellen

Sollte der nach Induktion erreichbare HN-Protein Expressionslevel beim GeneSwitch™-System für die Herstellung infektiöser Sendai Viren entgegen den Erwartungen nicht ausreichend sein, dann könnte auf ein Tetrazyklin-regulierbares Expressionssystem ausgewichen werden. Mit diesen induzierbaren Expressionssystemen ist ein höherer HN-Protein Expressionslevel zu erreichen; allerdings ist bei diesen Systemen meist auch die Basisexpression höher, so daß die Expression des HN-Protein im uninduzierten Zustand möglicherweise für die Infizierbarkeit der Helferzellen nicht ausreichend weit herunterreguliert werden könnte.

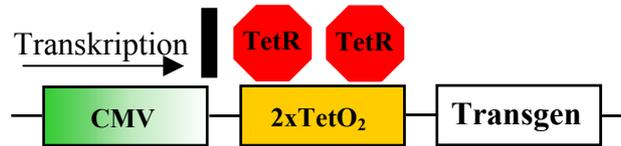
Das TREx™-System (Invitrogen) basiert im Gegensatz zu dem ursprünglich von Manfred Gossen und Hermann Bujard 1992 (Gossen & Bujard, 1992) publizierten System auf einem Regulatorprotein ohne VP16-Transaktivierungsdomäne aus dem Herpes Simplex Virus. Damit entfällt die Gefahr pleiotroper Induktionseffekte (Gallia & Khalili, 1998) und es kommt auch bei längerfristiger Expression des Regulatorproteins (Tetrazyklin-Repressor) in den Zellen nicht zu unerwünschten Nebeneffekten durch unspezifische Aktivierung von zellulären Genen durch diese viralen Transaktivatoren.

Das TREx™-System ist sehr universell einsetzbar, da die Sequenz des Tetrazyklin-Operators, also das Sequenzelement, an das das Tetrazyklin-Repressorprotein bindet und die Transkription inhibiert, sehr kurz und im Rahmen von Klonierungsarbeiten gut handhabbar ist und daher sehr leicht überall eingesetzt werden kann (siehe Abbildung 3.2). In dem hier verwendeten TREx™-System ist diese Sequenz zweimal direkt hintereinander vorhanden, und zwar zwischen dem Promotor und dem Transgen (Yao *et al.*, 1998). In dem von Invitrogen angebotenen System wird der hCMV-Promotor ohne Verstärkerelemente verwendet.

Das TREx™-System besteht aus einem Tetrazyklin-Repressorprotein, das sich in seiner normalen Form sehr fest (Bindekonstante $K_B = 2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$) (Hillen & Berens, 1994) an eine spezifische DNA-Sequenz im Promotor, den Tetrazyklin-Operator binden kann (Hillen *et al.*, 1983). Der Induktor Tetrazyklin bindet sich an dieses Regulatorprotein, das seine Konforma-

tion daraufhin ändert und von der DNA abdiffundiert. Damit wird die DNA für die RNA-Polymerase II freigegeben und die Transkription kann starten (siehe Abbildung 3.2).

Reprimierter Status



Induzierter Status

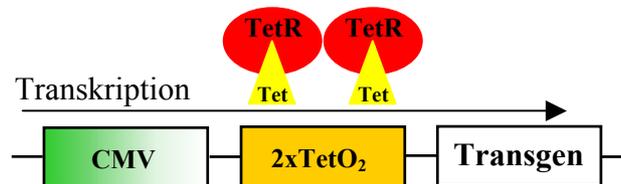


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der funktionellen Elemente des TREx™-Systems im uninduzierten (reprimierten) und im induzierten Status

Eine Eigenheit des TREx™-Systems ist - so wie bei allen tetrazyklinabhängigen induzierbaren Expressionssystemen - dessen Problematik mit der Basisexpression im uninduzierten Zustand. So kann in den meisten Fällen trotz Abwesenheit des Induktors Tetrazyklin eine geringe Basisexpression festgestellt werden. Dies ist vor allem dann kritisch, wenn eine sehr niedrige Basisexpression des Systems aufgrund einer nicht erwünschten enzymatischen Aktivität (wie in der vorliegenden Arbeit beispielsweise die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins) gefordert ist. Natürlich sind bei stabil transfizierten Zellen solche Effekte in hohem Maße auch von anderen Faktoren wie der Anzahl der ins Genom integrierten Transgenkonstrukte oder der jeweils getroffenen Insertionstellen abhängig. Eine sehr wichtige Rolle spielt bei diesen Überlegungen auch möglicherweise im fötalen Kälberserum vorhandenes Rest-Tetrazyklin, das in der Rindermast verwendet wird und bei der Gewinnung des Serums nicht oder nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Für Anwendungen, die eine möglichst niedrige Basisexpression im uninduzierten Zustand erfordern, sollte daher auf speziell für diese Zwecke von Firmen angebotenes Serum ohne Rest-Tetrazyklin oder - wenn möglich - auf Serum-

satz ausgewichen werden (siehe Kapitel 5.10). Die Induktion der Genexpression erfolgte gemäß Angaben des Herstellers standardmäßig mit 2 ng/µl Tetrazyklin für 24 h.

Für die vereinfachte Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien werden von der Firma Invitrogen Zelllinien zur Verfügung gestellt, die bereits stabil mit dem Regulatorplasmid pcDNA6/TR[®], das für den Tetrazyklin-Repressor kodiert, transfiziert sind. Zur Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie, die induzierbar ein Transgen exprimiert, muß somit nur noch das eigentliche Expressionsplasmid transfiziert werden. In dieser Arbeit kamen CHO-TREx[™]- Zellen zum Einsatz.

Sollte also die Höhe des HN-Protein Expressionslevels beim GeneSwitch[™]-System nicht ausreichend sein, dann könnte auf das TREx[™]-System ausgewichen werden. Das TREx[™]-System würde zudem den Vorteil bieten, daß im Rahmen einiger Klonierungsschritte verhältnismäßig leicht Modifikationen am Promotor vorgenommen werden könnten. So wäre beispielsweise der Einbau eines Verstärkerelements in den Promotorbereich denkbar, um einen möglicherweise für die Herstellung infektiöser Sendai Viren zu niedrigen HN-Protein Expressionslevel an die Erfordernisse anzupassen. Allerdings würde sich erst im praktischen Versuch zeigen können, ob mit dem TREx[™]-System an sich und mit möglicherweise notwendigen Modifikationen am Promotor die HN-Protein Basisexpression für eine Infizierbarkeit der Helferzelle ausreichend weit herunterreguliert werden kann.

3.1.2.3 Das Cre/ loxP-System zur regulierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen

Sollten die Anforderungen an eine stabil transfizierte, HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle weder mit dem GeneSwitch[™]-, noch mit dem TREx[™]-System zu erreichen sein, dann müßte ein komplett anderes regulierbares Expressionssystem völlig neu konstruiert werden: das Cre/ loxP-System. Dieses System ist im Gegensatz zu den beiden vorgenannten nicht kommerziell erhältlich und würde daher erheblichen zusätzlichen Arbeitsaufwand erfordern; es würde aber möglicherweise den Vorteil bieten, daß auch ein sehr starker Promotor durch Einfügen einer sehr langen und effektiven Transkriptionsstopkassette im uninduzierten Zustand ausreichend weit herunterreguliert werden könnte.

Das Cre-loxP-System wurde erstmals im Jahre 1981 von Sternberg und Hamilton (Sternberg & Hamilton, 1981) beschrieben. Dieses System ermöglicht eine ortsspezifische Rekombination von DNA-Strängen.

Es besteht aus zwei Komponenten:

Die eine Komponente ist eine 34 Basenpaare lange DNA-Sequenz, die sich aus zwei *inverted repeats* (13 Basenpaare) und einem asymmetrischen *spacer* (acht Basenpaare) zusammensetzt. Diese Erkennungssequenz auf der DNA wird als loxP-Sequenz bezeichnet. Die zweite Komponente ist ein monomeres Protein (343 Aminosäuren) mit der Bezeichnung Cre-Rekombinase, das den eigentlichen Rekombinationsvorgang durchführt (Stricklett *et al.*, 1999; Hoess & Abremski, 1985). Das Cre-Protein ist eine sequenzspezifische Rekombinase. Sie erkennt loxP-Sequenzen und kann DNA-Sequenzen, die von zwei loxP-Sequenzen flankiert sind, entweder ausschneiden (bei gleicher Orientierung der beiden loxP-Sequenzen) oder invertieren (bei entgegengesetzter Orientierung der beiden loxP-Sequenzen) (siehe Abbildung 3.3).

In dieser Arbeit wurden Expressionskonstrukte (siehe Kapitel 3.2.1.3; 3.2.1.3.3 und 3.2.1.3.4) verwendet, die zwischen dem Promotor und dem Transgen eine von zwei loxP-Sequenzen flankierte Transkriptionsstopkassette enthalten. Dabei sind die beiden loxP-Sequenzen gleichsinnig orientiert, so daß durch Zugabe der Cre-Rekombinase diese Transkriptionsstopkassette ausgeschnitten werden kann, der Weg für die DNA-abhängige RNA-Polymerase somit frei wird und die Expression des Transgens erfolgen kann.

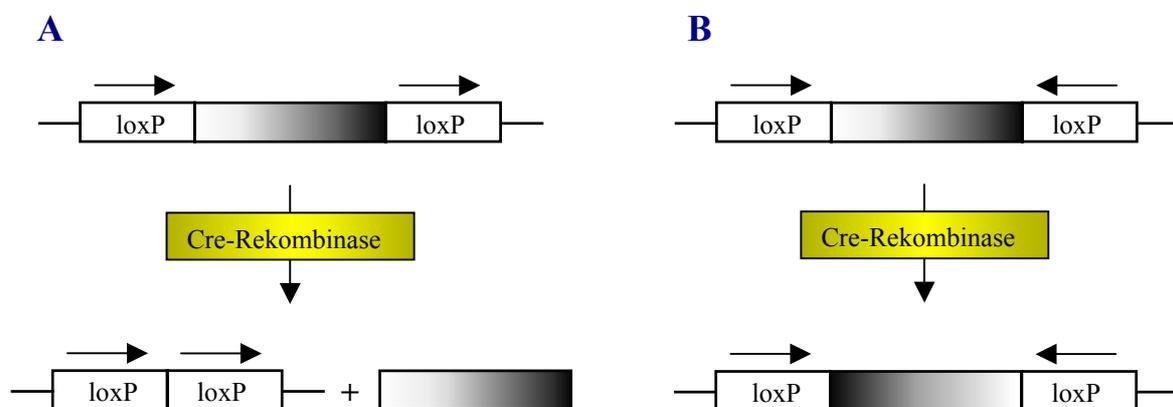


Abbildung 3.3: Funktionelle Aktivitäten der Cre-Rekombinase in Abhängigkeit von der Orientierung der beiden loxP-Sequenzen. **A:** Bei gleichsinniger Orientierung der loxP-Sequenzen schneidet die Cre-Rekombinase den dazwischenliegenden Sequenzbereich irreversibel aus. **B:** Bei entgegengesetzt orientierten loxP-Sequenzen wird der dazwischenliegende Sequenzbereich invertiert.

Es gibt keine kommerziell verfügbaren regulierbaren Expressionssysteme, die auf dem Cre/loxP-Mechanismus beruhen. Daher würde die Etablierung dieses induzierbaren Expressions-

systems einen sehr hohen Entwicklungsaufwand erforderlich machen. Zudem wäre die Induktion der Transgen-Expression immer ein zweistufiges und somit labileres System als eine einfache Induktion des Transgens: In einer ersten Stufe würde die Expression des Cre-Rekombinase Proteins erfolgen, das dann seinerseits durch Exzision der Transkriptionsstopkassette die Expression des eigentlichen Transgens induzieren könnte.

Ein solches System würde aber womöglich den Vorteil bieten, daß auch ein sehr starker Promotor durch Einfügen einer sehr langen Transkriptionsstopkassette in seiner Expressionsleistung effektiv unterdrückt werden könnte: Somit wäre es denkbar, daß die beiden Anforderungen an ein induzierbares Expressionssystem, nämlich der für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichende HN-Protein Expressionslevel und die für die Infizierbarkeit der Helferzelle notwendige sehr niedrige HN-Protein Basisexpression im uninduzierten Zustand, am ehesten mit einem Cre/ loxP-abhängigen regulierbaren Expressionssystem zu erreichen sein könnten.

3.2 Praktische Vorarbeiten

3.2.1 Herstellung von Plasmiden und DNA-Konstrukten

Im Verlauf dieser Arbeit wurden nacheinander die verschiedenen induzierbaren Expressionssysteme GeneSwitch™, TREx™ und Cre/ loxP eingesetzt. Die Herstellung der für die drei unterschiedlichen induzierbaren Expressionssysteme erforderlichen Plasmide und Expressionskonstrukte wird nachfolgend beschrieben. Alle molekularbiologischen Arbeitsmethoden bei der Herstellung der Plasmide und DNA-Konstrukte wurden – soweit nicht explizit anders angegeben – nach der Standardvorschrift (wie unter Punkt 5.1 beschrieben) durchgeführt.

3.2.1.1 Herstellung des Expressionskonstrukts pGene/V5-His-A-HN für das GeneSwitch™-System

Das GeneSwitch™-System war den experimentellen Arbeiten am leichtesten zugänglich, da es der Klonierung lediglich eines einzigen Expressionsplasmids bedurfte: Der Leserahmen des HN-Gens des Sendai Virus wurde in das Expressionsplasmid des GeneSwitch™-Systems pGene/V5-His (siehe Abbildung 3.4, A) inkloniert.

Dazu wurde der Leserahmen des HN-Gens des Sendai Virus aus dem Plasmid pSC-HN mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI ausgeschnitten und in den ebenfalls mit HindIII und EcoRI geöffneten Expressionsvektor pGene/V5-His A inkloniert. Dabei wurde

der gesamte Leserahmen des HN-Gens inklusive Start- und Stopkodon übertragen. Die Verwendung der Variante A des Plasmids pGene/V5-His gewährleistete dabei, daß das exprimierte HN-Protein weder das V5-Epitop, noch das His-tag aufweist (Klonierungsschema siehe Abbildung 3.4, B).

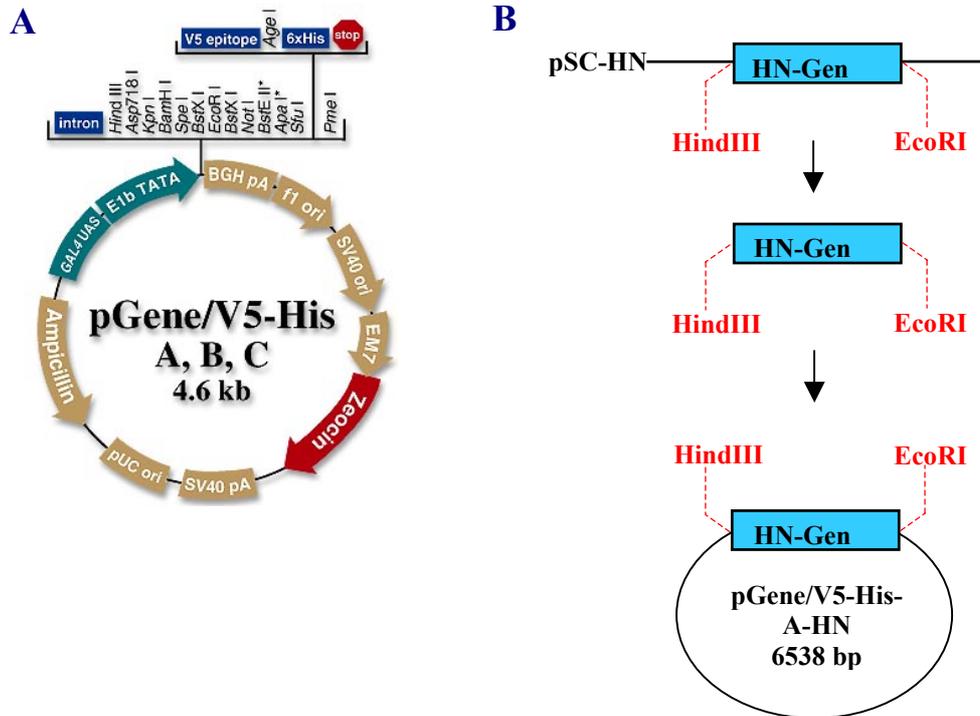


Abbildung 3.4: A: Skizze des Plasmids pGene/V5-His A, B, C. B: Schematische Darstellung der Herstellung des Plasmids pGene/V5-His-A-HN

Nach der Transformation wurden 20 Ampicillin-resistente Bakterienkolonien von der Agar-Platte gepickt und nach einer Mini-Präparation einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen. Es zeigte sich, daß bei 18 von diesen 20 Klonen der HN-Leserahmen in korrekter Weise vorhanden war. Nach weiteren und detaillierteren Restriktionsanalysen wurde ein Klon zur Sequenzierung gegeben, um Punktmutationen ausschließen zu können. Dabei wurde mit den Primern HN7132+, HN7668, HN7677+, HN7846+ und HN8362 (Sequenzen siehe Kapitel 5.14) der gesamte HN-Leserahmen, der komplette Promotorbereich des Plasmids pGene/V5-His-A-HN, und auch einige hundert Nukleotide in 3'-Richtung nach dem Stopkodon des HN-Leserahmens sequenziert. Dabei konnte keinerlei Punktmutation festgestellt werden. Zudem konnte die Funktionalität des induzierbaren Expressionskonstrukts pGene/V5-His-A-HN

durch einen HN-Protein Expressionstest (HAD-Test) nach transienter Transfektion von CHO-GeneSwitch™-Zellen bestätigt werden (siehe Kapitel 3.3.1.2).

3.2.1.2 Herstellung der Expressionskonstrukte für das TREx™-System

Das TREx™-System (Invitrogen) kam im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz, um eine im Vergleich zum GeneSwitch™-System höhere Expressionsleistung des HN-Proteins erreichen zu können. Die Expression wird beim TREx™-System durch den hCMV-Promotor gesteuert. Es sollten hier drei verschiedene Expressionskonstrukte auf Basis des TREx™-System eingesetzt werden, deren Herstellung im Folgenden erläutert werden soll.

3.2.1.2.1 Herstellung des Expressionskonstrukts pcDNA5/TO-HN für das TREx™-System

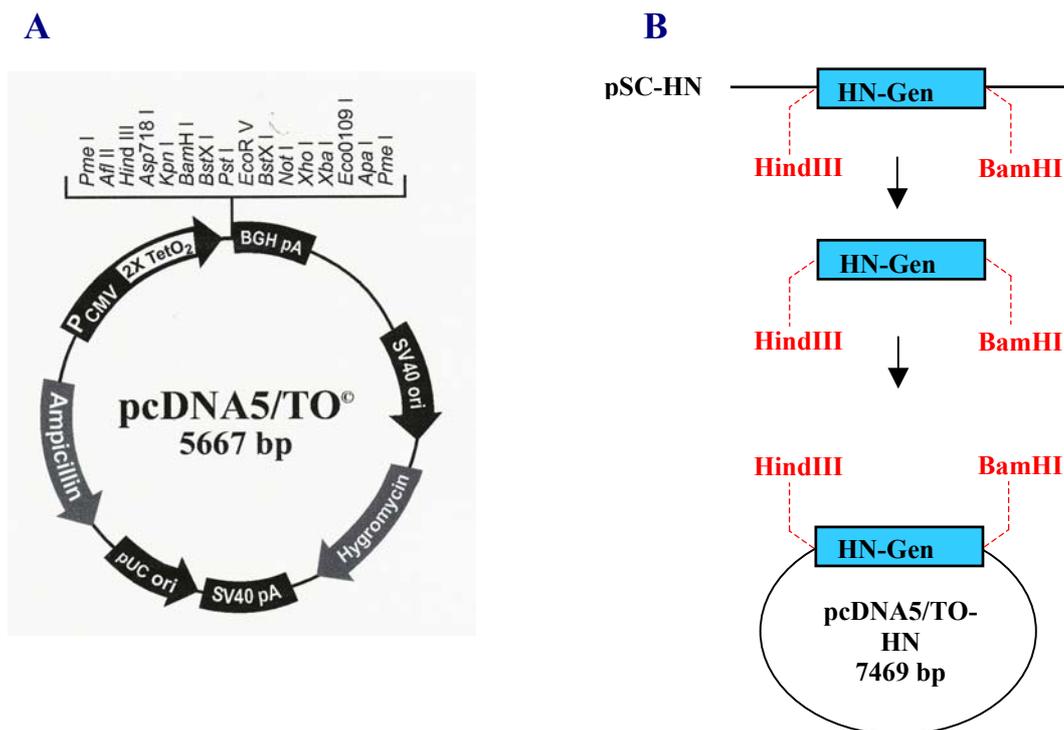


Abbildung 3.5: A: Schematische Darstellung des Plasmids pcDNA5/TO (Invitrogen). B: Schematische Darstellung der Herstellung des Plasmids pcDNA5/TO-HN.

Als einfachster Ansatz im Rahmen des TREx™-Systems sollte der Leserahmen für das HN-Gen in das unmodifizierte Expressionskonstrukt des TREx™-System inkloniert werden. Dazu wurde der Leserahmen des HN-Gens mit den beiden Restriktionsenzymen HindIII und BamHI aus dem Plasmid pSC-HN ausgeschnitten und in den ebenfalls mit HindIII und BamHI geschnittenen Vektor pcDNA5/TO (siehe Abbildung 3.5, **A**) ligiert. Nach der Transformation wurden von der Agar-Platte 20 Ampicillin-resistente Zellkolonien gepickt; bei 17 von diesen Klonen konnte durch einen Restriktionsverdau das Vorhandensein des HN-Gens festgestellt werden. Das entstandene Expressionskonstrukt trägt die Bezeichnung pcDNA5/TO-HN (Klonierungsschema siehe Abbildung 3.5, **B**).

Als abschließender funktioneller Nachweistest für die korrekte Sequenz des Leserahmens des HN-Gens in diesem Plasmid wurde nach transienter Transfektion von CHO-TREx™-Zellen mit dem Plasmid pcDNA5/TO-HN ein HN-Protein Nachweistest durchgeführt (HAD-Test). Dieser Test zeigte gebundene Erythrocyten und somit ein funktionelles HN-Protein auf der Oberfläche dieser Zellen (siehe Kapitel 3.3.2.1).

3.2.1.2.2 Herstellung der beiden Expressionskonstrukte pcDNA5/TO-HN-1xP und pcDNA5/TO-HN-2xP für das TREx™-System

Der hCMV-Promotor an sich, wie er im TREx™-System eingesetzt wird, ist einer der stärksten bekannten Promotoren für die Expression von Transgenen in Eukaryontenzellen. Dieser Promotor kann allerdings durch ein Verstärkerelement mit der Bezeichnung Intron A noch verstärkt werden. Dies erschien nach den Ergebnissen von Vorarbeiten dann doch notwendig (Fischer, 1998), um einen HN-Protein Expressionslevel zu erreichen, der für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend ist. Dieses Intron A stammt, wie der hCMV-Promotor auch, aus dem Genom des Cytomegalovirus. Es bietet einige zusätzliche Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren und führt so zu einer Verstärkung der Transkription und damit zu einem erhöhten Expressionslevel. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um einen maximalen HN-Protein Expressionslevel zu erreichen.

Zur Herstellung dieses Promotorkonstrukts sollte ein Fragment aus dem Plasmid pcDI18-HN, das den hCMV-Promotor mit Intron A enthält, mit den Restriktionsenzymen DraI und EcoRV herausgeschnitten und in das Plasmid pcDNA5/TO-HN eingesetzt werden. Von diesem Plasmid mit verstärktem Promotor wurden zwei Varianten hergestellt, um am Ende die Variante mit der höchsten HN-Protein Expressionsleistung auswählen zu können:

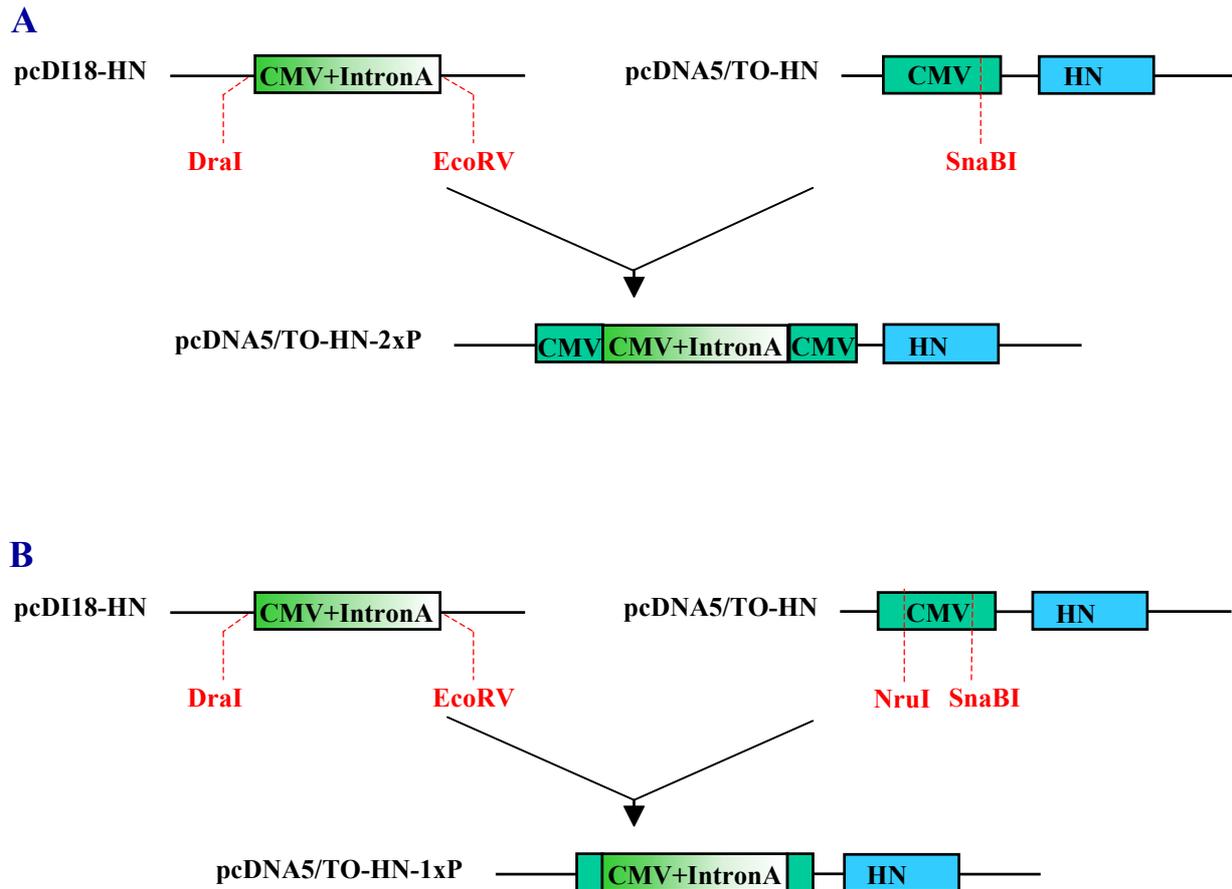


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Herstellung der beiden Plasmide pcDNA5/TO-HN-2xP (A) und pcDNA5/TO-HN-1xP (B)

In der einen Variante pcDNA5/TO-HN-2xP (siehe Abbildung 3.6, A) wurde das Plasmid pcDNA5/TO-HN an Nukleotidposition 590 mit dem Restriktionsenzym SnaBI linearisiert, um das DraI/ EcoRV-Fragment aus dem Plasmid pcDI18-HN einzuklonieren. Um eine Religation des Plasmidrückgrats zu verhindern, mußte dieses nach der Gelelution mit Alkalischer Phosphatase (siehe Kapitel 5.1.4) behandelt werden. Bei der darauffolgenden Ligation war die Ausbeute an Klonen, die das DraI/ EcoRV-Fragment aus pcDI18-HN tatsächlich enthielten, aufgrund der *blunt end*-Ligation erwartungsgemäß geringer als bei den oben beschriebenen Ligationen: von 30 gepickten Klonen konnten durch einen Restriktionsverdau lediglich acht als positiv identifiziert werden. Von diesen wiederum enthielten nur zwei das DraI/ EcoRV-Fragment in der richtigen Orientierung. Das Plasmid aus einem dieser Klone wurde für die Transfektionen verwendet. Dieses Konstrukt enthält also den kompletten hCMV-Promotor aus dem Plasmid pcDNA5/TO-HN sowie zusätzlich das verstärkte Promotorkonstrukt hCMV-Promotor inklusive Intron A aus dem Plasmid pcDI18-HN und auch zwei komplette TATA-

Boxen. Die Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren konnten auf diese Weise vervielfältigt werden. Dieses Konstrukt heißt pcDNA5/TO-HN-2xP.

Da im Vorfeld der Arbeiten nicht abzusehen war, ob es bei zwei direkt hintereinandergeschalteten kompletten Promotoren dieser Stärke beim Aufbau des initialen Transkriptionskomplexes (Knippers, 1997) nicht zu Problemen kommt und ob tatsächlich eine Verstärkung der Transkription stattfindet, sollte eine zweite Variante dieses verstärkten Expressionsplasmids hergestellt werden. Zur Herstellung dieser zweiten Variante wurde der hCMV-Promotor aus dem Plasmid pcDNA5/TO-HN mit den beiden Restriktionsenzymen NruI (208) und SnaBI (590) nahezu vollständig entfernt.

In diesen Vektor wurde das DraI/ EcoRV-Fragment aus pcDI18-HN, das das verstärkte Promotorkonstrukt aus hCMV-Promotor und Intron A enthält, inkloniert. Auch hier mußte das Plasmidrückgrat einer Behandlung durch die Alkalische Phosphatase unterzogen werden, um eine Religation zu verhindern. Und auch hier war die Ausbeute an positiven Klonen bedingt durch die *blunt end*-Ligation sehr gering: Von 30 gepickten Klonen konnten nur fünf als solche identifiziert werden, die das DraI/ EcoRV-Fragment aus dem Plasmid pcDI18-HN enthielten; von diesen wiederum trugen nur drei das Insert in der richtigen Orientierung.

Dieses Expressionskonstrukt enthält also den hCMV-Promotor inklusive Intron A aus dem Plasmid pcDNA5/TO-HN, und zusätzlich zu beiden Seiten dieses Inserts nur sehr kleine Überreste des ursprünglichen hCMV-Promotors aus dem Plasmid pcDNA5/TO-HN, die sich allerdings nicht störend auf die Expressionsleistung auswirken sollten. Dieses Konstrukt wird bezeichnet mit pcDNA5/TO-HN-1xP (siehe Abbildung 3.6, **B**).

Die beiden Expressionsplasmide pcDNA5/TO-HN-1xP und pcDNA5/TO-HN-2xP zeichnen sich also aus durch ein sehr starkes Promotorkonstrukt und das Vorhandensein des Tetrazyklin-Operators zwischen dem Promotorkonstrukt und dem HN-Leserahmen, mit dessen Hilfe die Transkription bei Vorhandensein des Tetrazyklin-Repressor-Proteins reversibel unterdrückt werden kann. Die Expression mit Hilfe dieser Plasmide sollte also regulierbar sein. Das bedeutet, daß eine durch das Tetrazyklin-Repressor-Protein unterdrückte Transkription durch Induktion mit dem Induktor Tetrazyklin induziert werden kann.

3.2.1.3 Herstellung der Expressionskonstrukte und DNA-Konstrukte für das Cre/ loxP-System

Da die Komponenten für das Cre/ loxP-System nicht kommerziell erhältlich sind, brachte dieses induzierbare Expressionssystem den größten Arbeitsaufwand in Bezug auf die Klonierung

der benötigten Expressionskonstrukte und der Transkriptionsstopkassette mit sich. Die Klonierung dieser Konstrukte soll im Folgenden erläutert werden.

3.2.1.3.1 Herstellung des Klonierungsplasmids pDP für Zwischenklonierungen

Um einige Klonierungsschritte einzusparen und eine aufwändige Entfernung von Restriktionsschnittstellen aus Plasmiden zu umgehen, machten die Arbeiten zur Herstellung der Transkriptionsstopkassette aufgrund ungünstig gelegener Schnittstellen und repetitiver Sequenzelemente (mehrere hintereinanderliegende Polyadenylierungssequenzen) ab dem 3. Klonierungsschritt (siehe unten) die Verwendung eines möglichst kleinen Klonierungsplasmids notwendig. Um ein solches zu erhalten, wurde das Plasmid pDP hergestellt. Dieses basiert auf dem Plasmid pcDNA5/TO (Invitrogen; siehe Abbildung 3.5, A) und entstand aus diesem durch zwei aufeinanderfolgende Klonierungsschritte:

In einem ersten Schritt wurde aus dem Plasmid pcDNA5/TO durch das Restriktionsenzym BglIII ein Fragment von 824 Basenpaaren Länge ausgeschnitten. Das größere Fragment (4843 Basenpaare) wurde aus dem Gel eluiert, zur Rezirkularisierung mit sich selbst ligiert und anschließend transformiert (siehe Abbildung 3.7, A, Pfeil). Dabei wurde nach der Transformation von der Agar-Platte lediglich ein Klon gepickt und nach einem Restriktionsverdau als korrekt identifiziert.

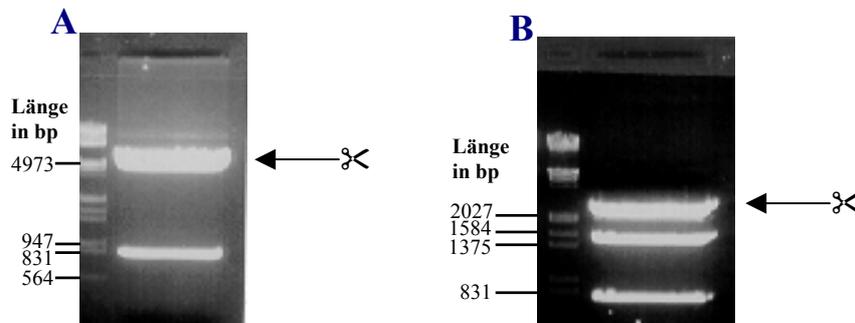


Abbildung 3.7: Herstellung des Klonierungsplasmids pDP in zwei Klonierungsschritten

Dieses im ersten Schritt erhaltene Plasmid wurde im weiteren Vorgehen mit den Restriktionsenzymen PvuII und StuI behandelt, so daß drei Fragmente entstanden (779, 1555 und 2509 Basenpaare; siehe Abbildung 3.7, B) von denen das größte (2509 Basenpaare, siehe Abbildung 3.7, B, Pfeil) aus dem Gel eluiert, rezirkularisiert und transformiert wurde. Auch hier wurde nach der Transformation von der Agar-Platte lediglich ein einziger Klon gepickt, des-

sen korrekte Identität durch einen Restriktionsverdau bestätigt wurde. Dieser wurde zur Vermehrung in eine Maxi-Kultur überführt. Das auf diese Weise sehr einfach in nur zwei Klonierungsschritten entstandene Plasmid trägt die Bezeichnung pDP (2509 Basenpaare) und es eignete sich sehr gut für die Zwischenklonierungen bei der Herstellung der Transkriptionsstopkassette.

Das Plasmid pDP enthält alle Sequenzelemente, die für eine Vermehrung in *E. coli*-Bakterien notwendig sind, sowie die unveränderte *multiple cloning site* aus dem Plasmid pcDNA5/TO. Der gesamte hCMV-Promotor und auch das Hygromycin B-Resistenzgen mit samt SV40-*ori* und SV40-Polyadenylierungssignal fehlen. Die hCMV-*forward-priming-site* fehlt, die Sequenz für den BGH-*reverse*-Primer ist vorhanden. Es gibt einen *forward*-Sequenzierprimer mit der Bezeichnung pDP-Seq-for (siehe Kapitel 5.14).

3.2.1.3.2 Herstellung einer von zwei loxP-Sequenzen flankierten Transkriptionsstopkassette für den Einsatz im Cre/ loxP-System

Um die Expression eines Transgens (HN-Protein oder *enhanced green fluorescent protein*) auf Basis des Cre/ loxP-Systems induzierbar zu gestalten zu können, muß im Expressionsplasmid zwischen den Promotor und das Transgen eine Transkriptionsstopkassette eingefügt werden. Zwei gleichsinnig orientierte loxP-Sequenzen auf jeder Seite der Transkriptionsstopkassette lassen eine Exzision dieser Transkriptionsstopkassette durch die Cre-Rekombinase und damit eine Induktion der Proteinexpression zu. Der große Vorteil des Cre/ loxP-Systems liegt dabei darin, daß die Transkriptionsstopkassette beliebig lang sein kann und daher jeder beliebig starke Promotor, möglicherweise auch der hCMV-Promotor mit Intron A in seiner Expressionsleistung in effektiver Weise sehr weit herunterreguliert werden können sollte.

Transkriptionsstopkassetten stehen nicht kommerziell zur Verfügung. Auf Anfrage wurde uns von dem Kollegen Herrn Joachim Berger aus der Göttinger Arbeitsgruppe um Herrn Professor Peter Gruss das Plasmid PF49 zur Verfügung gestellt, das eine von zwei gleichsinnig orientierten loxP-Sequenzen flankierte Transkriptionsstopkassette enthält. Diese besteht aus einer SV40-Polyadenylierungssequenz mit Transkriptionsterminationssignal sowie einem zusätzlichen Transkriptionsterminator aus dem His3-Gen der Hefe.

Ausgehend von diesem Plasmid sind einige Schritte zum Erhalt einer funktionsfähigen Transkriptionsstopkassette nötig. So mußte zunächst die 5'-loxP-Sequenz erneuert werden, da diese bei der Umklonierung der Transkriptionsstopkassette aufgrund ungünstig gelegener

Schnittstellen verloren ging. Außerdem war die 3'-loxP-Sequenz fehlerhaft; sie zeigte einige Punktmutationen, die ausgebessert werden mußten.

1. Schritt: Umklonierung der Transkriptionsstopkassette in das Plasmid pcDNA5/TO

Das Fragment mit der Transkriptionsstopkassette wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI aus dem Plasmid PF49 ausgeschnitten und in den Vektor pcDNA5/TO einkloniert. Dabei mußte das Plasmidrückgrat des Vektors pcDNA5/TO nach dem BamHI-Restriktionsverdau mit Alkalischer Phosphatase behandelt werden, um eine Rezirkulation des Vektors zu verhindern. Von den 20 gepickten Bakterienkolonien erwiesen sich 19 als positiv in Bezug auf das Vorhandensein des Inserts mit der Transkriptionsstopkassette in dem so entstandenen Plasmid pcDNA5/TO-PF49. Ein weiterer Restriktionsverdau zeigte, daß von diesen 19 Klonen sieben Klone das Insert in der richtigen Orientierung trugen. Einer dieser Klone wurde nach einer endgültigen Bestätigung der Sequenz durch eine Sequenzierung weiterverwendet. Bei diesem Klonierungsschritt ging aufgrund ungünstig gelegener Restriktionsschnittstellen die 5'-loxP-Sequenz verloren. Sie mußte also in einem weiteren Schritt ersetzt werden.

2. Schritt: Instandsetzung der 3'-loxP-Sequenz

Die Instandsetzung der 3'-loxP-Sequenz wurde mit Hilfe einer PCR (siehe Kapitel 5.1.1) mit mutagenen Primern durchgeführt (Primer: loxP-for-mut, loxP-rev; siehe Kapitel 5.14). Hierbei ist der Primer loxP-for-mut mutagen. Er enthält die korrekte loxP-Sequenz. Als Template wurde das Plasmid pcDNA5/TO-PF49 eingesetzt. Dabei entstand ein Produkt von 153 bp (siehe Abbildung 3.8). Dieses PCR-Produkt (nach Aufreinigung) sowie das Plasmid pcDNA5/TO-PF49 wurden mit den Restriktionsenzymen PpuMI und XbaI verdaut und die entstehenden Fragmente aus dem Gel aufgereinigt. Die beiden Fragmente wurden ligiert und transformiert. Es wurden drei Klone für die Analyse ausgewählt. Da das Vorhandensein der korrekten loxP-Sequenz aufgrund fehlender Restriktionsschnittstellen durch einen Restriktionsverdau nicht überprüft werden kann, mußten diese Klone sequenziert werden. Diese Sequenzierung zeigte, daß alle drei Klone die korrekte loxP-Sequenz enthielten. Klon Nummer zwei wurde weiterverwendet. Dieses Plasmid trägt die Bezeichnung pcDNA5/TO-PF49-2. Es enthält die Transkriptionsstopkassette und die 3'-loxP-Sequenz.

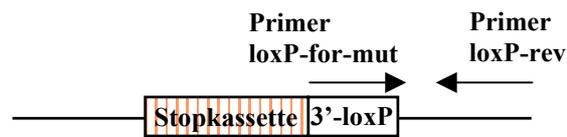


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der PCR in **Schritt 2**

3. Schritt: Umklonierung des essentiellen Fragments der Transkriptionsstopkassette aus dem Plasmid pcDNA5/TO-PF49-2 in das Plasmid pDP zur weiteren Bearbeitung

Da das His3-Gen der Hefe für die vorliegende Anwendung unnötig schien, sollte es entfernt werden. Daher wurde in diesem Klonierungsschritt ein Teil der in dem Plasmid pcDNA5/TO-PF49-2 enthaltenen Transkriptionsstopkassette mitsamt der vorhandenen korrekten 3'-loxP-Sequenz ausgeschnitten und in das kleine Klonierungsplasmid pDP (siehe Kapitel 3.2.1.3.1) einkloniert. Dazu wurde das Plasmid pcDNA5/TO-PF49-2 mit den Restriktionsenzymen KpnI, XbaI und MfeI geöffnet. Das entstandene 300 Basenpaar-Fragment wurde aus dem Gel eluiert. Um eine Ligation der beiden nichtkomplementären Schnittstellen MfeI und KpnI zu ermöglichen, wurde ein kurzes DNA-Fragment aus zwei einzelsträngigen synthetischen Oligonukleotiden mit den entsprechenden Schnittstellen als Linker eingefügt (siehe Kapitel 5.1.2) (Oligonukleotide: Linker MfeI/ KpnI-1 und Linker MfeI/ KpnI-2; siehe Kapitel 5.14).

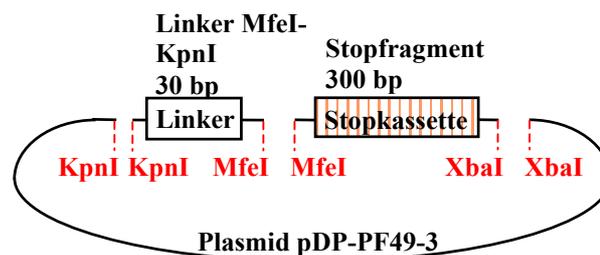


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der im **3. Schritt** beschriebenen Klonierung

Diese Dreifachligation brachte erwartungsgemäß keine große Ausbeute: Nach der Transformation waren lediglich zwölf Bakterienkolonien auf der Agar-Platte gewachsen; von diesen wurden vier nach einem Restriktionsverdau aufgrund der Länge des Inserts als positiv erach-

tet. Alle diese vier Klone zeigten nach einer Sequenzierung die korrekte Sequenz. Einer dieser vier Klone wurde weiterverwendet. Das entstandene Plasmid heißt pDP-PF49-3. Es basiert auf dem Plasmid pDP und es enthält die intakte 3'-loxP-Sequenz sowie die SV40-Polyadenylierungssequenz inklusive des Transkriptionsterminationssignals (siehe Abbildung 3.9).

4. Schritt: Einfügen der 5'-loxP-Sequenz in das Plasmid pDP-PF49-3

Um eine von zwei gleichsinnig orientierten loxP-Sequenzen flankierte Transkriptionsstopkassette zu erhalten, mußte die 5'-loxP-Sequenz komplett neu in das Plasmid pDP-PF49-3 eingefügt werden. Dazu wurde die 5'-loxP-Sequenz aus den beiden Oligonukleotiden loxP1 und loxP2 Sequenzen (siehe Kapitel 5.14) durch Hybridisierung hergestellt (siehe Kapitel 5.1.2). Das so generierte DNA-Fragment besitzt an den Enden die bereits freiliegenden Überhänge für die Restriktionsschnittstellen AflIII und KpnI. Das Plasmid pDP-PF49-3 wurde mit eben diesen Restriktionsenzymen geschnitten und mit dem hybridisierten DNA-Fragment, das die 5'-loxP-Sequenz bildet, ligiert. Nach der Transformation wurden von der Agar-Platte zehn Klone gepickt und einer Analyse durch einen Restriktionsverdau unterzogen. Dabei zeigte sich, daß zwei dieser Klone ein Fragment aufwiesen, das in seiner Länge der 5'-loxP-Sequenz entsprechen könnte. Da es aufgrund fehlender Restriktionsschnittstellen keine Möglichkeit gibt, das Vorhandensein einer loxP-Sequenz direkt mit einem Restriktionsverdau nachzuweisen, mußten diese zwei Klone durch eine Sequenzierung überprüft werden. Beide Klone enthielten die korrekte 5'-loxP-Sequenz. Einer der beiden Klone wurde weiterverwendet. Das entstandene Plasmid trägt die Bezeichnung pDP-PF49-4 und es enthält eine SV40-Polyadenylierungssequenz, die von zwei intakten, gleichsinnig orientierten loxP-Sequenzen flankiert ist.

5. Schritt: Einfügen einer weiteren Polyadenylierungssequenz in das Plasmid pDP-PF49-4

Die Transkriptionsstopkassette sollte eine möglichst vollständige Absenkung der Transkription gewährleisten können. Daher sollte eine weitere SV40-Polyadenylierungssequenz aus dem Plasmid pcDI18-HN eingefügt werden. Dazu wurde das Plasmid pcDI18-HN mit den Restriktionsenzymen AvaII und AflIII verdaut. Von den 13 entstehenden Fragmenten enthielt das 835 Basenpaar-Fragment die SV40-Polyadenylierungssequenz. Dieses Fragment wurde aus dem Gel eluiert und nach Auffüllen der überstehenden Enden mit Hilfe der Klenow-Poly-

merase und Dephosphorylierung des Produkts mit *shrimp alkaline phosphatase* in das mit MfeI geöffnete und ebenso behandelte Plasmid pDP-PF49-4 ligiert (*blunt end*). Dieser Klonierungsschritt war sehr schwierig: So erwies sich die Identifizierung des richtigen Fragments unter den 13 der beim AvaII- und AflIII-Restriktionsverdau entstandenen Fragmente als nicht ganz einfach. Der Ansatz mußte dreimal wiederholt werden, bis das gewünschte Fragment nach dem Restriktionsverdau aus dem Gel eluiert werden konnte. Außerdem war die Ligation der beiden Fragmente so ineffektiv, daß auch diese wiederholt werden mußte. Zudem ergaben sich mengenbedingte Schwierigkeiten, da sowohl nach der Klenow-Polymerase-Reaktion als auch nach der Dephosphorylierung mit SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) eine verlustreiche Aufreinigung des Ansatzes nötig war (QIAquick® Gel Extraction Kit, siehe Kapitel 5.1.7). Somit waren einige Versuche notwendig bis zum Erhalt des auf diese Weise entstandenen Plasmids pDP-PF49-2xPA. Das Plasmid pDP-PF49-2xPA besteht aus den beiden Polyadenylierungssignalen, die von zwei gleichsinnig orientierten loxP-Sequenzen flankiert sind (siehe Abbildung 3.10).

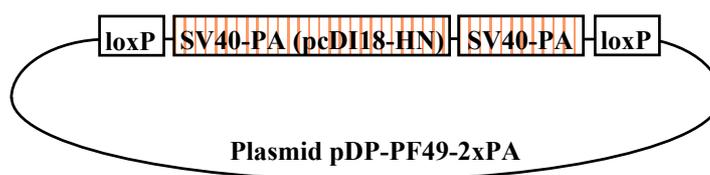


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Plasmids pDP-PF49-2xPA

6. Schritt: Verdoppelung der beiden SV40-Polyadenylierungssequenzen im Plasmid pDP-PF49-2xPA

Die Transkriptionsstopkassette würde in dem Plasmid pcDI18-HN zum Einsatz kommen, wo sie zwischen dem Promotor (hCMV + Intron A) und dem HN-Leserahmen eine möglichst vollständige Unterdrückung der Transkription bewirken sollte. Nach den Erfahrungen mit dem Tetrazyklin-abhängigen TReX™-System wäre die vollständige Unterdrückung der Transkription im uninduzierten Zustand hinter einem so starken Promotor wie hCMV + Intron A möglicherweise ein sehr kritischer Faktor. Um sicherzugehen, sollten daher die beiden SV40-Polyadenylierungssequenzen zwischen den beiden loxP-Sequenzen verdoppelt werden. Dazu wurde das Plasmid pDP-PF49-2xPA mit den Restriktionsenzymen HindIII und Acc65I

gespalten, wodurch ein Fragment von 400 Basenpaaren Länge herausfiel. Dieses enthielt die beiden Polyadenylierungssequenzen. Es wurde nach Behandlung mit Klenow-Polymerase (Auffüllreaktion) und SAP (*shrimp alkaline phosphatase* - Dephosphorylierung der 5'-Enden) in das mit dem Restriktionsenzym Acc65I geöffnete und ebenso behandelte Plasmid pDP-PF49-2xPA inkloniert. Auch hier traten die bereits unter **5. Schritt** beschriebenen Probleme auf: Die Ligation der Klenow-Polymerase- und SAP-behandelten Fragmente verlief sehr ineffektiv, so daß dieser Ligationsansatz einige Male wiederholt werden mußte, ehe eine geringe Menge Ampicillin-resistenter Klone auf der Agar-Platte zu sehen war. Nach dem letzten Transformationsansatz konnten zwölf Klone gepickt werden; von denen zeigten sich in einem Restriktionsverdau neun als positiv in Bezug auf das Vorhandensein des Inserts. Durch eine Restriktionsspaltung, deren Produkte die Orientierung des Inserts erkennen ließen, konnte ein einziger Klon ausgewählt und nach weiteren Restriktionsanalysen einer finalen Überprüfung durch eine Sequenzierung unterzogen werden. Die in dem Plasmid pDP-PF49-4xPA enthaltene Transkriptionsstopkassette besteht nun aus vier direkt hintereinanderliegenden SV40-Polyadenylierungssequenzen, die von zwei gleichsinnig orientierten loxP-Sequenzen flankiert sind (Plasmid pDP-PF49-4xPA; siehe Abbildung 3.11).



Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des Plasmids pDP-PF49-4xPA

3.2.1.3.3 Einbau der von zwei loxP-Sequenzen flankierten Transkriptionsstopkassette aus dem Plasmid pDP-PF49-4xPA in den Expressionsvektor pcDI18-HN

In einem letzten Schritt sollte die von zwei gleichsinnig orientierten loxP-Sequenzen flankierte Transkriptionsstopkassette aus dem Konstrukt pDP-PF49-4xPA in das Plasmid pcDI18-HN umkloniert werden, wo sie im Rahmen der Transfektion und der Herstellung stabil transfizierter Zellen zum Einsatz kommen sollte. Dazu wurde das Plasmid pDP-PF49-4xPA mit dem Restriktionsenzym PmeI gespalten, wodurch die vollständige Transkriptionsstopkassette komplett mit den beiden loxP-Sequenzen herausfiel. Dieses Fragment wurde in den mit EcoRV

geöffneten und mit alkalischer Phosphatase (SAP) behandelten Expressionsvektor pcDI18-HN ligiert. Nach der Transformation konnten 20 Klone von der Agar-Platte gepickt werden, vier davon hatten das Insert (die Transkriptionsstopkassette aus dem Konstrukt pDP-PF49-4xPA) eingebaut, ein einziger auch in der korrekten Orientierung. Dieser Klon stand für die Verwendung bei der Transfektion und der Herstellung stabil transfizierter Zelllinien zur Verfügung. Auch bei dieser Klonierung traten die bereits beschriebenen Schwierigkeiten und die geringe Effektivität bei der Ligation von zwei *blunt end*-Restriktionsfragmenten auf.



Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des induzierbaren Expressionsplasmids pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN

Das entstandene Expressionsplasmid trägt die Bezeichnung pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN. Es besitzt den hCMV-Promotor (inklusive des Verstärkerelements Intron A), gefolgt von der von zwei gleichsinnig orientierten loxP-Sequenzen flankierten Transkriptionsstopkassette und dem Leserahmen für das HN-Protein. Es trägt außerdem das Resistenzgen für die Selektion mit dem Antibiotikum G418 in Säugerzellen sowie das Ampicillin-Resistenzgen für die Amplifikation des Plasmids in Bakterienzellen (siehe Abbildung 3.12).

3.2.1.3.4 Herstellung des induzierbaren Expressionsplasmids pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP für das Cre/ loxP-System

Das Cre/ loxP-System mußte im Rahmen dieser Arbeit völlig neu etabliert werden. Für erste Tests und zur Optimierung des Systems erscheint es daher vorteilhaft, ein durch die Cre-Rekombinase induzierbares Expressionsplasmid mit einem leicht nachweisbaren Transgen zur Verfügung zu haben. Daher sollte ein auf dem Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN basierendes Expressionskonstrukt hergestellt werden, das anstelle des Leserahmens des HN-Gens den Leserahmen für das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) enthält. Die Expression des

eGFP-Proteins kann ohne aufwändige Nachweisreaktion mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops leicht detektiert werden.

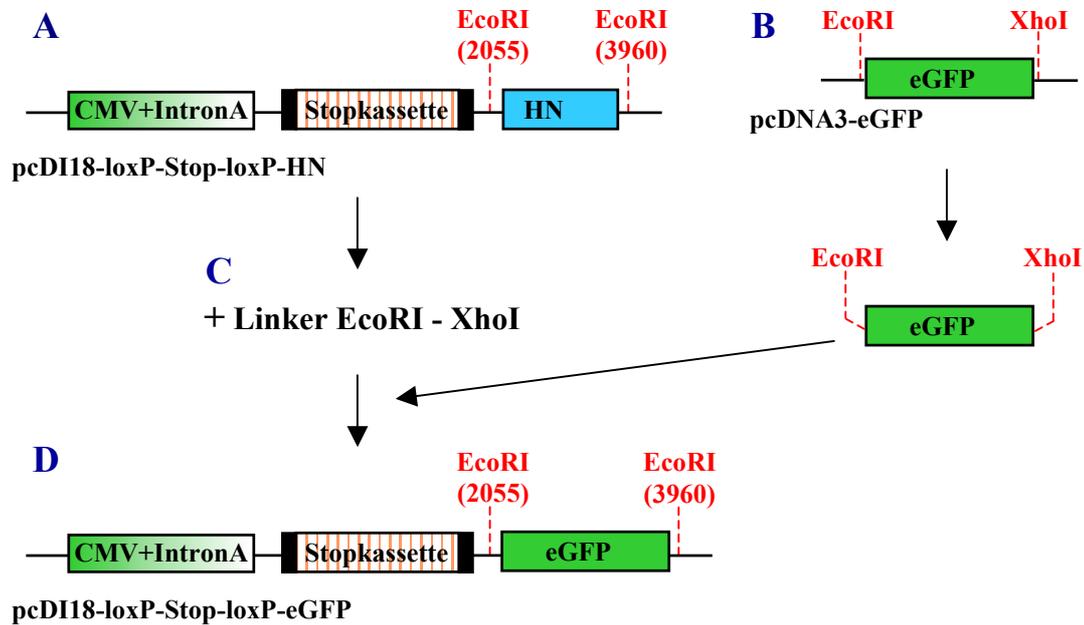


Abbildung 3.13: Klonierungsschema zur Herstellung des Plasmids pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP

Dazu wurde das Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut (siehe Abbildung 3.13, A). So fiel der HN-Leserahmen heraus. Das pcDI18-loxP-Stop-loxP-Plasmidrückgrat stand nun für die Einklonierung des eGFP-Leserahmens zur Verfügung. Der eGFP-Leserahmen stammte aus dem Plasmid pcDNA3-eGFP: Dieses wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI verdaut, so daß ein Fragment mit dem Leserahmen des eGFP-Gens zur Verfügung stand (siehe Abbildung 3.13, B).

Um die beiden nicht kompatiblen Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI ligieren zu können, wurde ein Linkerfragment (EcoRI - XhoI) aus den beiden Oligonukleotiden L-XhoI-EcoRI-1 und L-XhoI-EcoRI-2 (Sequenzen siehe Kapitel 5.14) hybridisiert (siehe Kapitel 5.1.2). Das pcDI18-loxP-Stop-loxP-Plasmidrückgrat (siehe Abbildung 3.13, A) konnte mit dem eGFP-Fragment (siehe Abbildung 3.13, B) und einem Linker (siehe Abbildung 3.13, C) ligiert werden. Diese Dreifachligation war erst beim dritten Ansatz erfolgreich: Nach der Transformation des Ligationsansatzes waren auf der Agar-Platte lediglich 16 Ampicillin-resistente Bakterienklone herangewachsen. Alle wurden gepickt und einer Überprüfung durch einen Restriktionsverdau unterzogen. Dabei zeigte sich, daß sieben dieser Klone den eGFP-

Leserahmen enthielten. Einer dieser Klone wurde für die DNA-Maxi-Präparation herangezogen und zur Sicherheit zur Sequenzierung geschickt. Das entstandene Plasmid trägt die Bezeichnung pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP (siehe Abbildung 3.13, **D**).

3.2.1.3.5 Herstellung des Konstrukts pcDI18-eGFP

Für die Arbeit mit dem Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP würde eine verlässliche Positivkontrolle notwendig sein. Es sollte ein konstitutives Expressionsplasmid sein, das auf dem gleichen Plasmid mit identischem Promotorkonstrukt beruht wie das induzierbare Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP, allerdings ohne die Transkriptionsstopkassette. Damit sollte nach Transfektion der Zellen in jedem Fall eine eGFP-Expression nachweisbar sein.

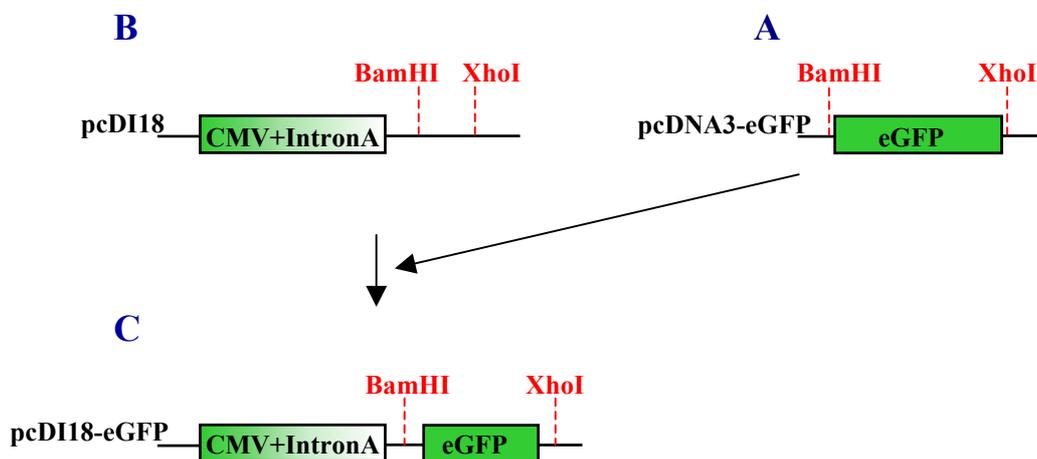


Abbildung 3.14: Klonierungsschema zur Herstellung des Plasmids pcDI18-eGFP

Für die Herstellung des Plasmids pcDI18-eGFP wurde der eGFP-Leserahmen mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI aus dem Plasmid pcDNA3-eGFP herausgeschnitten (siehe Abbildung 3.14, **A**) und in den ebenfalls mit BamHI und XhoI geöffneten Expressionsvektor pcDI18 (siehe Abbildung 3.14, **B**) inkliert. Diese Klonierung verlief völlig problemlos: Nach der Transformation des Ligationsansatzes war die Agarplatte beinahe vollständig von Bakterienkolonien bedeckt. Davon wurden vier gepickt und einer Überprüfung durch einen Restriktionsverdau unterzogen. Alle vier Klone enthielten den eGFP-Leserahmen. Der endgültige Funktionsnachweis erfolgte durch die Detektion der durch das eGFP-Protein verur-

sachten grünen Fluoreszenz mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nach Transfektion von CHO-TREx™-Zellen.

Das entstandene Plasmid wurde mit pcDI18-eGFP bezeichnet (siehe Abbildung 3.14, C) und es enthält das gleiche Promotorkonstrukt (hCMV + Intron A) wie das induzierbare Expressionsplasmid, aber keine Transkriptionsstopkassette und führt daher nach Transfektion zu einer konstitutiven Expression.

3.2.1.3.6 Herstellung des induzierbaren Expressionsplasmids pGene/V5-His-A-Cre für das GeneSwitch™-System

Durch die Cre-Rekombinase kann die von zwei gleichsinnig orientierten loxP-Sequenzen flankierte Transkriptionsstopkassette aus den Expressionsplasmiden pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN und pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP durch Exzision entfernt werden. Das Cre-Rekombinase Gen ist aufgrund einer sehr strikten Patentsituation leider nicht kommerziell erhältlich. Auf Anfrage wurde mir daher ein entsprechendes Plasmid mit dem Cre-Rekombinase Gen liebenswerterweise von Herrn Martin Hrabé de Angelis von der GSF in Neuherberg zur Verfügung gestellt. Es trägt die Bezeichnung pKS-Cre.

Hier sollte eine induzierbar HN-Protein exprimierende Helferzelle auf Basis des Cre/loxP-Systems etabliert werden. Die zur Exzision der Transkriptionsstopkassette und damit zur Induktion der Transgenexpression notwendige Cre-Rekombinase sollte dabei durch ein induzierbares Expressionssystem von der Helferzelle selbst induzierbar exprimiert werden. Für die induzierbare Expression der Cre-Rekombinase wurde das GeneSwitch™-System aufgrund seiner sehr geringen Basisexpression ausgewählt. Parallel dazu sollte aber auch das TREx™-System für die induzierbare Expression der Cre-Rekombinase herangezogen werden, um ein weiteres induzierbares Expressionssystem für die Bereitstellung der Cre-Rekombinase zur Verfügung zu haben. Auf diese Weise sollten Probleme und Schwierigkeiten, die womöglich bei dem zweistufigen System der HN- beziehungsweise eGFP-Protein Expression durch das Cre/loxP-System entstehen sollten, besser erkannt werden können.

Der Leserahmen des Cre-Rekombinase Gens konnte aus dem Plasmid pKS-Cre mit dem Restriktionsenzym XbaI ausgeschnitten werden. Dieses Fragment wurde zur Zwischenklonierung in den ebenfalls mit XbaI geöffneten Vektor pDP (siehe Kapitel 3.2.1.3.1) inkloniert. Die Umklonierung verlief sehr effektiv: Nach Transformation des Ligationsansatzes waren mehrere hundert Ampicillin-resistente Bakterienkolonien auf der Agar-Platte vorhanden. Davon wurden 16 gepickt. Ein korrekter Klon mußte mit Hilfe eines geeigneten Restriktionsver-

daus, der die korrekte Orientierung des Inserts darlegt, ausgewählt werden. Dies war bei elf dieser 16 gepickten Klone der Fall. Einer davon wurde weiterverwendet.

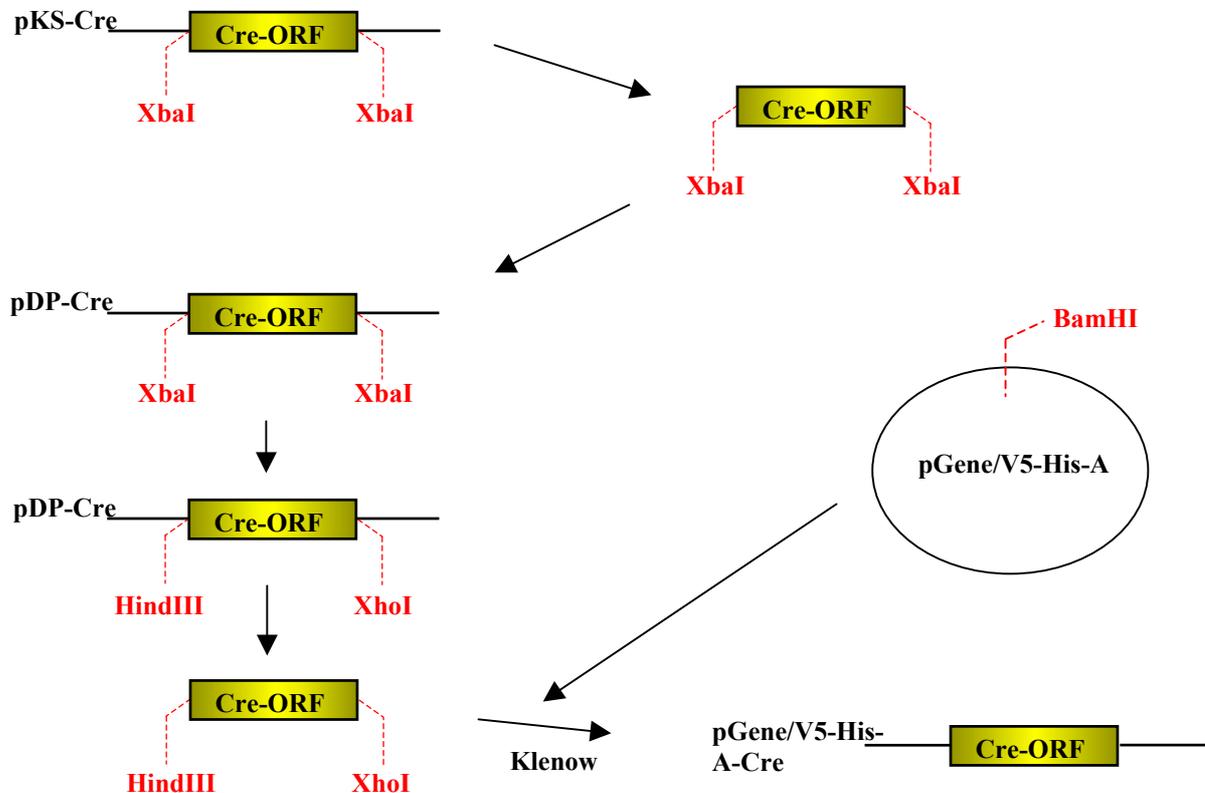


Abbildung 3.15: Klonierungsschema zur Herstellung des Plasmids pGene/V5-His-A-Cre

Das so entstandene Plasmid pDP-Cre wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI verdaut. Das Fragment, das den Leserahmen für die Cre-Rekombinase enthielt (mit einer Länge von etwa 850 Basenpaaren), wurde aus dem Gel eluiert und nach einer Behandlung mit Klenow-Polymerase in den mit BamHI geschnittenen und ebenfalls mit Klenow-Polymerase und Alkalischer Phosphatase (SAP) behandelten Vektor pGene/V5-His-A (siehe Kapitel 3.2.1.1) inkliniert. Dieser Klonierungsschritt erwies sich als schwierig: Nach der Transformation des Ligationsansatzes waren nur sehr wenige Bakterienkolonien auf der Agar-Platte gewachsen, 30 davon wurden gepickt und einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen. Es war nur ein Klon unter den 30 gepickten, der den Leserahmen des Cre-Rekombinase Gens in der richtigen Orientierung inseriert hatte. Die Authentizität des so entstandenen Plasmids

pGene/V5-His-A-Cre wurde mit einem Restriktionsverdau und zusätzlich durch eine Sequenzierung bestätigt (Klonierungsschema siehe Abbildung 3.15).

3.2.1.3.7 Herstellung des induzierbaren Expressionsplasmids pcDNA5/TO-Cre für das TREx™-System

Die Cre-Rekombinase sollte für die induzierbare Expression des HN-Proteins durch das Cre/loxP-System von der Zelle selbst induzierbar exprimiert werden können. Um eine möglichst geringe Basisexpression der Cre-Rekombinase und damit auch eine möglichst geringe Basisexpression des HN-Proteins gewährleisten zu können, wurde das GeneSwitch™-System für die induzierbare Expression der Cre-Rekombinase verwendet. Um ein zweites induzierbares Expressionssystem für das Cre-Rekombinase Protein zur Verfügung zu haben, sollte parallel dazu aber auch das TREx™-System für die induzierbare Expression der Cre-Rekombinase herangezogen werden.

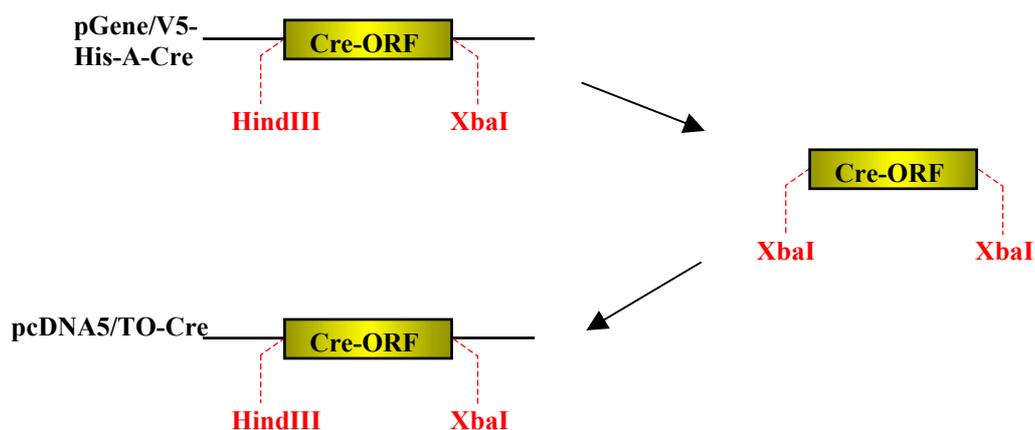


Abbildung 3.16: Klonierungsschema der Herstellung des Plasmids pcDNA5/TO-Cre

Zur Herstellung des induzierbaren Expressionsplasmids pcDNA5/TO-Cre für das TREx™-Systems wurde der Leserahmen des Cre-Gens aus dem Plasmid pGene/V5-His-A-Cre (siehe Kapitel 3.2.1.3.6) mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI ausgeschnitten und in den mit HindIII und XbaI geöffneten Vektor pcDNA5/TO einkloniert (Klonierungsschema siehe Abbildung 3.16). Dieser Klonierungsschritt verlief völlig problemlos und mit hoher Ausbeute: Nach der Transformation des Ligationsansatzes waren auf der Agar-Platte mehrere hundert Ampicillin-resistente Bakterienkolonien herangewachsen. Davon wurden vier gepickt und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Alle vier trugen das Insert. Einer dieser Klone wurde zur

Sequenzierung geschickt, wodurch die korrekte Identität des Cre-Rekombinase Leserahmens in dem Plasmid pcDNA5/TO-Cre bestätigt wurde.

3.2.1.4 Herstellung der HN-Protein Mutante HN^{41/6A} für den Einsatz bei der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle

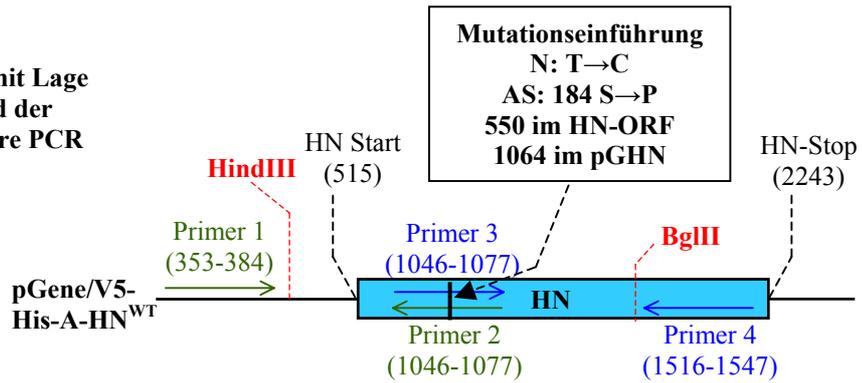
Eine völlig andere Vorgehensweise zur Etablierung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle stellt der Einsatz eines modifizierten HN-Proteins mit reduzierter Neuraminidaseaktivität, aber zu 100 % erhaltener Rezeptorbindefunktion dar. Die zugrundeliegende Mutation im HN-Gen war im Jahr 1991 von Lyn *et al.* (Lyn *et al.*, 1991) hergestellt und beschrieben worden. Diese Mutation basiert auf einer Punktmutation von Thymin nach Cytosin an Nukleotidposition 550 im HN-Leserahmen. Daraus resultiert eine Modifikation des HN-Proteins an Aminosäureposition 184 von Serin nach Prolin, die zu der verringerten Neuraminidaseaktivität führt.

Die Herstellung dieser Mutante im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte mit Hilfe einer Fusions-PCR mit mutagenen Primern. Dabei kamen folgende Primer zum Einsatz: Primer 1 for, Primer 2 rev, Primer 3 for, Primer 4 rev (Sequenzen siehe Kapitel 5.14). Ausgehend von dem Plasmid pGene/V5-His-A-HN als Template wurden in der Fusions-PCR mit Hilfe dieser Primer zwei Fragmente amplifiziert (siehe Abbildung 3.17, A). Die Primerpaare waren dabei so gelegt, daß die beiden Fragmente in einem Bereich von 24 Nukleotiden überlappen. Dieser überlappende Sequenzbereich wird durch die Primer 2 und 3 gebildet. Diese Primer beinhalten auch den Nukleotidaustausch, der zu der Mutation des HN-Gens führt (siehe Abbildung 3.17, A). Die PCR konnte nach Optimierung der *annealing*-Temperatur der Primer problemlos durchgeführt werden.

Nach einem präparativen PCR-Ansatz wurden die beiden so entstandenen Fragmente nach einer Aufreinigung (QIAquick[®] PCR Purification Kit; siehe Kapitel 5.1.7) in einer weiteren PCR als Template eingesetzt, wobei die überlappenden Enden der beiden Fragmente jeweils als Primer für die Auffüllreaktion des gesamten Fragments dienten (siehe Abbildung 3.17, B, C). Dabei mußte die Annealingtemperatur aus der Anzahl der überlappenden Basen genau berechnet werden: Pro G/ C-Paar wurden dazu 4°C, pro A/ T-Paar 2°C addiert. Diese PCR wurde ebenfalls nach Standardvorgehen durchgeführt, allerdings ohne extern zugegebene Primer und mit nur 20 Zyklen.

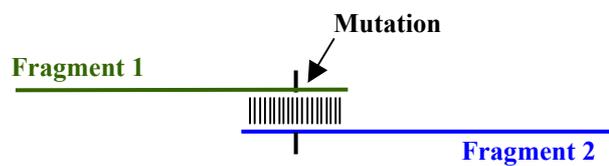
A

Ausgangskonstrukt mit Lage der Schnittstellen und der Primer für die primäre PCR



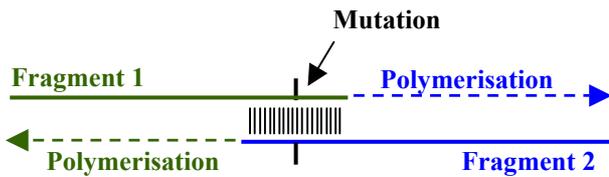
B

Zwei PCR-Fragmente mit komplementären Enden



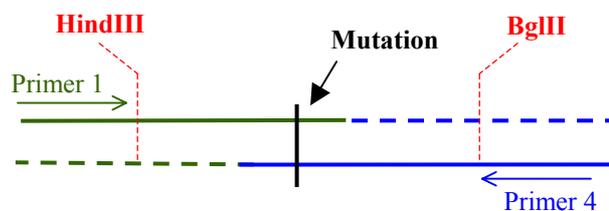
C

Auffüllreaktion: Die zueinander komplementären Enden der beiden primären PCR-Produkte dienen einander als Primer. Es entsteht das Template für die finale PCR.



D

Finale PCR: Synthetisierung des gesamten Fragments inklusive der Mutation nach Zugabe der Primer 1 und Primer 2



E

Endprodukt: PCR-Fragment, das die ersten zwei Drittel des HN^{41/6A} enthält und nach Freilegung der terminalen Schnittstellen (HindIII und BglII) zur Wiedereinsetzung in das Plasmid pGene/V5-His-A-HN zur Verfügung steht.

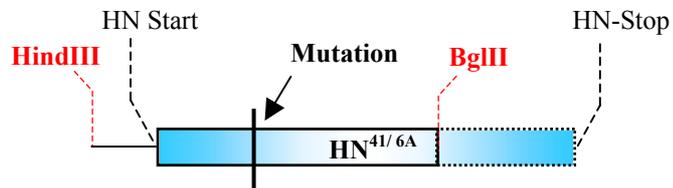


Abbildung 3.17: Klonierungsschema zur Herstellung der HN-Mutante HN^{41/6A}

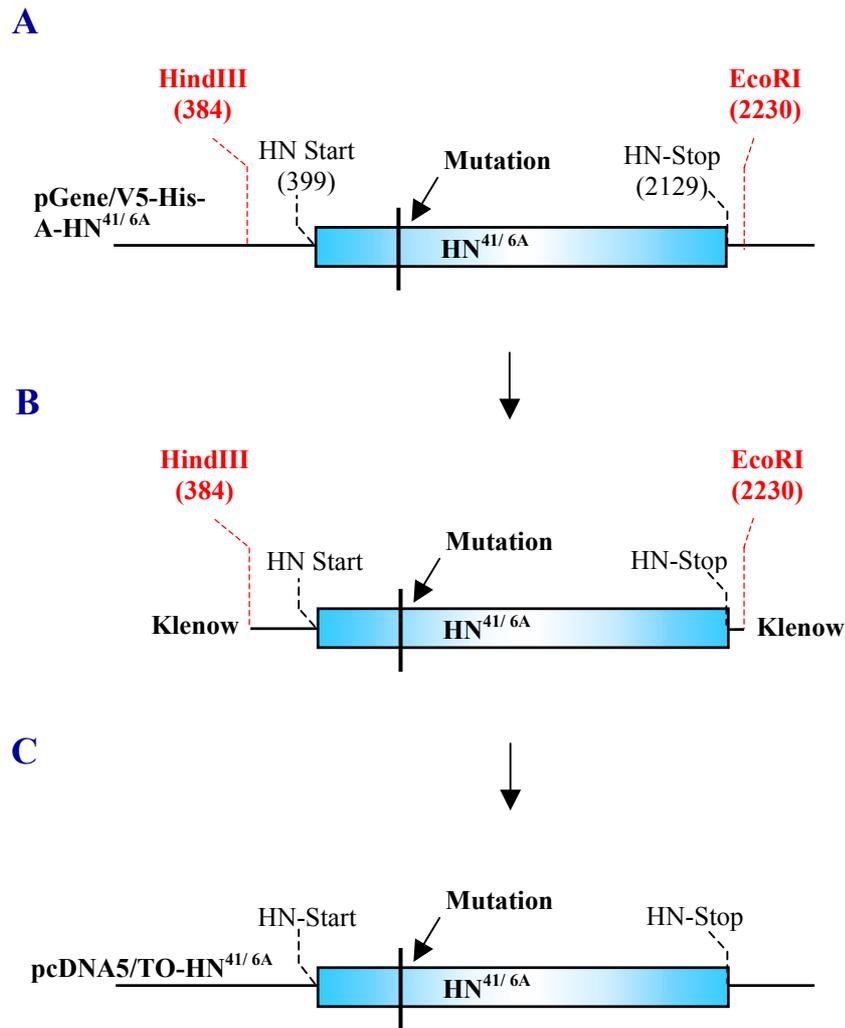


Abbildung 3.18: Umklonierung des HN^{41/6A}-Leserahmens aus dem Plasmid pGene/V5-His-A-HN^{41/6A} in den Vektor pcDNA5/TO

Im weiteren Verlauf der Klonierungsarbeiten wurde das so erhaltene mutierte HN-Gen mit der Bezeichnung HN^{41/6A} über die Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI aus dem Plasmid pGene/V5-His-A-HN^{41/6A} in das Plasmid pcDNA5/TO umkloniert. Es entstand das Plasmid pcDNA5/TO-HN^{41/6A} (siehe Abbildung 3.18). Zur Herstellung des Expressionsplasmids pcDI18-HN^{41/6A} wurde mit Hilfe einer PCR, mutagenen Primern und dem Plasmid pGene/V5-His-A-HN^{41/6A} als Template der HN^{41/6A}-Leserahmen amplifiziert. Die beiden eingesetzten Primer tragen die Bezeichnung SeV-HN-5'-Sal-for und SeV-HN-3'-XhoI-rev (siehe Kapitel 5.14) und zeichnen sich dadurch aus, daß sie direkt beim Start-Codon des HN-Leserahmen beginnen und genau mit dem Stop-Codon des HN-Gens enden (siehe Abbildung 3.19). Ein überhängender, nicht komplementärer Anteil trägt die Sequenz für die anzufügende Schnittstelle (Sall beziehungsweise XhoI) (siehe Kapitel 5.14).

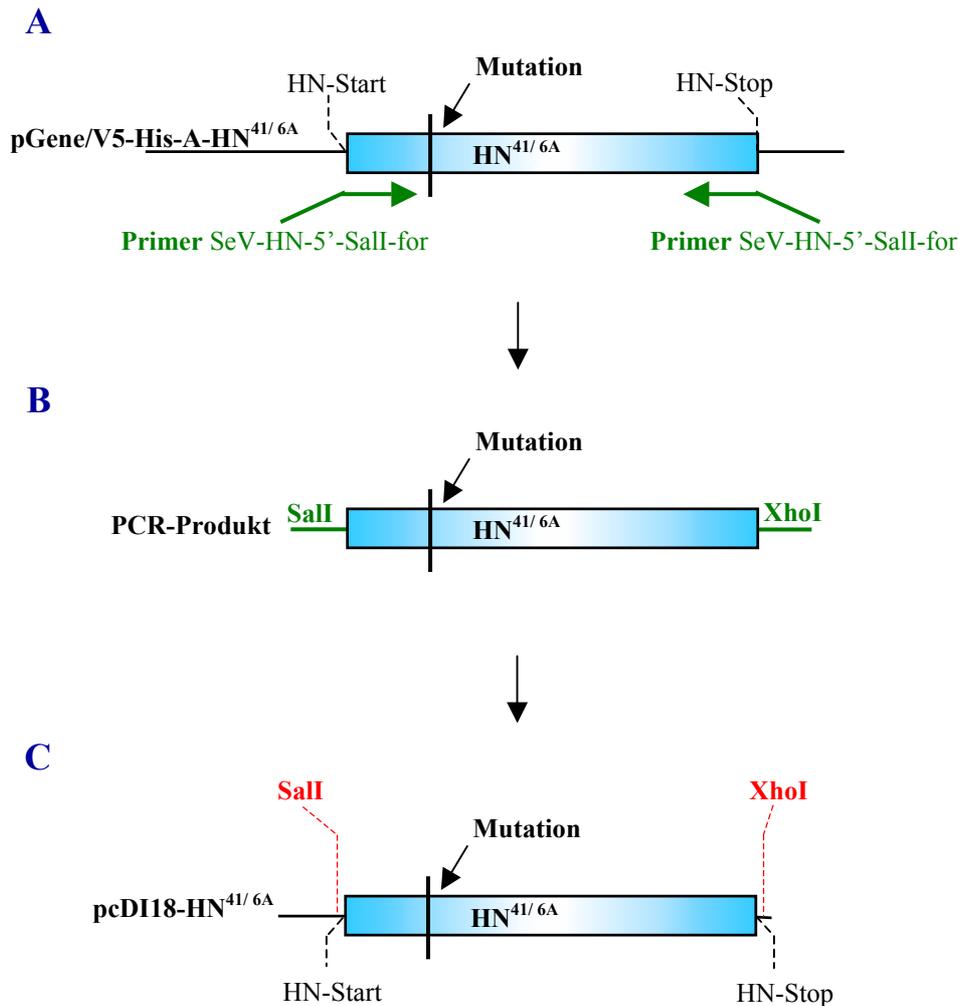


Abbildung 3.19: Herstellung des Expressionsplasmids pcDI18-HN^{41/6A}

Nach der PCR wurde das entstandene Fragment mit den Restriktionsenzymen SallI und XhoI verdaut und daraufhin in den ebenfalls mit SallI und XhoI geöffneten Expressionsvektor pcDI18 inkloniert. Dieses Expressionsplasmid trägt die Bezeichnung pcDI18-HN^{41/6A}.

3.2.2 Optimierung der Transfektionsmethodik

Die Effektivität der Transfektion ist ein sehr wichtiger Faktor bei der Herstellung stabil transfizierter Zellen. Um diese zu optimieren, sollten vor Beginn der Arbeiten einige wesentliche Parameter untersucht werden.

Generell können die bei der Transfektion eingesetzten Plasmide vor der Transfektion an einer unkritischen Stelle linearisiert werden. So kann möglicherweise eine willkürliche Linearisierung des Plasmids durch zelluläre Systeme beim Einbau ins Genom verhindert werden.

Damit wird die Wahrscheinlichkeit vermindert, daß das Plasmid an einer für die Expression des Transgens essentiellen Stelle linearisiert wird. Eine durch die Linearisierung des Plasmids veränderte Transfektionseffizienz konnte im Gegensatz zu Berichten anderer Experimentatoren im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Genausowenig konnte bei Verwendung linearisierter Plasmide für die Transfektion der Zellen eine erhöhte Ausbeute an stabil transfizierten Zellklonen erreicht werden. Daher wurde das Vorgehen der Linearisierung der Plasmide vor der Transfektion aufgrund des damit verbundenen erhöhten Arbeits- und Materialaufwandes wieder eingestellt.

Durch die Verwendung von Chloroquin wird das endosomale Aufnahmesystem der Zelle inhibiert. Auf diese Weise soll die Transfektionseffizienz erhöht werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt von Chloroquin auf die Zellen und deren Verhalten bei der Transfektion untersucht. Hierzu wurden im Rahmen einer Standardtransfektion die GeneSwitch™-CHO-Zellen und das Plasmid pGene/V5-His-lacZ verwendet. Eine ansteigende Konzentration von 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 und 100 µM Chloroquin wurde in einer Versuchsreihe für 30 min (37°C) vor der Transfektion auf den Zellen inkubiert und in einer parallelen Versuchsreihe im Transfektionsansatz simultan mit dem Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Dabei zeigte sich, daß die Anwesenheit von Chloroquin keinen sichtbaren Einfluß auf die Transfektionseffizienz hat und ab einer Konzentration von 75 µM sogar toxisch auf die Zellen wirkt, was sich in Abrundung und Ablösung von der Wachstumsoberfläche bemerkbar macht. Daher wurde auch die Verwendung von Chloroquin bei der Transfektion mit Ausnahme der Calciumphosphatpräzipitation (siehe Kapitel 5.3.5.2) wieder eingestellt.

Die Transfektionseffizienz hängt sehr stark vom Zelltyp und dem verwendeten Transfektionsreagenz ab. Vero-Zellen erwiesen sich generell als sehr schwer transfizierbar. So konnten mit Hilfe des LipofectACE-Reagenz nur 0,1-2 % der Zellen eines Vero-Zellrasens transfiziert werden. Die CHO-Zellen dagegen zeigten sich der Transfektion sehr zugänglich, so daß mit dem Lipofektionsreagenz LipofectAMINE PLUS 5-10 % aller Zellen in einem Zellkulturgefäß transfiziert werden konnten. HeLa-Zellen sind mit Hilfe der Calciumphosphatpräzipitation (5-10 %) oder des LipofectACE-Reagenz (5-10 %) sehr gut zugänglich. Transfektionen zur Herstellung und Selektion stabil transfizierter Zellen wurden standardmäßig in Six-Well-Zellkulturplatten durchgeführt. Für die Herstellung stabil transfizierter, HN-Protein exprimierender Zellen wurden in dieser Arbeit generell CHO-Zellen verwendet, die mit dem Lipofektionsreagenz LipofectAMINE PLUS transfiziert worden waren.

3.2.3 Letalitätsbestimmung der verwendeten Antibiotika für verschiedene Zelltypen

Bei der Herstellung von stabil transfizierten Zellen ist die korrekte Konzentration des Antibiotikums für die Selektion stabiler Transfektanten ein sehr entscheidender Faktor: Bei einer zu niedrigen Konzentration können auch nichttransfizierte Zellklone, die sich durch spontane Mutation oder sonstige Resistenzmechanismen mehr oder weniger zufällig eine Überlebensstrategie erworben haben, heranwachsen. Solche Zellklone können bei der Analyse die Ausbeute an transfizierten Zellen enorm senken. Eine zu niedrige Konzentration kann es aber auch der Zelle ermöglichen, bei einer relativ geringen Menge von ins Genom eingebauten Kopien des Transgens (und damit auch Resistenzgenen) zu überleben, was zu stabil transfizierten Zellen führt, die nur einen geringen Expressionslevel des Transgens aufweisen.

Bei einer zu hohen Konzentration des Selektionsantibiotikums werden zu viele und möglicherweise auch transfizierte Zellen abgetötet, was in einer zu geringen Ausbeute und einer reduzierten Stabilität der entstehenden Zellen resultiert. Außerdem zeigen Zellen, die unter einem zu hohen Selektionsdruck stehen, verschiedene Streßsymptome wie verlangsamtes Wachstum oder eine stärkere Tendenz zum Ablösen von der Wachstumsoberfläche.

Antibiotikum	CHO	Vero	HeLa
Blasticidin	10 µg/ml S 10 µg/ml K		
Hygromycin B	150 µg/ml S 100 µg/ml K	200 µg/ml S 150 µg/ml K	
Geneticin (G418)	400 µg/ml S 400 µg/ml K	1500 µg/ml S 1500 µg/ml K	800 µg/ml S 500 µg/ml K
Zeocin	400 µg/ml S 300 µg/ml K	400 µg/ml S 300 µg/ml K	

Abbildung 3.20: Letale Konzentrationen der verwendeten Selektionsantibiotika für verschiedene Zelltypen bei Selektion (S) und Kultivierung (K)

Für die Bestimmung der optimalen Antibiotikakonzentrationen bei der Selektion verschiedener Zelltypen wurde eine sogenannte Letalitätskurve durchgeführt, bei der die Zellen in getrennten Ansätzen einer steigenden Konzentration des Antibiotikums ausgesetzt wurden. Die niedrigste Konzentration, bei der nach einer adäquaten Inkubationszeit (sieben bis vierzehn Tage, Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage) alle untransfizierten Zellen abgetötet werden, gilt als Schwellenwert. Um die Konzentration für die Selektion stabil transfizierter Zellen

festzulegen, werden auf diesen Wert etwa 10-30 % aufgeschlagen. Bei der Passage der so erhaltenen stabil transfizierten Zellen genügt zur Aufrechterhaltung des Transgens in den meisten Fällen eine Konzentration von 10 % über diesem Schwellenwert.

Die endgültigen Konzentrationen für die Selektion beziehungsweise Kultivierung sind dabei so gewählt, daß untransfizierte Zellen nach einer Selektionsdauer von einer Woche quantitativ abgestorben sind. Zur Selektion (**S**) während der ersten fünf bis acht Tage kann eine etwas höhere Konzentration angewendet werden als zur späteren standardmäßigen Kultivierung (**K**) der Zellen (siehe Abbildung 3.20).

Je nach Wirkungsmechanismus des Antibiotikums war eine mehr oder weniger scharf abgegrenzte Letalitätsschwelle zu beobachten. So kann es bei einem weniger restriktiv wirkenden Antibiotikum (wie beispielsweise Zeocin) über einen recht weiten Konzentrationsbereich zum Heranwachsen von kleinen Zellklonen kommen, die in ihrer Morphologie und ihrem Wachstumsverhalten sehr unterschiedlich sind und nur sehr schwer von transfizierten Zellklonen differenziert werden können.

Jedes Selektionsantibiotikum hat eine ganz charakteristische Wirkung auf die Zellen. Translationsinhibitoren (Blasticidin, Hygromycin B oder G418) sind prinzipiell sehr effektiv in ihrer cytoziden Wirkung. Bei Verwendung von Zeocin allerdings ist schon bei sehr niedrigen Konzentrationen (ab 30 ng/µl) eine Beeinträchtigung der Zellen zu beobachten. Diese Zellen schwellen an und bilden Riesenzellgebilde mit teilweise mehreren Kernen, bei denen das Cytoskelett sehr deutlich zu sehen ist. Allerdings finden sich bei solchen zu niedrigen Konzentrationen sehr viele Zellklone, die scheinbar ohne Beeinträchtigung weiterwachsen.

Zeocin scheint also in diesen niedrigen Konzentrationen noch keine sehr ausgeprägt zellschädigende Wirkung zu haben. Der Vorgang des von Zeocin verursachten Absterbens unterscheidet sich generell von denen anderer Antibiotika. Die Zellen sterben nicht ab, schwimmen im Medium und werden mit dem Mediumwechsel entfernt, wie es bei anderen Antibiotika der Fall ist. Vielmehr wird die Zellmembran aufgelöst, das Cytoskelett bleibt übrig und haftet am Boden des Zellkulturgefäßes. Dadurch ist der Boden des Zellkulturgefäßes von Resten von Zellbestandteilen übersät, was ein zuverlässiges Erkennen von positiven Zellklonen erst dann möglich macht, wenn diese schon relativ groß sind und aus mehreren hundert bis tausend Einzelzellen bestehen. Die für den jeweiligen Zelltyp angewendete Antibiotikakonzentration ist der Abbildung 3.20 zu entnehmen.

3.2.4 Transiente und stabile Transfektion von Säugerzellen und Herstellung stabil transfizierter, monoklonaler Zelllinien

Bei der transienten Transfektion verbleibt das transfizierte Plasmid nach der Transfektion (siehe Kapitel 5.3.5) im oder am Zellkern, ohne ins Genom integriert zu werden. Die Expression des Transgens erfolgt von dem so vorliegenden Plasmid. Auf welche Weise und durch welche Mechanismen die DNA, die durch das Transfektionsreagenz ins Cytoplasma gelangt, schließlich in den Zellkern verbracht wird, ist nicht ganz geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach transienter Transfektion lediglich Schnelltests durchgeführt, die der Überprüfung der prinzipiellen Funktionalität dienten.

Finden im Zellkern Rekombinationsereignisse statt, die zu einem Einbau der Plasmide ins Genom der Zelle führen, spricht man von einer stabilen Transfektion, beziehungsweise einer stabil transfizierten Zelllinie. Stabil transfizierte Zellklone können durch ein geeignetes, auf dem Plasmidkonstrukt lokalisiertes Antibiotikum selektioniert werden (siehe Kapitel 3.2.3; vergleiche Abbildung 3.21).

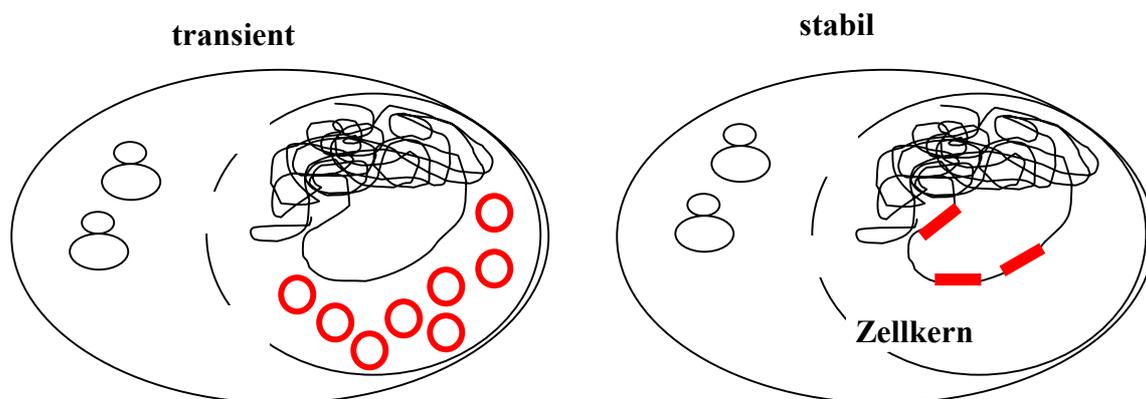


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Lokalisation der transfizierten Plasmide bei transient bzw. stabil transfizierten Zellen

Dabei ist allerdings zu beachten, daß der Einbau des Konstrukts ins Genom (je nach - möglicherweise auch zellzyklusabhängiger - Rekombinationsaktivität der Zelle) ein sehr ineffektiver Vorgang ist und es nicht selten zum Einbau lediglich eines einzigen Expressionskonstruktes ins zelluläre Genom kommt (persönliche Kommunikation mit der Firma Invitrogen; Knippers, 1997; Lodish *et al.*, 1995). Die Effizienz des Einbaus der transfizierten DNA ins zelluläre Genom ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen: So werden bei der Rekombination wahr-

scheinlich bei weitem nicht alle im Zellkern vorliegenden DNA-Konstrukte ins Genom übernommen. Außerdem kann durch die zellulären Rekombinationssysteme nicht gewährleistet werden, daß bei jedem Rekombinationsereignis das gesamte Konstrukt vollständig mitsamt Transgen und Resistenzmarker ins Genom übernommen wird. Desweiteren ist der genomische *locus* der Insertion zufällig; das bedeutet, daß möglicherweise lebenswichtige Gene der Zelle getroffen und inaktiviert werden, was zum Absterben dieser Zelle und dem Verlust dieses Zellklons führt. Ein sehr wichtiger Punkt ist dabei auch die für den Einbau ins Genom notwendige Linearisierung des Plasmids: diese wird durch zelluläre Systeme an einer zufälligen Stelle im Plasmid vorgenommen und kann somit auch essentielle Sequenzbereiche treffen.

Generell muß man bei der Herstellung von stabil transfizierten Zellen für die Anzahl der erhaltenen stabilen Transfektanten mit einer Ausbeute rechnen, die zirka 10-30 % von dem beträgt, was man an transfizierten Zellen nach transienter Transfektion erwarten kann. Von den erhaltenen stabilen Transfektanten sind erfahrungsgemäß wiederum nur 10-20 % brauchbar bezüglich der Expression des Transgens, des Wachstumsverhaltens und der allgemeinen Zellstabilität (was sich beispielsweise in der Stabilität gegenüber Trypsin/ EDTA oder den Wachstums- und Adhäsionseigenschaften bemerkbar macht). Von diesen verbleibenden Zellklonen werden durch geeignete experimentelle Nachweisverfahren diejenigen Zellklone bestimmt, die den gewünschten Anforderungen am besten gerecht werden (beispielsweise die Höhe des Expressionslevels, bei induzierbarer Expression die Parameter bei der Induktion oder etwa die Höhe der Basisexpression im uninduzierten Zustand).

Im Rahmen dieser Arbeit hatte sich für die Selektion stabiler Transfektanten und die Herstellung stabil transfizierter, monoklonaler Zelllinien folgende Vorgehensweise entwickelt: Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion zu einer Konfluenz von 15-20 % in Six-Well-Zellkulturplatten ausgelegt (je weniger dicht die Zellen bei der Transfektion auf der Platte sind, desto höher ist die Transfektionseffizienz; die geringere Dichte des Zellrasens ist außerdem vorteilhaft für eine effektive Wirkung des Selektionsantibiotikums). Zwei Tage nach der Transfektion begann die Selektion mit der geeigneten, vorher bestimmten Konzentration an Selektionsantibiotikum (siehe Kapitel 3.2.3). Nach einer Selektionszeit von 8-14 Tagen erschienen auf einer Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte etwa 300-500 gut sichtbare Zellklone (einige tausend Zellen pro Zellklon), von denen eine geeignete Anzahl nach Markierung auf der Unterseite des Zellkulturgefäßes unter dem Mikroskop mit einer 20 µl Gilson-Pipette und 5 µl einer Trypsin/ EDTA-Lösung durch mehrmaliges Auf- und Ab-

pipettieren abgelöst und auf eine Vertiefung einer 24-Well-Platte transferiert werden konnten. Bei Konfluenz konnten die Zellklone auf je eine Vertiefung einer 48-Well-Zellkulturplatte übertragen werden. Diese Zellklone konnten dann zur Monoklonalisierung von der 48-Well-Zellkulturplatte abtrypsiniert werden.

Zur Monoklonalisierung mußte die Zellzahl in dieser Suspension nun möglichst genau bestimmt werden (siehe Kapitel 5.3.3). Diese Zellsuspension wurde so verdünnt, daß statistisch immer rund 0,3-0,6 Zellen auf eine Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgelegt werden konnten. Nach einer Inkubation von einigen Tagen konnten die so angefertigten Zellkulturen mit Hilfe des Lichtmikroskops überprüft werden. Vertiefungen mit mehr als einem Zellklon (nicht mehr monoklonal!), sowie Vertiefungen ohne Zellklon wurden sofort für die Vernichtung markiert und mit 2 % Lorasol/ Intersporol aufgefüllt. Die Vertiefungen mit genau einem Zellklon wurden weiter kultiviert und konnten nach Übertragung in ein Zellkulturgefäß der geeigneten Größe (Six-Well-Zellkulturplatte) einer Überprüfung unterzogen werden. So erhaltene Zellklone, die sich in entsprechenden Nachweisverfahren als positiv erwiesen hatten, konnten für die Versuche verwendet werden. Diese Zellklone stammten von einer Zelle ab, sind also monoklonal.

3.2.5 Herstellung und Charakterisierung der stabil transfizierten, konstitutiv HN-Protein exprimierenden Zelllinie CHO-pcDI18-HN

Zur Etablierung und Optimierung der Arbeitsmethodik bei der Herstellung stabil transfizierter Zellen und der Monoklonalisierungsprozedur sollte eine stabil transfizierte und konstitutiv HN-Protein exprimierende Zelllinie auf CHO-Basis hergestellt werden. Außerdem sollten mit dieser Zelle prinzipielle Parameter der zellulären HN-Protein Expression untersucht werden. Eine stabil transfizierte und konstitutiv HN-Protein exprimierende, monoklonale Zelllinie würde desweiteren auch als Positivkontrolle bei anderen HN-Protein Expressionsexperimenten herangezogen werden können. Mit der Herstellung dieser stabil transfizierten, monoklonalen Zelllinie sollte zudem die Verbindung zur Dissertationsarbeit von Susanne Fischer (1998) hergestellt werden.

Zur Herstellung der stabil transfizierten Zelllinie CHO-pcDI18-HN wurden CHO-Gene-Switch™-Zellen am Vortag der Transfektion zu einer Konfluenz von etwa 40 % auf Six-Well-Zellkulturplatten ausgelegt. Die Transfektion der Zellen mit 2 µg des Plasmids pcDI18-HN (siehe Kapitel 5.3.5) sowie die Herstellung stabil transfizierter Zellen erfolgten nach Standardvorschrift (siehe Kapitel 3.2.4). Die Selektion (zwölf Tage) wurde mit 400 µg/ ml

G418 durchgeführt. Nach der zwölf-tägigen Selektion durch das Antibiotikum G418 waren auf einer Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte etwa einige hundert G418-resistente Zellklone herangewachsen. Davon wurden 24 Zellklone mit einer 20 µl-Gilson-Pipette und 5 µl Trypsin/ EDTA von der Platte gelöst und auf je eine Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatte übertragen. Nach einer Beurteilung der HN-Protein Expression durch einen HAD-Test wurden die besten fünf Zellklone zur Monoklonalisierung (siehe Kapitel 3.2.4) auf je eine Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte übertragen. Davon wurden am Ende 16 Klone, die sich nach einer Beurteilung durch einen HAD-Test als stark und homogen HN-Protein exprimierend erwiesen hatten, ausgewählt und sukzessive auf größere Zellkulturplatten überführt, um schließlich in flüssigem Stickstoff konserviert zu werden. Diese Zellklone wurden auch bei der weiteren Kultivierung unter ständigem Selektionsdruck gehalten (400 µg/ ml G418).

Ein unmittelbar nach der Monoklonalisierungsprozedur durchgeführter HAD-Test zeigte deutlich den sehr ausgeprägten Erythrocytenbelag auf den Zellen und damit den hohen HN-Protein Expressionslevel (siehe Abbildung 3.22). Nahezu 100 % der Zellen waren in diesem Stadium mit Erythrocyten bedeckt. Bereits nach zehn Zellpassagen nach der Monoklonalisierungsprozedur (die Zellen waren dabei mit 400 µg/ ml G418 unter ständigem Selektionsdruck gehalten worden) wurde der Anteil an HAD-positiven Zellen in der Kultur geringer, nach 20 Zellpassagen waren nur noch sporadisch einige HAD-positive *spots* zu erkennen (siehe Abbildung 3.22). Die Höhe des HN-Protein Expressionslevels ging also mit steigender Anzahl der Zellpassagen stark zurück. Bei der identischen Versuchsanordnung mit stabil transfizierten und konstitutiv eGFP-exprimierenden Zellen (stabile Transfektion von CHO-Gene-Switch™-Zellen mit dem Plasmid pcDI18-eGFP; Daten nicht gezeigt) konnte kein Phänomen dieser Art beobachtet werden.

Die HN-Protein Expression in diesen Zellen nahm also mit zunehmendem Alter der Zellen stark ab, bis schließlich nach etwa 20 Passagen mittels HAD-Test keine HN-Protein Expression mehr zu detektieren war. Falls diese Beobachtung ein prinzipielles Problem der längerfristigen HN-Protein Expression auf der Zelloberfläche beschreiben sollte, falls also die längerfristige Präsenz des HN-Proteins den Zellen Schwierigkeiten machen sollte, dann wäre eine regulierbare Expression des HN-Proteins zum Schutz der Zellen ein großer Vorteil (siehe Kapitel 4). Auch Susanne Fischer (Fischer, 1998) hatte bereits konstitutiv HN-Protein exprimierende Zellen hergestellt: Bei diesen konnte allerdings kein solches Phänomen beobachtet werden.

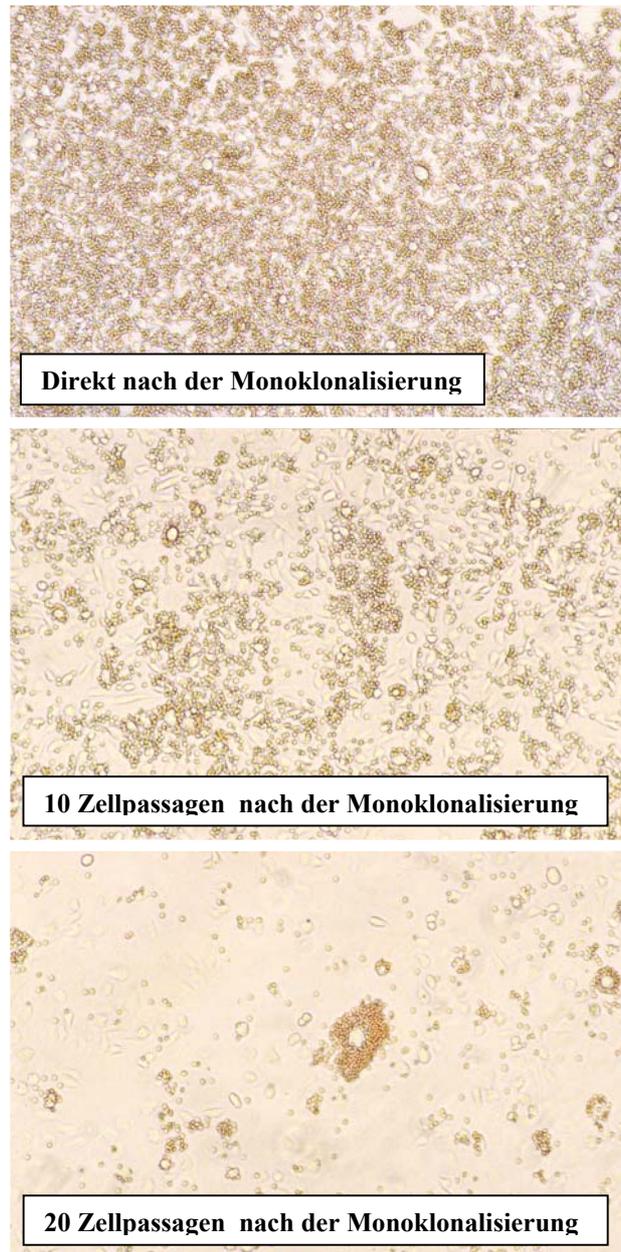


Abbildung 3.22: Nachweis der HN-Protein Expression auf der Zelllinie CHO-pcDI18-HN mittels HAD-Test zu unterschiedlichen Zeiten nach der Monoklonalisierung

3.2.6 Herstellung und Vermehrung rekombinanter Sendai Viren

Für eine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle sind folgende Eigenschaften unbedingt erforderlich: Die Neuraminidaseaktivität muß vor der Infektion so weit herunterreguliert werden können, daß eine Infektion dieser Zellen durch das Sendai Virus ermöglicht wird; nach der Infektion muß ein für die Herstellung rekombinanter Sendai Viren ausreichender HN-Protein Expressionslevel vorhanden sein und nach Ablauf des Replikati-

onszyklus muß die Neuraminidaseaktivität für eine Loslösung der Sendai Viren von der Zelle sorgen können. Bei Vorhandensein dieser Eigenschaften ist das finale Testsystem für eine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle zur Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren der Einsatz als HN-Protein transkomplementierende Helferzelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren. Dazu müssen HN-defiziente Sendai Viren initial hergestellt werden können. Um ein geeignetes, homolog hergestelltes Wildtyp-Sendai Virus als Positivkontrolle zur Verfügung zu haben, wurden nicht nur HN-defiziente Sendai Viren, sondern auch Sendai Viren mit voller Genomlänge nach der gleichen Methode unter Verwendung der gleichen Methodik und Reagenzien initial hergestellt. Für die Vermehrung der Wildtyp-Sendai Viren wurden CHO-Zellen eingesetzt.

Der erste Schritt bei der Herstellung rekombinanter Sendai Viren in Zellkultur ist die Infektion der initialen Herstellungszellen (HeLa) mit einem MVA-T7-Helfervirus, das die T7-Polymerase in den Zellen exprimiert (Sutter *et al.*, 1995). Dieses Virus ist replikationsdefizient und kann sich nach der ersten Infektion in diesen Zellen nicht mehr vermehren. Mit Hilfe der T7-Polymerase kann das unter der Kontrolle des T7-Promotors stehende Sendai Virus Genom von dem Plasmid pRS-cDNA und die N-, P- und L-Proteine von den transfizierten pTM-Plasmiden abgelesen werden, so daß im Cytoplasma nun sowohl die genomische RNA des Sendai Virus (in antigenomischer Orientierung) als auch die N-, P- und L-Proteine vorliegen. Letztere sind notwendig zur Herstellung des initialen Polymerasekomplexes für die Transkription und die Replikation. Das Sendai Virus besitzt eine negativsträngige RNA als Genom und muß daher für die Initiierung eines normalen Replikationszyklus auf diesen Proteinkomplex *in trans* zurückgreifen können. So kann ein Nukleokapsid gebildet werden.

Dieses Nukleokapsid ist mit N-Proteinen komplexiert und kann in eine genomische RNA in Negativstrangorientierung umgeschrieben werden. Dieses Genom dient nun als Matrize sowohl für den normalen Replikationszyklus, als auch für die Transkription der Gene. Eine weitere Umschreibung dieses DNA-Moleküls in ein Positivstrang-Genom ist notwendig, um Matrizen für die endgültige Herstellung der Negativstrang-Genome zu erhalten. Von diesen Negativstrang-Genomen werden nun die Membranproteine HN und F und das Matrixprotein synthetisiert. Die Proteine werden in die Zellmembran eingelagert und bilden zusammen mit dem M-Protein die Strukturen, an denen dann der *budding*-Prozeß stattfindet (siehe Kapitel 2.1.5). Nach der Freisetzung der Viren befinden sich diese im Medium und können zur Vermehrung auf die nächsten Zellen transferiert werden (Viruspassage, siehe unten). Die Ausbeute beträgt bei einer Zellzahl von etwa 800.000 Zellen pro Vertiefung einer Six-Well-

Zellkulturplatte mindestens einige hundert initial hergestellte, infektiöse Sendai Virus Partikel (siehe Abbildung 3.23).

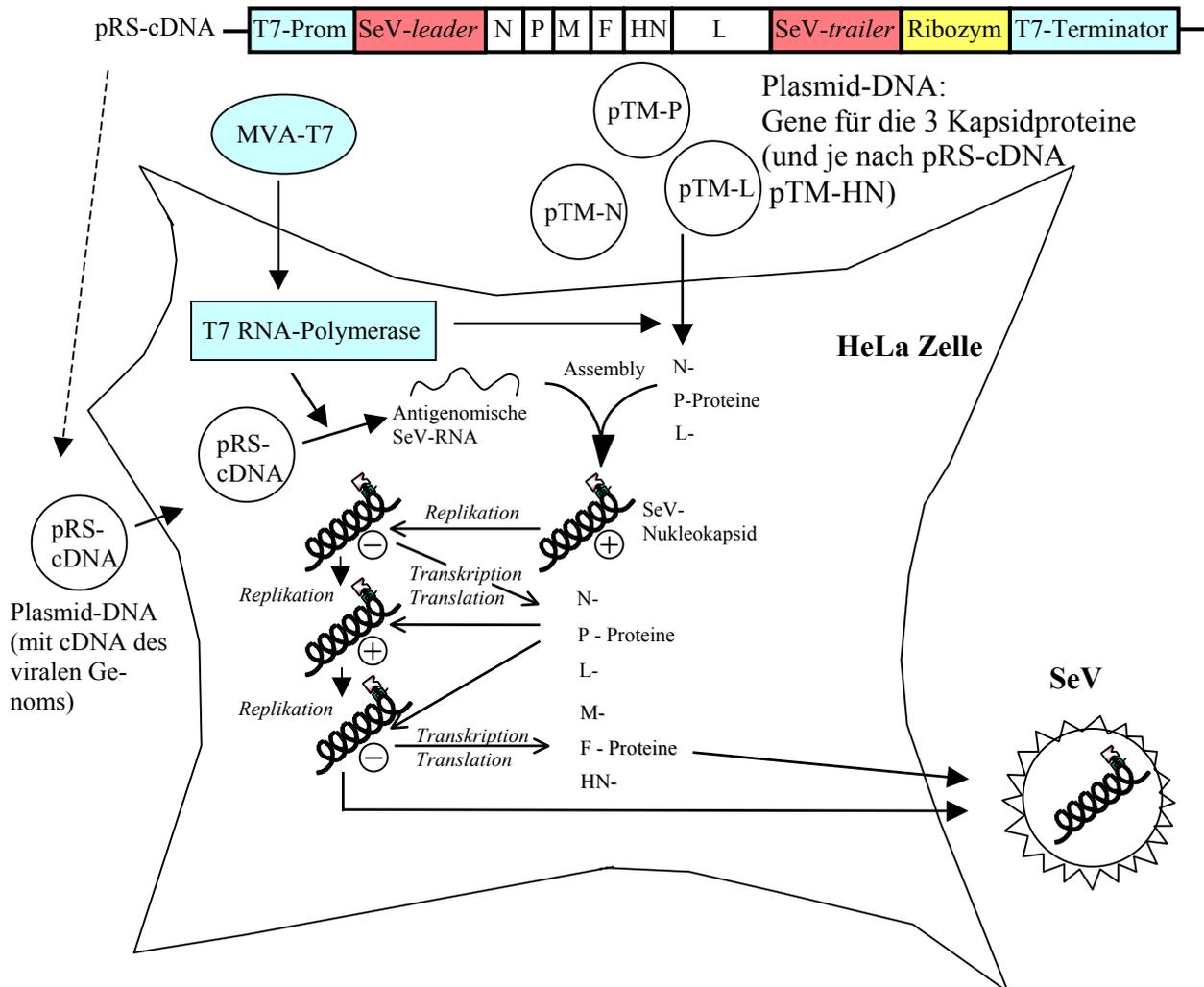


Abbildung 3.23: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der initialen Herstellung rekombinanter Sendai Viren

Bei dieser Herstellungsmethode rekombinanter Sendai Viren können unterschiedliche pRS-cDNA-Plasmide verwendet werden. Genome mit voller Länge, die zusätzlich ein Reporter-gen (eGFP, β -Galaktosidase) eingebaut haben, können für einen leichten Nachweis der rekombinant hergestellten Viren herangezogen werden. Als HN-defizientes pRS-Konstrukt wurde pRS-ld-eGFP- Δ HN eingesetzt, als Positivkontrolle diente pRS-ld-eGFP.

Bei der Herstellung rekombinanter Sendai Viren mit genomischen cDNA-Konstrukten, die defizient sind für eines oder mehrere virale Gene, muß darauf geachtet werden, daß die fehlenden Gene beziehungsweise Proteine bei der initialen Herstellung von zusätzlichen Ex-

pressionsplasmiden (pTM-Plasmide) beziehungsweise bei den Viruspassagen von stabil mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transfizierten Zellen zur Verfügung gestellt werden. Außerdem muß bei der Konstruktion dieser pRS-cDNA-Plasmide darauf geachtet werden, daß molekularbiologische Eigenheiten des Sendai Virus eingehalten werden, wie beispielsweise die *rule of six* oder das Vorhandensein der korrekten intergenischen Sequenzen zwischen den Leserahmen der einzelnen Gene (siehe Kapitel 2.1.4; Abbildung 2.3).

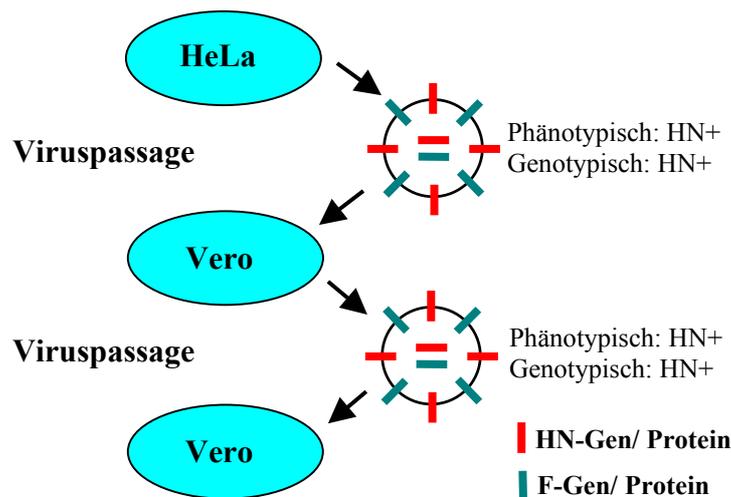


Abbildung 3.24: Schema zur Passagierung von Sendai Viren mit voller Genomlänge

Um die initial hergestellten Sendai Viren zu vermehren und von Überresten der DNA von der Transfektion und des Helfervirus MVA-T7 zu befreien, werden Viruspassagen durchgeführt (siehe Abbildung 3.24). Bei der Viruspassagierung werden die aus den Zellen entlassenen rekombinanten Sendai Viren auf immer wieder frische Passagezellen transferiert. Die erste Viruspassage (VP1), also die erste Passagierung der initial hergestellten Sendai Viren auf sogenannte Passage- oder Vermehrungszellen, erfolgte nach 60 Stunden: Dabei wurden die HeLa-Zellen mit einem Zellschaber ins Medium abgelöst und zusammen mit dem Medium in ein 2,0 ml ERG überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (3000 rpm, 4 min, 20°C) wurde der Überstand zur proteolytischen Aktivierung des F-Proteins mit 4 µg/ ml Acetyltrypsin inkubiert (30 min, RT). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dieser Ansatz auf die Passagezellen gegeben. Standardmäßig kamen für die Passagierung von HN-haltigen Sendai Viren Vero-

Zellen zum Einsatz. Die Passagezellen sollten zum Zeitpunkt der Infektion zu 90-100 % konfluent sein.

Für die Durchführung der Viruspassagierung gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: Der virushaltige Überstand kann für die gesamte Zeit des viralen Replikationszyklus auf den neuen Passagezellen belassen werden. Durch die Notwendigkeit der Anwesenheit von Acetyltrypsin im Medium (zur F-Aktivierung; siehe Kapitel 2.1.3.2) kann es bei labilen Zellen (CHO) zur Ablösung der Zellen von der Wachstumsoberfläche kommen. Einmal auf den Passagezellen entstandene Sendai Viren können allerdings sofort wieder neue Viren infizieren. Auf diese Weise kommt es zu einer sehr effektiven Virusvermehrung während der Viruspassagen. Diese Art der Viruspassage wird mit *multi round* bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden die Viruspassagen allerdings prinzipiell so durchgeführt, daß die Passagezellen nach der Applikation des virushaltigen Überstandes nach einer Inkubationszeit von 1.30 h bei 33°C zweimal mit je 1 ml Medium ohne FKS gewaschen und dann mit 1 ml Medium ohne FKS überschichtet wurden. Nach einer Inkubationszeit von 60 h bei 33°C wurde der virushaltige Überstand von diesen Zellen abgenommen und es konnte die zweite Viruspassage (VP2) erfolgen. Dazu wurde der Überstand für 30 min bei RT mit Acetyltrypsin (4 µg/ ml) inkubiert (Aktivierung des F-Proteins; siehe Kapitel 2.1.3.2), um hierauf direkt auf die neuen Passagezellen gegeben zu werden. Nach 1.30 h (Adsorptionszeit) konnte der Überstand wieder abgenommen und gegen 1 ml Medium ohne FKS ersetzt werden. Diese Form der Viruspassagierung wird mit *single round* bezeichnet.

Ein initial hergestelltes Sendai Virus kann auf diese Weise durch vier oder mehr aufeinanderfolgende Viruspassagen zu einem Titer im Bereich von 10^9 Viruspartikel pro Milliliter angereichert werden. Bei HN-defizienten Sendai Virus Konstrukten und bei solchen mit einem oder mehreren Transgenen liegt die Ausbeute niedriger, nämlich bei etwa 10^7 bis 10^8 Viruspartikeln pro Milliliter.

3.3 Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden Helferzelllinie

Für die Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein-exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle sollte zuerst auf ein induzierbares Expressionssystem zurückgegriffen werden: Vor der Infektion sollte eine sehr niedrige HN-Protein Basisexpression gewährleistet werden, so daß die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins nicht zu einer Zerstörung der zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus führen und die Helferzellen somit resistent gegen eine Sendai Virus Infektion machen würde, während nach der Induktion der HN-Protein Expression ein für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichender HN-Protein Expressionslevel erreicht werden sollte. Zu Ende des Infektionszyklus müßte eine für die Loslösung der Sendai Viren von der Helferzelle ausreichende Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins vorliegen.

Bei einem solchen Vorgehen für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren, das auf zellulärer Transkomplementation des HN-Proteins beruht, entstehen genotypisch HN-defiziente Sendai Viren (es wird ja mit einer HN-defizienten sendaiviralen cDNA gearbeitet), die aber phänotypisch HN-positiv sind, da ihnen das HN-Protein *in trans* von der Zelle zur Verfügung gestellt wird. Diese nur phänotypisch, nicht aber genotypisch HN-positiven Sendai Viren können Zellen über den normalen Rezeptor (endständige Neuraminsäuren auf zellulären Oberflächenproteinen und Lipiden) infizieren. Das HN-Protein wird transkomplementiert. Daher wird eine solche Zelllinie als Transkomplementationszelllinie bezeichnet.

Die Anforderungen an eine solche Helferzelle waren im Rahmen von Vorversuchen definiert worden (Fischer, 1998): Während ein HN-Protein Expressionslevel von einem Zehntel des in akut mit Sendai Virus infizierten Zellen vorliegenden HN-Protein Expressionslevels für die Herstellung infektiöser Sendai Viren noch ausreichen sollte, würde die entsprechende Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins die zellulären Rezeptoren noch zerstören und die Helferzelle somit resistent gegen eine Sendai Virus Infektion machen. Eine möglichst völlig unterdrückte HN-Protein Basisexpression im uninduzierten Zustand vor der Infektion ist daher ein entscheidendes Kriterium für die Qualität einer Helferzelle.

Das GeneSwitchTM-System (Invitrogen) verspricht eine sehr niedrige Basisexpression. Außerdem steht es kommerziell zur Verfügung und kann daher nach nur einem Klonierungsschritt, nämlich der Übertragung des Leserahmens des HN-Gens in das GeneSwitchTM-Expressionsplasmid (siehe Kapitel 3.2.1.1), rasch für die Herstellung stabil transfizierter, HN-Protein exprimierender Helferzellen eingesetzt werden.

3.3.1 Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle auf Basis des GeneSwitch™-Systems

Bei der Auswahl eines induzierbaren Expressionssystems zur Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Zelllinie wurde aus den unter Punkt 3.1.2.1 beschriebenen Gründen zuerst auf das GeneSwitch™-System zurückgegriffen: Dessen ausgeprägt niedrige Basisexpression im uninduzierten Zustand schien für die Erfordernisse der Helferzelle der wichtigste Faktor zu sein, um die Infizierbarkeit der Helferzelle durch Absenkung der Neuraminidaseaktivität in jedem Fall zu gewährleisten.

3.3.1.1 Bestimmung der Basisexpression des GeneSwitch™-Systems

Eine Abschätzung der Basisexpression des GeneSwitch™-Systems sollte durch einen β -Galaktosidase Färbetest nach transients Transfektion von CHO-GeneSwitch™-Zellen mit dem Expressionsplasmid placZ erfolgen.

Das Plasmid placZ ist ein induzierbar β -Galaktosidase-exprimierender Vektor auf Basis des Plasmids pGeneA/V5-His-A. Dieses Plasmid wird von der Firma Invitrogen als Teil des GeneSwitch™-Systems mitgeliefert und kann für eine schnelle Kontrolle der Funktionsfähigkeit und der Induktionsparameter des Systems verwendet werden. Die Transfektion wurde mit Hilfe der Calciumphosphatpräzipitation (siehe Kapitel 5.3.5.2) durchgeführt. Von dem Expressionsplasmid placZ wurde pro Vertiefung auf einer Six-Well-Zellkulturplatte eine Menge von 2 μ g eingesetzt.

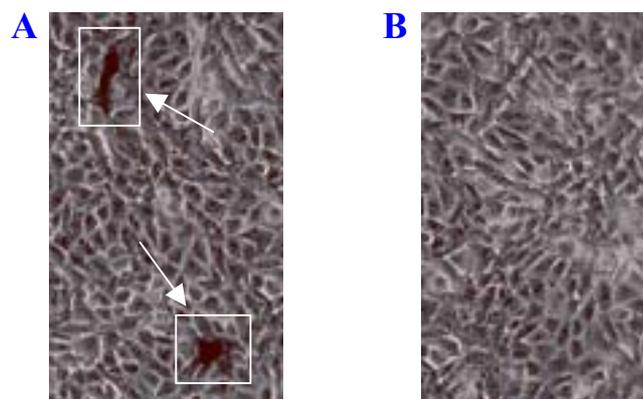


Abbildung 3.25: Nachweis der β -Galaktosidase-Expression in CHO-GeneSwitch™-Zellen nach transients Transfektion mit dem β -Galaktosidase-Expressionsplasmid placZ und Induktion mit Mifepristone (A) bzw. ohne Induktion (B).

Am dritten Tag nach der Transfektion wurde mit einem Teil der Ansätze nach standardmäßiger Induktion mit 10^{-8} M Mifepristone für 24 h ein β -Galaktosidase-Färbetest (siehe Kapitel 5.4.6) durchgeführt. Nach diesem Nachweistest waren etwa 50-100 Zellen, die eine durch die β -Galaktosidase-Färbung bedingte Blaufärbung aufwiesen, auf einer Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte zu sehen (siehe Abbildung 3.25, **A**). Diese relativ geringe Transfektionseffizienz ist bedingt durch die Methode der Calciumphosphatpräzipitation, hat aber keine Auswirkung auf das hier erhaltene Ergebnis, da beim Nachweis der β -Galaktosidase Expression nicht die Gesamtzahl der transfizierten Zellen, sondern die Intensität der Blaufärbung in einer einzigen Zelle entscheidend ist. Um eine höhere Transfektionseffizienz zu erzielen, wurde nach diesem ersten Transfektionsexperiment für die Transfektion von CHO-Zellen standardmäßig die Methode der Lipofektion gewählt (Lipofektionsreagenz: LipofectAMINE PLUS) (vergleiche Kapitel 3.2.2)

In einem Parallelansatz (Negativkontrolle - Abschätzung der Basisexpression im uninduzierten Zustand), in dem keine Induktion der β -Galaktosidase-Expression erfolgte (siehe Abbildung 3.25, **B**), konnten bei der β -Galaktosidase-Färbung auch nach längerer Inkubation (72 h) keine blauen Zellen entdeckt werden. Dabei wurde die β -Galaktosidase-Färbelösung im Verhältnis 1: 1 mit F12-Medium gemischt, um eine Beeinträchtigung der Zellen über einen so langen Zeitraum so gering wie möglich zu halten. Die β -Galaktosidase-Färbereaktion gilt vor allem bei einer so langen Inkubationszeit als sehr sensibler Nachweistest (enzymatische Funktion der β -Galaktosidase). Trotzdem konnte in diesem Versuch auch nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden keine β -Galaktosidase Aktivität nachgewiesen werden. Eine β -Galaktosidase Basisexpression ist also mit diesem Nachweis nicht detektierbar. Dieses Ergebnis zeigt deutlich die sehr niedrige Basisexpression des GeneSwitch™-Systems im uninduzierten Zustand.

3.3.1.2 Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender Helferzellen auf Basis des GeneSwitch™-Systems

Eine sehr niedrige Basisexpression ist für die Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle eine entscheidende Eigenschaft, da die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins im uninduzierten Zustand dann die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus nicht zerstören und so eine Infektion der Helferzellen im Rahmen der Viruspassagen möglich machen sollte. Im Versuch (siehe Kapitel 3.3.1.1) konnte gezeigt werden, daß das GeneSwitch™-System im uninduzierten Zustand eine nicht nachweisbare Basisexpres-

sion (β -Galaktosidase-Färbetest) besitzt. Nach diesem vielversprechenden, positiven Resultat sollte eine stabil transfizierte, HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle auf Basis des GeneSwitchTM-System hergestellt werden.

Dazu wurden CHO-GeneSwitchTM-Zellen mit dem induzierbaren Expressionsplasmid pGene/V5-His-A-HN (siehe Kapitel 3.2.1.1) transfiziert. Um eine optimale Transfektionseffizienz zu erreichen, wurde die Transfektion mit dem Lipofektionsreagenz LipofectAMINE PLUS nach den Angaben des Herstellers (siehe Kapitel 5.3.5) durchgeführt. In separaten Ansätzen wurden Plasmidmengen von 2 μ g, 5 μ g beziehungsweise 10 μ g pro Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte für die Transfektion eingesetzt. Die CHO-GeneSwitchTM-Zellen wurden am Tag der Transfektion zu einer Konfluenz von 10-15 % in Six-Well-Zellkulturplatten ausgelegt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10^{-8} M Mifepristone für 24 h induziert und am folgenden Tag einem HAD-Test (siehe Kapitel 5.5.2) zum Nachweis der HN-Protein Expression unterzogen.

Dabei zeigte sich, daß pro Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte etwa 2000-4000 HAD-positive Zellen vorlagen, was unter Berücksichtigung der Zellzahl bei der Transfektion einer Transfektionseffizienz von etwa 5-10 % entspricht. Damit liegt eine ausreichend hohe Ausbeute an transfizierten Zellen vor, um statistische Fehler auszuschließen. Außerdem ist diese Transfektionseffizienz nicht zu hoch für das „Picken“ stabil transfizierter Zellklone: Bei einer zu hohen Transfektionseffizienz würden die Zellklone nach der Selektion stabiler Transfektanten schnell ineinander wachsen, so daß der Transfer einzelner Zellklone auf eine neue Zellkulturplatte nicht mehr möglich ist, ohne ein Vermischen verschiedener Zellklone zu riskieren. Eine nicht ganz so hohe Transfektionseffizienz ist daher nicht von Nachteil.

Nach dieser Überprüfung der Transfektionseffizienz im transienten Zustand wurde dieselbe Zellpopulation einer vierzehntägigen Selektion mit 600 μ g/ml Zeocin unterzogen (zusätzlich wurden diese Zellen zur Erhaltung des stabil transfizierten Gens für das regulatorische GeneSwitchTM-Protein generell unter 100 μ g/ml Hygromycin B kultiviert). Nach dieser Selektionszeit waren die nichtresistenten Zellen abgestorben und deutliche Zellklone zu sehen. Die Anzahl der resistenten Zellklone ist nach der Selektion um einen Faktor von ungefähr 10-20 geringer als die Anzahl der transfizierten Zellen nach der transienten Transfektion. Die Zellklone wachsen in dieser Phase der Selektion langsamer als untransfizierte Zellen unter normalen Bedingungen. Diese Verzögerung im Wachstum ist aber offensichtlich weniger auf den starken Selektionsstreß bedingt durch das Selektionsantibiotikum zurückzuführen. Vielmehr scheint ein verzögertes Wachstum auf möglicherweise toxische oder wachstums-

hemmende Stoffwechszwischenprodukte, die von absterbenden nichtresistenten Zellen abgegeben werden und sich trotz regelmäßigem Mediumwechsels während der Selektionsphase im Selektionsmedium ansammeln, zurückzuführen sein.

Einen weiteren Grund für ein schlechtes Wachstumsmilieu stellen die engen räumlichen Verhältnisse innerhalb eines Zellklons dar: Da die Zellen innerhalb eines Zellklons von einer einzigen Zelle abstammen, müssen die Zellen bereits nach kurzer Selektionszeit und wenigen Zellteilungen übereinander wachsen, was bei intakter Kontaktinhibition nur sehr langsam vonstatten geht. Daß die Kontaktinhibition intakt ist, zeigte sich nach Transfer der Zellklone in ein neues Zellkulturgefäß: Die Zellen zeigen dann wieder normales Teilungsverhalten mit Kontaktinhibition und kehren dann auch wieder zu normaler Wachstumsgeschwindigkeit zurück.

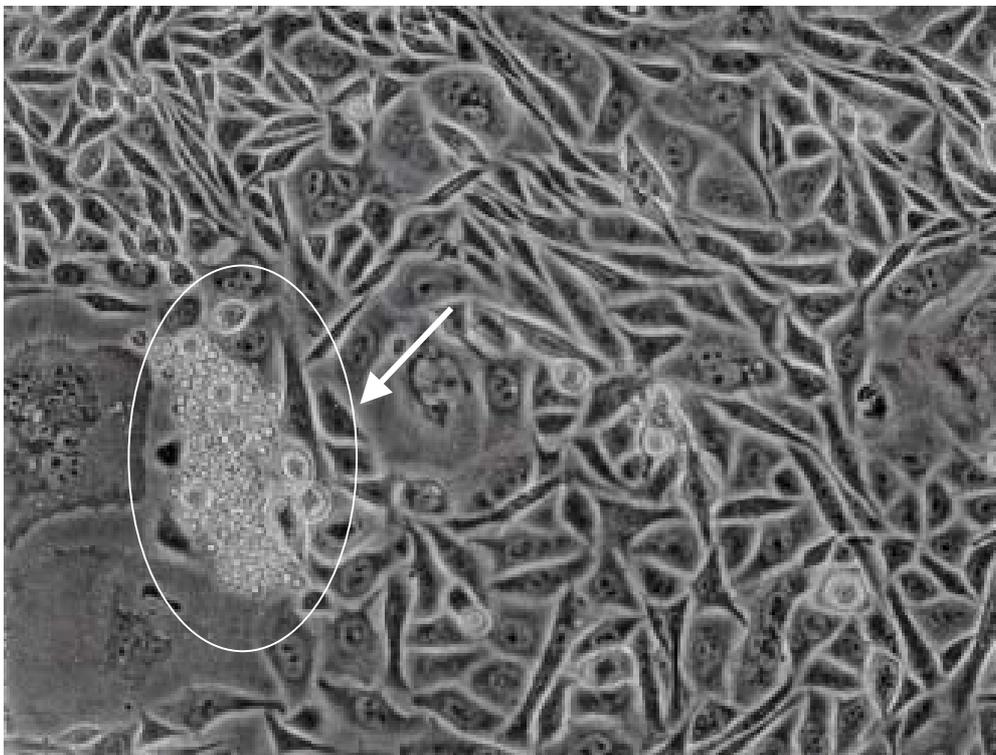


Abbildung 3.26: Nachweis der Expression des HN-Proteins auf CHO-GeneSwitch™-Zellklonen, die mit dem Plasmid pGene/V5-His-A-HN transfiziert worden waren. Der HAD-Test wurde nach einer Selektionszeit von 10 Tagen durchgeführt. Das Bild zeigt im Ausschnitt einen Zellklon, bei dem nur noch eine einzige HAD-positive Zelle zu sehen ist.

Nach transients Transfektion der CHO-GeneSwitch™-Zellen mit dem Plasmid pGene-V5/His-A-HN war nach Induktion eine Ausbeute an transfizierten Zellen von etwa 5-10 % zu

beobachten gewesen. Nach der Selektion auf stabile Transfektanten konnte bei keinem der Ansätze ein Zellklon detektiert werden, der im HAD-Test positiv gewesen wäre. Das bedeutet, daß bei keinem der stabil transfizierten, selektionierten Zellklone der HN-Protein Expressionslevel für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend ist. Dabei entsprach die Anzahl der stabil transfizierten Zellklone auf der Zellkulturplatte dem Erfahrungswert, lag also etwa um einen Faktor fünfzehn niedriger als nach transienter Transfektion.

Es ist anzunehmen, daß sich die Menge der nach transienter Transfektion im Zellkern vorhandenen (aber nicht ins Genom eingebauten) pGene/V5-His-A-HN-Plasmide mit jeder Zellteilung während der Selektion ausverdünnt hat, so daß mit zunehmender Zellzahl innerhalb des Zellklons aufgrund der sich reduzierenden Menge an Plasmidkopien ein immer schwächeres Signal im HAD-Test zu erkennen war, bis schließlich offensichtlich eine kritische Menge an membranständigen HN-Protein Molekülen unterschritten wurde und dann gar keine Erythrocytenbindung mehr zu detektieren ist. Dabei bleibt nach etwa acht- bis zehntägiger Selektion in einem großen Zellklon nur noch eine Zelle (wahrscheinlich die ursprünglich transfizierte) übrig, die sich relativ im Zentrum der Zellansammlung des Zellklons befindet. Diese Erscheinungsform ist sehr typisch für dieses Phänomen der Ausverdünnung der Plasmide mit fortschreitenden Zellteilungen (siehe Abbildung 3.26, Pfeil). Ein solcher Zellklon weist nach Übertragung der Zellen auf ein neues Zellkulturgefäß (24-Well-Zellkulturplatte) im HAD-Test keine einzige positive Zelle mehr auf. Insgesamt wurden auf diese Weise die stabil transfizierten Zellklone von 20 Six-Well-Zellkulturplatten mittels HAD-Test auf die Expression des HN-Proteins hin überprüft. Wenn man nun von einer Anzahl von etwa 1000 transfizierten Zellen auf einer Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte ausgeht, dann wurden auf diese Weise hochgerechnet etwa 120.000 Zellklone (20 Six-Well-Zellkulturplatten x 6 Vertiefungen x 1000 Zellklone pro Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte) überprüft. Alle diese stabil transfizierten Zellklone erwiesen sich im HAD-Test als negativ. Der HN-Protein Expressionslevel in diesen Zellen reicht also nicht aus, um eine Erythrocytenbindung bewirken zu können und ist daher zu niedrig für die Herstellung infektiöser Sendai Viren (Fischer, 1998). Diese Zellklone sind also nicht geeignet als HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren.

Diese Problematik war bei der Herstellung der stabil mit dem Expressionsplasmid pcDI18-HN transfizierten CHO-Zellen nicht aufgetreten. Offensichtlich handelt es sich bei dem beschriebenen Phänomen um ein Problem mit der Promotorstärke: Das GeneSwitch™-System besitzt einen verhältnismäßig schwachen Promotor, dessen Expressionsleistung für

einen im HAD-Test nachweisbaren HN-Protein Expressionslevel nur nach transienter Transfektion bei Vorliegen einer sehr großen Anzahl von Plasmidmolekülen ausreicht. Nach Selektion stabiler Transfektanten, also nach Einbau einiger weniger intakter und vollständiger Expressionskonstrukte ins zelluläre Genom, ist dieser Promotor nicht mehr in der Lage, einen ausreichend hohen HN-Protein Expressionslevel zu gewährleisten. Das Plasmid pcDI18-HN hingegen besitzt das sehr starke Promotorkonstrukt hCMV-Promotor + Intron A, das offensichtlich auch bei Vorliegen einiger weniger Plasmidkopien, wie sie nach Einbau ins zelluläre Genom vorliegen, noch in der Lage ist, einen HN-Protein Expressionslevel zu bieten, der mittels HAD-Test nachweisbar ist.

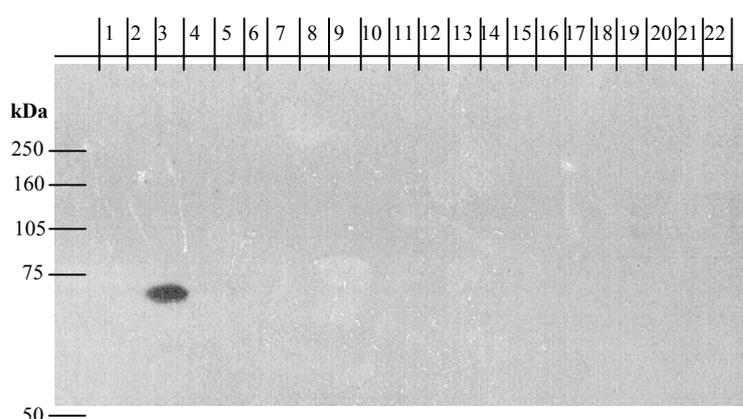


Abbildung 3.27: Nachweis des HN-Proteins im Zellextrakt stabil mit dem Plasmid pGene/V5-His-A-HN transfizierter CHO-GeneSwitch™-Zellen im Western-Blot. **Spur 1:** HeLa-Zellen; **Spur 2:** HeLa-Zellen, behandelt mit Mifepristone; **Spur 3:** CHO-GeneSwitch™- Zellen akut infiziert mit Sendai Virus (Positivkontrolle) MOI: 5 (Auftrag: 2 µg Gesamtprotein); **Spur 4-22:** Zellklone. Auftrag: jeweils 15 µg Gesamtprotein; Marker: Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences; Code Nr. RPN800). Verwendeter Antikörper: VII3c4F; Expositionszeit: 20 s.

Etwa 150 der Zellklone, die bereits mit Hilfe des HAD-Tests auf ihre HN-Protein Expression hin untersucht worden waren, wurden zusätzlich im Western-Blot auf ihre HN-Protein Expression überprüft (Standardvorgehen wie unter Punkt 5.4 beschrieben). Die Herstellung der Zellextrakte erfolgte nach Induktion der Zellen mit 10^{-8} M Mifepristone für 24 h. Wie in der Abbildung 3.27 zu sehen ist, konnte bei keinem der untersuchten Zellklone eine HN-Protein Expression detektiert werden. Die Nachweisgrenze des Western Blots bei der Detektion des HN-Protein liegt dabei bei etwa einem Zehntel der Menge, die in akut mit Sendai Virus infizierten Zellen vorliegt. Die einzige sichtbare Bande ist in **Spur 3** zu sehen. Hierbei handelt es sich um die Positivkontrolle: HeLa-Zellen akut infiziert mit einem Sendai Virus (MOI = 5). In

Spur 1 ist der Zellextrakt von HeLa-Zellen, in **Spur 2** der Zellextrakt von HeLa-Zellen, die mit Mifepristone inkubiert worden waren, aufgetragen. Dieser Ansatz diente als Kontrolle, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch unspezifische Auswirkungen des Induktors Mifepristone auf die Zellen ausschließen zu können.

Nach einer Selektionszeit von etwa zwölf Tagen (Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage) ist die Anzahl der resistenten Zellklone auf der Zellkulturplatte um einen Faktor von etwa zehn niedriger als die Zahl der transfizierten Zellen nach transienter Transfektion, was dem Erfahrungswert entspricht (siehe oben). Zusätzlich finden sich sehr viele einzelne verstreute positive Zellen auf der Zellkulturplatte, die sich offensichtlich nicht zu einem Zellklon entwickeln konnten. Von den etwa 50-100 stabil wachsenden Zellklonen auf einer Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte bestehen etwa 20-50 aus überwiegend homogen eGFP-, beziehungsweise β -Galaktosidase exprimierenden Zellen. Von dieser Anzahl weisen etwa 5-10 Zellklone eine so homogene Transgenexpression auf, daß eine Monoklonalisierung sinnvoll erscheinen würde. Die Monoklonalisierungsprozedur (siehe Kapitel 3.2.4) ist sehr aufwändig und macht daher nur dann Sinn, wenn zumindest ein Großteil (möglichst alle) der Zellen in Bezug auf die Transgenexpression positiv sind und alle Zellen eines Zellklons normale Wachstumsparameter aufweisen, in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit also nicht zu langsam sind. Bei den Reporterkonstrukten pGene/V5-His-A-lacZ und pGene/V5-His-A-eGFP wurde auf den Vorgang der Monoklonalisierung verzichtet, da diese Ansätze lediglich einer prinzipiellen Überprüfung der experimentellen Parameter, der Funktionsfähigkeit des Systems und der Vorgehensweise diente. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 3.28 zusammengefaßt.

Das Expressionsplasmid pGene/V5-His steht in drei Versionen (A, B, C) zur Verfügung. Diese unterscheiden sich in nur einem Nukleotid am Ende der *multiple cloning site*, so daß für das Anfügen des His-tags oder des V5-Epitops an das exprimierte Protein je nach verwendeter Restriktionsschnittstelle jeweils der richtige Leserahmen zur Verfügung steht. Diese Modifikationsmöglichkeiten des Transgens wurden in dieser Arbeit nicht verwendet. Um aber auszuschließen, daß eine durch die Plasmidvariante hervorgerufene Leserasterverschiebung Störungen bei der HN-Protein Expression nach stabiler Transfektion bewirkt, wurden die oben beschriebenen Expressionsversuche mit dem Plasmid pGene/V5-His-A-HN nach transienter und stabiler Transfektion auch mit den Plasmidvarianten pGene/V5-His-B-HN und pGene/V5-His-C-HN durchgeführt. Die Klonierung der Konstrukte erfolgte analog zu dem unter Punkt 3.2.1.1 beschriebenen Vorgehen. Dabei konnte auch bei Verwendung der Plasmidvarianten pGene/V5-His-B-HN und pGene/V5-His-C-HN nach transienter Transfektion

eine HN-Protein Expression detektiert werden (HAD-Test), die allerdings nach der Selektion stabiler Transfektanten nicht mehr nachweisbar war.

Plasmid	Transiente Transfektion	Stabile Transfektion - nach Selektion
Plasmid pGene/V5-His-A-lacZ	- Transfektions-effizienz: 5-10 %	- Anzahl der stabil transfizierten Zellklone nach der Selektion gleich pGene/V5-His-A-HN - einzelne verstreute blaue Zellen auf der Six-Well-Zellkulturplatte - etwa 20-50 große Zellklone mit blauer Färbung, davon 5-10 homogen β -Galaktosidase exprimierend
Plasmid pGene/V5-His-A-eGFP	- Transfektions-effizienz: 5-10 %	- Anzahl der stabil transfizierten Zellklone nach der Selektion gleich pGene/V5-His-A-HN - einzelne verstreute blaue Zellen auf der Platte - etwa 20-50 große Zellklone mit blauer Färbung, davon 5-10 homogen β -Galaktosidase exprimierend
Plasmid pGene/V5-His-A-HN	- Transfektions-effizienz: 5 %	- 100 % der Zellklone erweisen sich als negativ im HAD-Test - statistische Hochrechnung: 20 x 6 Six-Well x 1000 Klone \rightarrow 120.000 Klone wurden getestet (HAD-Test) - manche Zellklone hatten ursprünglich eine einzige HAD-positive Zelle enthalten, die aber mit zunehmenden Zellteilungen während der Selektion verschwunden war

Abbildung 3.28: Zusammenfassung der Ergebnisse bei den Versuchen zur induzierbaren Expression von Transgenen in CHO-GeneSwitch™-Zellen mit Hilfe des GeneSwitch™-Systems

Um mögliche Probleme mit dem induzierbaren Promotorsystem des Plasmids pGene/V5-His auszuschließen, wurde das HN-Gen anstelle des β -Galaktosidase-Gens in das Plasmid placZ inkloniert (Daten nicht gezeigt). Das Plasmid placZ trägt den gleichen Promotor und die gleichen regulatorischen Elemente wie das Plasmid pGene/V5-His, sowie zusätzlich den Leserahmen des β -Galaktosidase Gens. Mit diesem Plasmid war sowohl nach transienter, als auch nach stabiler Transfektion bereits erfolgreich das β -Galaktosidase Protein induzierbar exprimiert worden (siehe oben). Nach transienter Transfektion der CHO-GeneSwitch™-Zellen mit diesem Plasmid placZ-HN konnte eine HN-Protein Expression detektiert werden (HAD-Test). Erst nach der Selektion stabiler Transfektanten war eine HN-Protein Expression mittels HAD-Test auch hier nicht mehr nachweisbar.

Da sich in diesen Versuchen gezeigt hatte, daß das GeneSwitch™-System offensichtlich aufgrund seines schwachen Promotors nicht in der Lage ist, nach der Selektion stabiler Transfektanten, also nach Einbau der Plasmidkonstrukte ins zelluläre Genom, einen HN-Protein Expressionslevel zu gewährleisten, dessen Höhe für die Herstellung infektiöser Sendai Viren

ausreichend hoch gewesen wäre, konnte eine Überprüfung der Infizierbarkeit dieser stabilen Transfektanten nicht durchgeführt werden. Zudem zeigten die Resultate, daß es nicht möglich sein würde, einen HN-Protein exprimierenden Zellklon zu identifizieren. Denn es wäre bei diesen stabil transfizierten Zellen auch nach erfolgreicher Feststellung der Infektionsfähigkeit fraglich, ob diese Infektionsfähigkeit tatsächlich auf eine durch das induzierbare GeneSwitch™-Expressionssystem reduzierten Menge des HN-Proteins zurückzuführen ist oder ob die Infizierbarkeit dieser Zellen vielmehr darauf beruht, daß sie überhaupt kein HN-Protein exprimieren.

3.3.1.3 Zusammenfassung der Versuche zur Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden Helferzelle auf Basis des GeneSwitch™-Systems

Das GeneSwitch™-System zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen wurde in erster Linie aufgrund seiner sehr niedrigen Basisexpression im uninduzierten Zustand ausgewählt. Diese Eigenschaft ist einer der entscheidenden Parameter bei der Herstellung einer stabil transfizierten HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle, da die rezeptorzerstörende Neuraminidasefunktion des HN-Proteins vor der Infektion der Helferzellen unbedingt so weit abgesenkt werden muß, daß eine Infektion dieser Helferzellen durch das Sendai Virus ermöglicht wird. Eine Basisexpression des GeneSwitch™-Systems konnte auch nach Einsatz des β -Galaktosidase exprimierenden induzierbaren Expressionsplasmids placZ und Durchführung der sehr sensitiven β -Galaktosidase Nachweisreaktion tatsächlich nicht festgestellt werden. Der Einsatz des GeneSwitch™-Systems zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen würde also bezüglich einer niedrigen Basisexpression einen sehr vielversprechenden Weg zur Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle darstellen.

Im Rahmen der Experimente stellte sich dann aber heraus, daß das GeneSwitch™-System nach transients Transfektion tatsächlich in der Lage ist, einen HN-Protein Expressionslevel zu erreichen, der für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hoch ist (Nachweis durch den HAD-Test; siehe Fischer, 1998). Nach der Selektion auf stabile Transfektanten reicht die Expressionsstärke des GeneSwitch™-Systems aber offensichtlich nicht mehr für die Herstellung infektiöser Sendai Viren aus, was sich in einem negativen HAD-Test zeigte. In diesen Zellklonen konnte die Expression des HN-Proteins auch mit Hilfe des Western Blots nicht nachgewiesen werden. Die tatsächliche Infizierbarkeit der stabilen Transfekt-

tanten durch das Sendai Virus konnte nicht getestet werden. Der zweite erforderliche Parameter, nämlich ein für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hoher HN-Protein Expressionslevel, konnte mit dem GeneSwitch™-System nicht erreicht werden.

Zum Erreichen eines höheren Expressionslevels müßte das hybride pSwitch-Regulatorprotein modifiziert, das heißt mit einer neuen, stärkeren Transaktivierungsdomäne und deren entsprechender DNA-Sequenz versehen und optimiert werden. Die Ergebnisse eines solchen Vorgehens wären aber unvorhersagbar und nicht kalkulierbar: Es wäre zweifelhaft, ob eine nicht nachweisbare Basisexpression des GeneSwitch™-Systems nach diesen Modifikationen noch erreicht werden könnte. Außerdem wäre der dazu erforderliche Arbeitsaufwand bei weitem höher als der Einsatz eines alternativen induzierbaren Expressionssystems.

Aus diesem Grund wurde zur Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelllinie ein anderes induzierbares Expressionssystem mit stärkerem Promotor und höherer Expressionsleistung vorgezogen.

3.3.2 Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle auf Basis eines Tetrazyklin-abhängigen Systems

Bei den vorangegangenen Experimenten hatte sich gezeigt, daß bei Verwendung des GeneSwitch™-Systems zur Herstellung stabil transfizierter Zellen der Expressionslevel des HN-Proteins sowohl unter der Nachweisgrenze des HAD-Tests, als auch unter der des Western Blots bleibt und somit für die Herstellung infektiöser Sendai Viren nicht ausreicht. Für die Etablierung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden Helferzelle sollte daher ein anderes induzierbares Expressionssystem eingesetzt werden, das nach Induktion einen höheren HN-Protein Expressionslevel ermöglicht: Das TReX™-System ist ein auf dem hCMV-Promotor basierendes, Tetrazyklin-abhängiges induzierbares Expressionssystem. Dieser starke Promotor hat allerdings auch eine erhöhte Basisexpression im uninduzierten Zustand zur Folge. Sollte also mit Hilfe des TReX™-Systems in stabil transfizierten Zellen ein für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hoher HN-Protein Expressionslevel erreicht werden können, dann müßte durch einen Infektionstest überprüft werden, ob die Basisexpression des HN-Protein im uninduzierten Zustand niedrig genug ist, um eine Infizierbarkeit der Helferzellen zuzulassen.

Bei induzierbaren Expressionssystemen, deren Induzierbarkeit auf dem Tetrazyklin-Operator beruht, kann mit jedem beliebigen Promotor gearbeitet werden. Durch Einfügen der Tetrazyklin-Operator-Sequenz zwischen den Promotor und das Transgen kann die Expression

reversibel unterdrückt, also induzierbar gestaltet werden. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete TREx™-System nutzt den hCMV-Promotor für die Expression des HN-Proteins. In einer früheren Dissertationsarbeit wurde im Rahmen umfangreicher Untersuchungen zur Expression viraler Transgene in Säugerzellen festgestellt, daß für die Herstellung infektiöser Sendai Viren eine HN-Protein Menge von mindestens einem Zehntel der in akut mit dem Sendai Virus infizierten Zellen vorhandenen Menge notwendig ist. Dieser Expressionslevel war in stabil transfizierten Zellen, die das HN-Protein konstitutiv exprimieren, nach den Resultaten der Vorversuche (Fischer, 1998) nur mit dem Promotorkonstrukt hCMV + Intron A zu erreichen und läßt sich durch den HAD-Test (siehe Kapitel 5.5.2) nachweisen. Da sich der hCMV-Promotor des TREx™-Systems von dem hCMV-Promotor, der bei den Versuchen von Susanne Fischer (1998) eingesetzt worden war, durch Sequenzfolgen am 3'- und am 5'-Ende unterscheidet, sollte aber dennoch zunächst das TREx™-System in seiner kommerziell erhältlichen Form (also mit dem hCMV-Promotor ohne das Verstärkerelement Intron A) getestet werden. Möglicherweise würde dieser Promotor bereits einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel gewährleisten können. Sollte das nicht der Fall sein, dann sollte für die nun geplanten Experimente der hCMV-Promotor des induzierbaren TREx™-Systems auch mit dem Verstärkerelement Intron A modifiziert werden.

Die hier eingesetzten CHO-Zellen sind CHO-TREx™-Zellen, die bereits stabil mit dem Gen für das Tetrazyklin-Repressorprotein transfiziert sind. Zur Aufrechterhaltung dieses Transgens ist ein ständiger Selektionsdruck erforderlich, der durch Zugabe von 10 µg/ml Blasticidin zum normalen Zellmedium (Häm's F12) erreicht wird.

3.3.2.1 Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender CHO-TREx™-Zellen ohne Modifikation des hCMV-Promotors

Für die Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender CHO-TREx™-Zellen sollte zunächst das TREx™-System in seiner handelsüblichen Form, also ohne Modifikation des hCMV-Promotors mit dem Intron A, eingesetzt werden. Die Transfektion von CHO-TREx™-Zellen mit dem Konstrukt pcDNA5/TO-HN, in dem die Tetrazyklin-regulierbare Expression durch den hCMV-Promotor ohne Intron A gesteuert wird (siehe Kapitel 3.2.1.2) erfolgte nach Standardvorschrift (siehe Kapitel 5.3.5). Das experimentelle Vorgehen ist identisch mit dem für das GeneSwitch™-System beschriebenen (siehe Kapitel 3.3.1.2): Die CHO-TREx™-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA5/TO-HN unter Verwen-

dung des Transfektionsreagenz LipofectAMINE PLUS transfiziert, wobei pro Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte jeweils 2 μg Plasmid eingesetzt wurde.

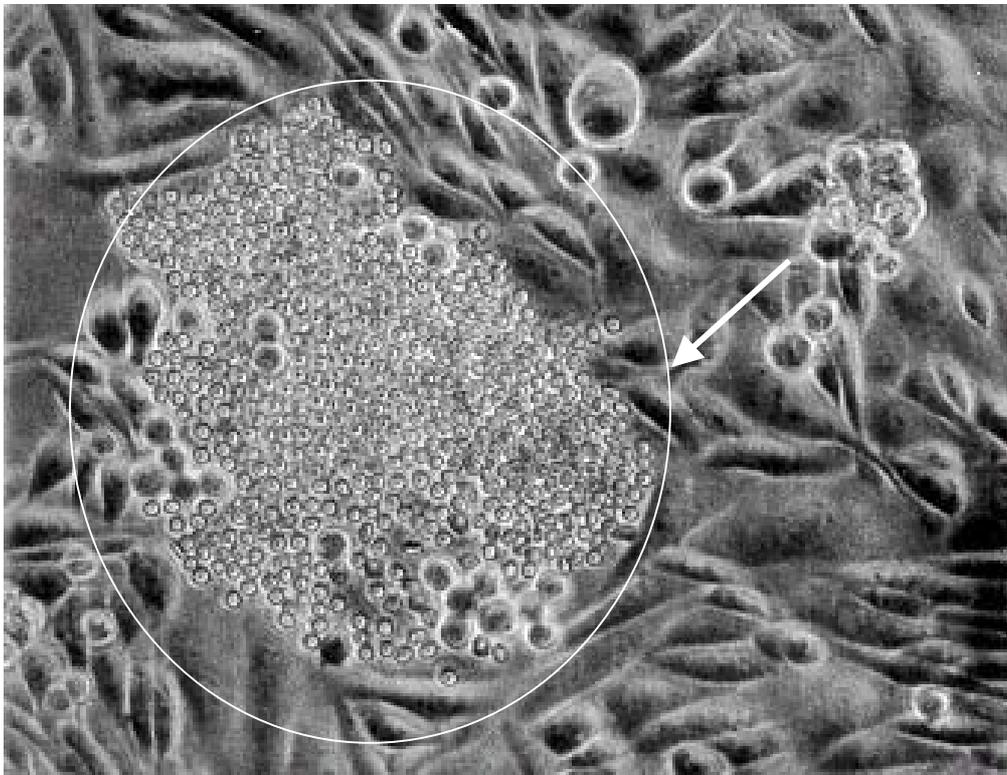


Abbildung 3.29: Nachweis der Expression des HN-Proteins auf CHO-TREx™-Zellklonen. Die Zellen waren mit dem Plasmid pcDNA5/TO-HN transfiziert worden. Der Nachweis des HN-Proteins erfolgte mittels HAD-Test nach einer Selektionszeit (Hygromycin B) von acht Tagen. Das Bild (Pfeil) zeigt einen Zellklon, bei dem nur noch einige wenige HAD-positive Zellen zu sehen sind.

Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde die Induktion mit 2 ng/ μl Tetrazyklin für 24 h vorgenommen und dann ein HAD-Test durchgeführt. Das Ergebnis dieses HAD-Tests im transienten Zustand der Transfektion gleicht dem für das GeneSwitch™-System (siehe Kapitel 3.3.1.2) beschriebenen: Es gibt auf einer Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte etwa einige hundert HAD-positive Zellen. Wird dann nach zwölf-tägiger Selektion dieser Zellen mit 150 (100) $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B ein HAD-Test durchgeführt, dann konnte bei den resistenten Zellklonen kein einziger mit einem homogenen HAD-Signal auf allen Zellen des Zellklons detektiert werden. Stattdessen befindet sich auch hier bei manchen Zellklonen innerhalb des Zellklons eine kleine Anzahl von Zellen, deren Erythrocytenbindefähigkeit im HAD-Test anfänglich (wie im transienten Zustand unmittelbar nach der Transfektion) vorhanden ist, sich

dann aber offensichtlich mit zunehmender Anzahl von Zellteilungen ausverdünnung (siehe Abbildung 3.29, Pfeil; vergleiche Abbildung 3.26, GeneSwitch™-System). Hier scheint sich bei den betroffenen Zellklonen diese Erythrocytenbindefähigkeit allerdings länger halten zu können, so daß diese Zellklone auch nach Transfer auf ein neues Zellkulturgefäß in einigen Fällen noch für wenige Zellteilungen den positiven HAD-Status aufrechterhalten können. Dieses Phänomen ist vermutlich auf den stärkeren Promotor des TREx™-Systems zurückzuführen. In jedem Fall aber ist es nur eine Frage von - meistens wenigen – Zellteilungen, bis das positive HAD-Signal unter die Nachweisgrenze fällt und schließlich ganz verschwindet.

Diese Ergebnisse zeigen, daß nach der Selektion stabiler Transfektanten der Expressionslevel des HN-Proteins offensichtlich selbst mit einem so starken Promotor wie dem hCMV-Promotor nicht ausreicht, um Erythrocyten im HAD-Test zu binden. Diese Versuchsergebnisse sind übereinstimmend mit früheren Ergebnissen in unserer Arbeitsgruppe (Fischer, 1998), nach denen die Expressionsstärke des hCMV-Promotors ohne Verstärkerelement bei konstitutiver Expression nach stabiler Transfektion nicht für einen Nachweis durch den HAD-Test ausgereicht hatte.

Daher wurde hier in einem weiteren Ansatz versucht, den hCMV-Promotor durch Einfügen des Verstärkerelements Intron A zu verstärken, so daß auch nach stabiler Transfektion eine ausreichend hohe Expression des HN-Proteins in CHO-TREx™-Zellen erreicht werden kann. Die Herstellung dieser beiden Konstrukte (pcDNA5/TO-HN-1xP und pcDNA5/TO-HN-2xP) ist unter Punkt 3.2.1.2.2 beschrieben.

3.3.2.2 Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender CHO-TREx™-Zellen nach Modifikation des hCMV-Promotors mit dem Verstärkerelement Intron A

Die Höhe des HN-Protein Expressionslevels nach der Selektion stabiler Transfektanten war bei Verwendung des TREx™-Systems in seiner kommerziell erhältlichen Form, dessen Expression durch den hCMV-Promotor ohne Verstärkerelement gesteuert wird, nicht ausreichend für einen Nachweis durch den HAD-Test. Daher sollte der hCMV-Promotor des Tetrazyklin-induzierbaren Expressionsplasmids pcDNA5/TO-HN mit dem Verstärkerelement Intron A modifiziert werden.

Die Transfektion von CHO-TREx™-Zellen mit den beiden Tetrazyklin-induzierbaren Expressionsplasmiden pcDNA5/TO-HN-1xP und pcDNA5/TO-HN-2xP erfolgte mit dem Lipofektionsreagenz LipofectAMINE PLUS nach Standardvorschrift (siehe Kapitel 5.3.5). Das

Expressionsplasmid pcDNA5/TO-HN-1xP enthält den hCMV-Promotor mit dem Verstärkerelement Intron A, wobei der hCMV-Promotor des Plasmids pcDNA5/TO nahezu vollständig entfernt worden war. Das Expressionsplasmid pcDNA5/TO-HN-2xP enthält den voll erhaltenen hCMV-Promotor aus dem Plasmid pcDNA5/TO und zusätzlich den hCMV-Promotor mit dem Verstärkerelement Intron A aus dem Plasmid pcDI18 (siehe Kapitel 3.2.1.2.2). Beide Plasmide pcDNA5/TO-HN-1xP und pcDNA5/TO-HN-2xP enthalten zwei direkt hintereinanderliegende Tetrazyklin-Operator Sequenzen zwischen dem Promotor und dem Leserahmen des HN-Gens.

Mit jedem Plasmidkonstrukt wurden die Zellen auf zwei Six-Well-Zellkulturplatten transfiziert, so daß jeweils zwölf Vertiefungen von Six-Well-Zellkulturplatten für die Selektion stabiler Transfektanten zur Verfügung standen. Ein HAD-Test im transienten Zustand (drei Tage nach der Transfektion) nach Induktion mit 2 ng/ µl Tetrazyklin zeigte das gewohnt positive Bild mit einigen hundert HAD-positiven Zellklonen auf einer Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte.

Die Selektion auf stabil transfizierte Zellklone erfolgte mit 100 µg/ ml Hygromycin B im F12-Medium. Das Medium enthielt außerdem 10 % FKS und 10 µg/ ml Blastocidin (zur Aufrechterhaltung des Tetrazyklin-Repressorproteins in den CHO-TREx™-Zellen).

Nach einer Selektionszeit von zwölf Tagen wurde mit diesen Zellen ein HAD-Test durchgeführt (siehe Kapitel 5.5.2). Etwa 20-50 von den rund 100 stabil transfizierten Zellklonen auf einer Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte erwiesen sich in diesem Test als HAD-positiv. Von diesen 20-50 wiederum zeigten jeweils 5-10 Zellklone die Parameter, die den Zellklon als geeignet für die weitere Kultivierung erscheinen ließen: eine homogene Erythrocytenbindung auf allen Zellen eines Zellklons und eine unverminderte Wachstumsgeschwindigkeit, ein unverändertes Teilungsverhalten und keine wesentlich veränderten Adhäsionseigenschaften der Zellen auf der Wachstumsoberfläche der Zellkulturplatte gegenüber untransfizierten CHO-TREx™-Zellen.

Es gab keinen augenscheinlichen Unterschied in den HN-Protein Expressionsparametern oder in der Zellphysiologie der stabil transfizierten Zellklone, die mit dem Plasmid pcDNA5/TO-HN-1xP und den stabil transfizierten Zellklonen, die mit dem Plasmid pcDNA5/TO-HN-2xP transfiziert worden waren.

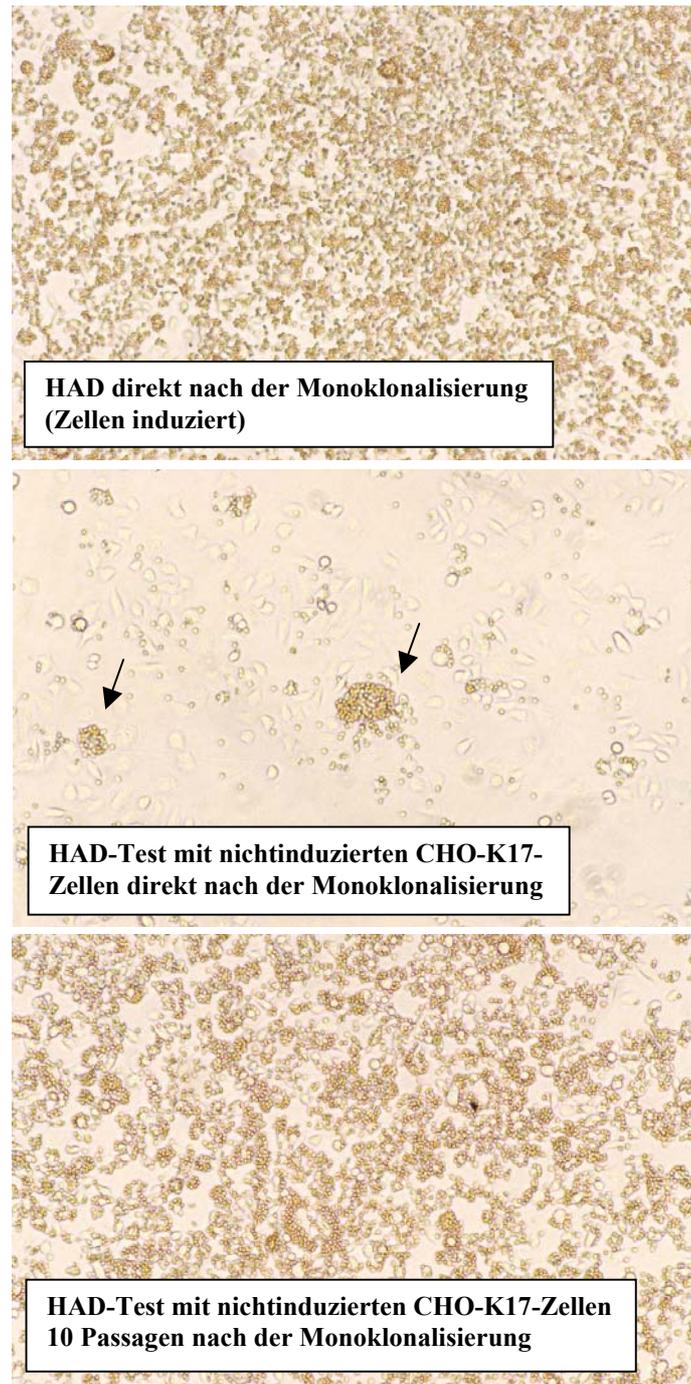


Abbildung 3.30: Nachweis der HN-Protein Expression auf CHO-K17-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach der Monoklonalisierung. Der HAD-Test wurde unmittelbar nach und 10 Zellpassagen nach der Monoklonalisierung durchgeführt (Induktion mit 2 ng/ μ l Tetrazyklin). Bereits kurz nach Abschluß der Monoklonalisierungsprozedur sind bei uninduzierten CHO-K17-Zellen einige HAD-positive Zellen zu erkennen (Pfeile).

Die Zellklone, die sich im HAD-Test gemäß der oben genannten Eigenschaften als positiv erwiesen hatten, wurden mit einem Filzstift auf der Unterseite der Six-Well-Zellkulturplatte unter dem Lichtmikroskop angezeichnet und daraufhin mit einer 20 µl-Gilson-Pipette und 5 µl Trypsin/ EDTA-Lösung durch Aufsetzen der Pipettenspitze direkt auf den Zellklon und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst und auf eine 96-Well-Platte überführt (siehe Kapitel 3.2.4). Auf diese Weise wurden von beiden Transfektionsansätzen (mit den Plasmiden pcDNA5/TO-HN-1xP und pcDNA5/TO-HN-2xP) jeweils 30 Zellklone auf eine 96-Well-Platte überführt. Bei Konfluenz wurden diese Zellklone auf jeweils eine Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatten transferiert, wo ein weiterer HAD-Test durchgeführt wurde. Mit Hilfe dieses HAD-Tests konnte die Qualität dieser Zellklone in Bezug auf die HN-Protein Expression beurteilt werden. Bei etwa 50 % der so untersuchten Zellklone zeigte der HAD-Test auch nach der erfolgten Selektion stabiler Transfektanten ein durchweg positives Ergebnis: Alle Zellen in der jeweiligen Vertiefung der 24-Well Zellkulturplatte waren HAD-positiv und nicht nur einige wenige. Nur bei diesen macht eine Monoklonalisierung Sinn, da bei Vorliegen eines zu hohen Anteils HAD-negativer Zellen im Monoklonalisierungsansatz die Ausbeute an HAD-positiven Zellklonen nach der Monoklonalisierungsprozedur zu gering wird.

Es wurden jeweils fünf Zellklone mit der stärksten HN-Protein Expression (ausgelesen anhand des Resultats im HAD-Test) für die Monoklonalisierung auf 96-Well-Zellkulturplatten ausgewählt. Nach der Monoklonalisierungsprozedur wurden nach Kontrolle des HN-Protein Expressionslevels durch weitere HAD-Tests 22 Zellklone, die mit dem Konstrukt pcDNA5/TO-HN-1xP, und 28 Zellklone, die mit dem Konstrukt pcDNA5/TO-HN-2xP stabil transfiziert worden waren, isoliert, weiter kultiviert und durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff konserviert (siehe Kapitel 5.3.4). Bei Beginn der Transfektion hatten die CHO-TREx™-Zellen 15 Zellpassagen durchlaufen (ab Lieferung durch die Firma Invitrogen). Nach Abschluß der Transfektion und Monoklonalisierung hatten diese Zellen etwa 30 Zellpassagen absolviert.

Alle hier isolierten Zellklone stammten von einer einzigen transfizierten Zelle ab: Sie sind monoklonal. Außerdem konnte mit Hilfe des HAD-Tests gezeigt werden, daß alle Zellen der jeweiligen Zellklone einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel besitzen. Von diesen Zellklonen wurde ein Zellklon ausgewählt, der nach Abschätzung im HAD-Test die höchste Expressionsrate an HN-Protein aufwies. Es handelte sich hierbei um den Zellklon CHO-K17, der mit dem Konstrukt pcDNA5/TO-HN-2xP transfiziert worden war.

Bei einem direkt nach Abschluß der Monoklonalisierungsprozedur durchgeführten HAD-Test konnte in nahezu allen mit 2 ng/ μ l Tetrazyklin induzierten CHO-K17-Zellen (siehe Abbildung 3.30) ein positives HAD-Signal detektiert werden. Das bedeutet, daß beinahe 100 % der CHO-K17-Zellen ein funktionstüchtiges HN-Protein in der Zellmembran enthalten. Offensichtlich sind nicht 100 % der Zellen eines Zellklons HAD-positiv. Diese Beobachtung deckt sich mit den Beschreibungen anderer Experimentatoren (Fischer, 1998). Möglicherweise ist ein durch den HAD-Test nachweisbarer HN-Protein Expressionslevel auch von Faktoren wie beispielsweise dem Zellzyklus abhängig.

Allerdings waren auch in diesem frühen Stadium (direkt nach Abschluß der Monoklonalisierungsprozedur) bei den nichtinduzierten CHO-K17-Zellen bereits einige kleine HAD-*positive spots* im Zellrasen zu sehen (siehe Abbildung 3.30, Pfeile). Einige der CHO-K17-Zellen wiesen also bereits direkt nach Abschluß der Monoklonalisierung eine so hohe Basisexpression im uninduzierten Zustand auf, daß die Menge der in der Zellmembran vorhandenen HN-Protein Moleküle für eine Erythrocytenbindung und ein positives Signal im HAD-Test ausreichend war. Dieses Resultat war bei allen isolierten monoklonalen Zellpopulationen identisch.

Wurde der HAD-Test mit den CHO-K17-Zellen dann nach Ablauf von zehn Zellpassagen nach der Monoklonalisierungsprozedur wiederholt, so zeigte sich nun bei den uninduzierten Zellen ein nahezu identisches Bild wie bei den induzierten CHO-K17-Zellen mit voller HN-Protein Expression (siehe Abbildung 3.30): Alle Zellen wiesen ein positives Ergebnis im HAD-Test auf. Die Basisexpression dieses induzierbaren Expressionssystems scheint also mit zunehmender Zellpassagenzahl immer mehr anzusteigen, bis sich schließlich der uninduzierte vom induzierten Zustand anhand der Erythrocytenbindung im HAD-Test nicht mehr unterscheiden ließ. Die Selektionsantibiotika wurden zu keinem Zeitpunkt der Monoklonalisierung oder der darauf folgenden Zellpassagen abgesetzt noch wurde deren Konzentration verändert.

Es gab in diesem Versuch keinen ersichtlichen und erkennbaren Unterschied zwischen solchen CHO-K17-Zellen, die in Medium mit normalem Serum (das möglicherweise Reste von Tetrazyklin enthält) gehalten worden waren oder solchen, die eigens für dieses Experiment ab 14 Tage vor dem Versuch in Medium mit geprüft tetrazyklinfreiem Serum (siehe Kapitel 5.10) kultiviert worden waren.

Der Zellklon CHO-K17 weist nach den hier durchgeführten Versuchen einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hohen HN-Protein Expressionslevel auf und erfüllt damit bereits eine Anforderung an eine stabil transfizierte, HN-Protein exprimierende

Helferzelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren. Eine weitere Anforderung an die Helferzelle ist eine so niedrige HN-Protein Basisexpression vor der Infektion, daß die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins nicht in der Lage ist, die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus zu zerstören und die Helferzelle somit durch das Sendai Virus infizierbar bleibt. Dieser Parameter sollte nun durch einen Infektionstest untersucht werden.

Der Infektionstest der CHO-K17-Zellen mit einem Sendai Virus (Sendai Virus D52^[16]; Eipassage; MOI = 5) wurde nach etwa vier Zellpassagen nach Abschluß der Monoklonalisierungsprozedur durchgeführt. Dabei wurde bei der Initialinfektion der uninduzierten CHO-K17-Zellen mit dem Sendai Virus im HAD-Test ein unerwartet geringer Anteil von infizierten Zellen festgestellt, nämlich nur etwa maximal 1-3 % (die Infektion der Vero-Kontrollzellen verlief dagegen mit einer Ausbeute von 100 % infizierter Zellen; Daten nicht gezeigt). Diese geringe Ausbeute an infizierten Zellen könnte auf eine zu hohe HN-Protein Basisexpression der CHO-K17-Zellen zurückzuführen sein. Die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins würde in diesem Fall die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus zerstören und damit den Zellen Resistenz gegen eine Sendai Virus Infektion verleihen. Allerdings könnte der geringe Anteil an HAD-positiven Zellen auch auf eine bereits ansteigende HN-Protein Basisexpression zurückzuführen sein: In diesem Fall würde der positive HAD-Test nicht die Infektion der Zellen durch das Sendai Virus, sondern die HN-Protein Basisexpression anzeigen.

Durch einen unmittelbar folgenden HAD-Test mit diesen uninduzierten CHO-K17-Zellen sollte daher die Höhe der HN-Protein Basisexpression geklärt werden. Dabei zeigten sich die uninduzierten CHO-K17-Zellen bereits etwa fünf Zellpassagen nach Abschluß der Monoklonalisierungsprozedur positiv im HAD-Test. Der oben beschriebene HAD-Test nach dem Infektionstest hatte also tatsächlich die HN-Protein Basisexpression und nicht die Infektion der CHO-K17-Zellen durch das Sendai Virus gemessen. Die hier geschilderten Eigenschaften dieser Zellen bezüglich der Parameter ihrer HN-Protein Expression und ihrer Infizierbarkeit durch das Sendai Virus treffen nicht nur auf den Zellklon CHO-K17 zu, sondern auch auf etwa 20 weitere Zellklone, die mit den Plasmiden pcDNA5/TO-HN-1xP, beziehungsweise pcDNA5/TO-HN-2xP stabil transfiziert und auf die oben beschriebene Weise bezüglich ihrer Infektionsfähigkeit getestet worden waren. Die HN-Protein Basisexpression der CHO-K17-Zellen scheint also mit zunehmender Zellpassagenzahl tatsächlich immer mehr anzusteigen, bis schließlich nach etwa 10-15 Zellpassagen nach Abschluß der Monoklonalisie-

rungsprozedur im HAD-Test kein Unterschied mehr zu erkennen war zwischen induzierten und uninduzierten CHO-K17-Zellen.

Möglicherweise kommt es bei Einsatz des sehr starken Promotorkonstruktes hCMV-Promotor + Intron A in dem Tetrazyklin-regulierbaren TREx™-System zu einer Art von „Ermüdungserscheinung“ in der Repressionsleistung: Während die HN-Protein Basisexpression während der ersten Zellpassagen nach der Monoklonalisierungsprozedur durch die sehr bindungsstarke Wechselwirkung zwischen dem Tetrazyklin-Repressor-Protein und der Tetrazyklin-Operator-Sequenz zwischen dem Promotor und dem Leserahmen des HN-Gens effektiv niedrig gehalten werden kann, kommt es nach dem Durchlaufen einiger Zellpassagen zu einer Schwächung der Repression und damit zu einer Erhöhung der HN-Protein Basisexpression. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Verwendung des sehr starken Promotorkonstruktes hCMV-Promotor + Intron A liegen, das aufgrund seiner Expressionsstärke nur mehr sehr schwer oder eben dann gar nicht mehr zu unterdrücken ist.

Die CHO-K17-Zellen zeigten außerdem eine rasche Veränderung ihrer physiologischen Parameter. So lösen sich die Zellen mit zunehmender Passagenzahl bei der Zellpassage nach Zugabe von Trypsin/ EDTA nur mehr sehr schwer von der Wachstumsfläche ab und wachsen danach auch nur sehr langsam wieder an. Dabei sterben ungewöhnlich viele Zellen ab. Auch bei der Standardkultivierung (siehe Kapitel 5.3.1) dieser Zellen schwimmen außerordentlich viele tote Zellen im Überstand. Diese Effekte machen sich bereits nach fünf bis zehn Zellpassagen nach der Monoklonalisierung sehr deutlich bemerkbar. Die Wachstumsgeschwindigkeit der CHO-K17-Zellen ist generell um einen Faktor von 1,5-2 niedriger als die der CHO-TREx™-Zellen. Dies scheint allerdings durch die ständige duale Selektion mit den beiden sehr restriktiven Antibiotika Hygromycin B und Blastocidin und der damit erhöhten Stoffwechsellast sehr gut erklärbar.

3.3.3 Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden Helforzelle auf Basis des TREx™-Systems: Zusammenfassung der Ergebnisse

Das induzierbare Expressionsplasmid des TREx™-Systems nutzt den hCMV-Promotor für die Expression des Transgens. Dieser Promotor kann erst nach Modifikation durch das Verstärkerelement Intron A einen durch den HAD-Test nachweisbaren HN-Protein Expressionslevel gewährleisten. Die Zelllinie CHO-K17 war stabil mit dem induzierbaren Expressionskonstrukt pcDNA5/TO-HN-2xP transfiziert worden und bietet einen so hohen HN-Protein Expressionslevel, daß ein Nachweis durch den HAD-Test ermöglicht wird. Durch den Einsatz

des TREx™-Systems konnten somit erstmals stabil transfizierte Zellen mit einem für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel hergestellt werden.

Allerdings konnte mit Hilfe des Tetrazyklin-regulierbaren TREx™-Systems die Basisexpression vor der Induktion nicht ausreichend niedrig gehalten werden, um eine Infizierbarkeit der CHO-K17-Zellen durch das Sendai Virus zu ermöglichen. Diese Art der induzierbaren Expression ist somit für die Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden Helferzelle nicht geeignet.

3.3.4 Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle auf Basis des Cre/ loxP-Systems

Die Schwierigkeit bei der Herstellung einer induzierbar HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle bestand bei den bisherigen Ansätzen immer darin, die beiden erforderlichen Eigenschaften in einem einzigen Expressionssystem zu vereinen: So konnte beim GeneSwitch™-System zwar die HN-Protein Basisexpression sehr niedrig gehalten werden; allerdings war es mit diesem induzierbaren Expressionssystem aufgrund des verhältnismäßig schwachen Promotors nicht möglich, einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel zu erreichen.

Beim Einsatz des TREx™-Systems ergab sich das Problem, daß nach Modifikation des Promotors zwar ein für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hoher HN-Protein Expressionslevel erreicht werden konnte; dabei war es aber nicht möglich, die HN-Protein Basisexpression durch das eingesetzte Tetrazyklin-abhängige Regulationssystem so niedrig zu halten, daß eine Infizierbarkeit der Helferzellen durch das Sendai Virus ermöglicht wird.

Um diese beiden erforderlichen Eigenschaften in einem induzierbaren Expressionssystem zu vereinen, sollte auf den Cre/ loxP-Mechanismus zurückgegriffen werden: Der Expressionsvektor basierte dabei auf dem in einer früheren Dissertationsarbeit (Fischer, 1998) bereits erfolgreich etablierten konstitutiven Expressionsplasmid pcDI18-HN. Dieses enthält einen hCMV-Promotor mit Intron A. Das Intron A ist ein Verstärkerelement aus dem Genom des Cytomegalovirus und beinhaltet Bindestellen für einige zelluläre Transkriptionsfaktoren, die eine verstärkte Transkription und damit einen erhöhten Expressionslevel bewirken (Boschard *et al.*, 1985).

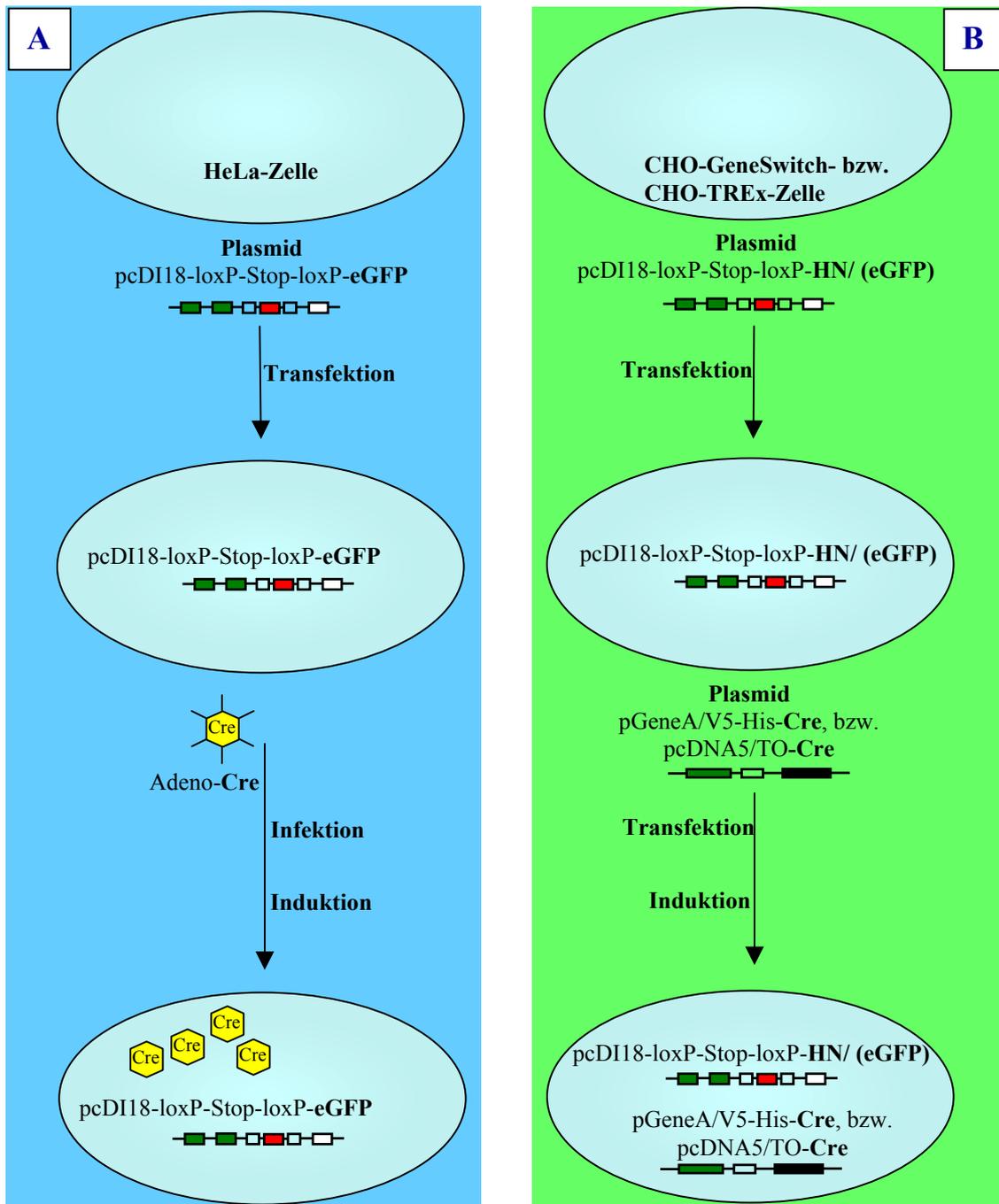


Abbildung 3.31: Schematische Darstellung der geplanten Vorgehensweise bei der Herstellung einer stabil transfizierten, induzierbar HN-Protein exprimierenden Helferzelle auf Basis des Cre/ loxP-Systems. **A:** Transfektion von HeLa-Zellen mit dem Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP. Die Induktion sollte bei diesem ersten Versuch durch Infektion der Zellen mit einem Adeno-Cre-Virus durchgeführt werden. **B:** Transfektion von CHO-GeneswitchTM-(TRExTM)-Zellen mit dem Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN/ (eGFP), bzw. pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN. Nach einer weiteren Transfektion dieser Zellen mit einem induzierbaren Expressionsplasmid (GeneswitchTM-, bzw. TRExTM-System), das für die Cre-Rekombinase kodiert (pGene/V5-His-A-Cre, bzw. pCDNA5/TO-Cre), kann durch Induktion der Cre-Rekombinase die Exzision der Transkriptionsstopkassette im Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP, bzw. pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN und damit die Expression des Transgens erfolgen.

Um eine induzierbare Expression von diesem konstitutiven Expressionsplasmid zu ermöglichen, wurde zwischen dem Promotor und dem HN-Gen eine Transkriptionsstopkassette eingefügt. Diese war von zwei loxP-Sequenzen flankiert, so daß sie von der Cre-Rekombinase ausgeschnitten werden konnte. Mit diesem Plasmidkonstrukt mit der Bezeichnung pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN sollten CHO-GeneSwitchTM-, beziehungsweise HeLa-Zellen transfiziert werden. Solange die Transkriptionsstopkassette in dem Konstrukt vorhanden ist, soll die Transkription des HN-Gens unterdrückt bleiben; die Zelle sollte also durch das Sendai Virus infizierbar sein. Nach Entfernung der Transkriptionsstopkassette durch die Cre-Rekombinase soll die Transkription des HN-Gens induziert werden und es kommt zur Expression des HN-Proteins.

Dieser Prozess ist irreversibel. Die Zelle exprimiert ab dem Zeitpunkt der Induktion durch die Exzision der Transkriptionsstopkassette das HN-Gen konstitutiv (siehe Kapitel 3.1.2.3 und 3.2.1.3). Das Prinzip der induzierbaren Expression beim Cre/ loxP-System beruht also auf dem für die konstitutive Expression des HN-Proteins bereits bewährten Expressionsplasmid pcDI18-HN, dessen Expression durch Einfügen einer von zwei loxP-Sequenzen flankierten Transkriptionsstopkassette zwischen den Promotor und das Transgen nun induzierbar gestaltet werden kann.

Die Cre-Rekombinase sollte in einem ersten Schritt von einem Adeno Virus, das die Cre-Rekombinase exprimiert (Adeno-Cre; siehe Kapitel 5.2.3.2), in die Zelle gebracht werden. Dieses Vorgehen war geplant, um eine schnelle, einfache und wenig zeit- und arbeitsintensive Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Systems vornehmen zu können, ohne eine weitere Transfektion mit einem Expressionsplasmid für die Cre-Rekombinase durchzuführen zu müssen (siehe Abbildung 3.31, **A**). Nun besitzen CHO-Zellen keinen Rezeptor für das Adeno Virus (CAR – *coxsackie adenovirus receptor*). Eine Induktion der eGFP-Expression von dem Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP mit Hilfe eines Adeno-Cre-Virus ist also auf CHO-Zellen nicht durchführbar. Daher mußte zur Durchführung dieses Versuchsteil auf HeLa-Zellen ausgewichen werden.

Das Endziel dieses Vorgehens war allerdings die Herstellung einer Zelllinie, die mit einem induzierbaren Expressionskonstrukt für die Cre-Rekombinase stabil transfiziert ist, so daß die Expression der Cre-Rekombinase in diesen Zellen dann induzierbar erfolgen konnte. Für die induzierbare Expression der Cre-Rekombinase bei diesem Vorgehen wurde das GeneSwitchTM-System ausgewählt (siehe Abbildung 3.31, **B**). Die ausgesprochen niedrige Basisexpression des GeneSwitchTM-Systems (siehe Kapitel 3.1.2.1 und 3.3.1.1) sollte für eine nied-

rige Basisexpression der Cre-Rekombinase und damit auch für eine niedrige Basisexpression des HN-Proteins sorgen. Ob der schwache Promotor des GeneSwitch™-Systems nach Induktion eine ausreichend hohe Expression der Cre-Rekombinase gewährleisten könnte, würde sich erst im Versuch zeigen können.

Durch Einsatz dieses zweistufigen Systems sollten die beiden Anforderungen an das induzierbare Expressionssystem erfüllt werden können: Eine sehr niedrige Basisexpression im uninduzierten Zustand würde durch die Eigenschaften des GeneSwitch™-Systems (siehe Kapitel 3.1.2.1 und 5.2.1) und die Wirkung der Transkriptionsstopkassette erreicht werden; ein ausreichend hoher Expressionslevel im induzierten Status wird durch die Verwendung des sehr starken Promotorkonstrukts hCMV-Promotor mit Intron A im Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN gewährleistet.

3.3.4.1 Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Adeno-Cre-Virus

Zunächst sollte die Funktionsfähigkeit des Adeno-Cre-Virus für die Induktion der eGFP-Expression von dem induzierbaren Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP überprüft werden. Dazu wurden HeLa-Zellen mit dem Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP transient transfiziert. Die Cre-Rekombinase zur Exzision der Transkriptionsstopkassette und Induktion der eGFP-Expression sollte dann durch Infektion mit dem Adeno-Cre-Virus (MOI = 100 – 500, in getrennten Ansätzen) (siehe Kapitel 5.2.3.2) zur Verfügung gestellt werden. Die Infektion erfolgte am zweiten Tag nach der Transfektion (siehe Abbildung 3.31, A). Die HeLa-Zellen zeigten am Tag nach der Infektion durch das Adeno-Cre-Virus deutliche Anzeichen einer Virusinfektion in Form eines signifikanten cytopathischen Effekts. Dieser war vor allem bei den Ansätzen, in denen mit hoher Viruspartikelmenge (MOI = 200 – 500) gearbeitet worden war, sehr ausgeprägt. Eine eGFP-Expression konnte in den HeLa-Zellen allerdings zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion der Zellen mit dem Adeno-Cre-Virus nachgewiesen werden. Im Rahmen dieses Kontrollexperimentes sollte die Funktionsfähigkeit des Adeno-Cre Virus gezeigt werden. Da dieses Kontrollexperiment kein eindeutiges Resultat erbrachte, mußte davon ausgegangen werden, daß das Adeno-Cre Virus für die Induktion der Expression der Cre-Rekombinase ungeeignet war.

Da sich die in dieser Arbeit zur Verfügung stehende Charge des Adeno-Cre-Virus für die Induktion der eGFP-Expression von dem induzierbaren Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP als ungeeignet erwiesen hatte, sollte im Rahmen eines anderen Versuchsansatzes die Exzision der Transkriptionsstopkassette im Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-

loxP-eGFP und Induktion der eGFP-Expression durch eine ebenfalls induzierbar exprimierbare Cre-Rekombinase durchgeführt werden. Für diese induzierbare Expression der Cre-Rekombinase sollte primär auf das GeneSwitch™-System (induzierbares Expressionsplasmid pGene/V5-His-A-Cre; siehe Kapitel 3.2.1.3.6) zurückgegriffen werden, da dieses eine sehr niedrige Basisexpression im uninduzierten Zustand bietet und damit möglicherweise das Ziel einer ausreichenden Absenkung der Neuraminidaseaktivität und einer infizierbaren Zelllinie erreicht werden kann (siehe Abbildung 3.31, **B**).

In einem Parallelansatz sollte aber dennoch der gleiche Ansatz mit dem TReX™-System durchgeführt werden (induzierbares Expressionsplasmid: pcDNA5/TO-Cre; siehe Kapitel 3.2.1.3.7) (siehe Abbildung 3.31, **B**). Auf diese Weise sollte die Exzision der Transkriptionsstopkassette und damit die Expression des eGFP-Proteins auch für den Fall sichergestellt werden, daß der durch das GeneSwitch™-System erreichte Expressionslevel der Cre-Rekombinase für die Exzision der Transkriptionsstopkassette und die Induktion der eGFP-Expression nicht ausreichend wäre.

3.3.4.2 Expression des eGFP-Proteins in CHO-Zellen: Induktion durch ein kotransfiziertes induzierbares Cre-Rekombinase Expressionsplasmid

Da sich das Adeno-Cre-Virus in dem vorangehenden Versuchsteil für die Induktion der eGFP-Expression von dem Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP als ungeeignet erwiesen hatte, sollte nun versucht werden, die Cre-Rekombinase durch Kotransfektion eines induzierbaren Expressionsplasmids zur Verfügung zu stellen. Dazu wurden in einer Kotransfektion CHO-GeneSwitch™- und CHO-TReX™-Zellen mit dem Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP und dem jeweiligen Expressionsplasmid pGene/V5-His-A-Cre beziehungsweise pcDNA5/TO-Cre transfiziert (siehe Kapitel 5.3.5). Die Induktion erfolgte bei den CHO-GeneSwitch™-Zellen mit 10^{-8} M Mifepristone und bei den CHO-TReX™-Zellen mit 2 ng/ μ l Tetrazyklin.

Bei dieser Versuchsanordnung muß zur Induktion des eGFP-Proteins zuerst die Cre-Rekombinase von dem induzierbaren Expressionskonstrukt exprimiert werden, die dann das Genom beziehungsweise die im oder am Zellkern vorliegenden Plasmidmoleküle nach loxP-Sequenzen durchsucht, um die dazwischen liegende Transkriptionsstopkassette auszuschneiden und so die Expression des eGFP-Proteins zu ermöglichen. Um also einer eventuell erhöhten benötigten Zeitdauer für die Expression über dieses zweistufige System Rechnung zu tra-

gen, wurde der Induktor in diesem Versuch 48 h auf den Zellen inkubiert (Wechsel nach 24 Stunden).

Wie in Abbildung 3.32 dargestellt, wird in beiden Ansätzen das eGFP-Gen exprimiert. Die bei beiden Systemen relativ geringe Ausbeute an transfizierten Zellen ist mit den Bedingungen bei der Transfektion gut erklärbar: Bei Doppeltransfektionen muß generell mit einer Einbuße bei der Transfektionseffizienz gerechnet werden. Außerdem trägt der hier vorliegende zweistufige Expressionsmechanismus mit Expression eines funktionsfähigen Cre-Rekombinase-Proteins und dessen Aktivität zur Exzision der Transkriptionsstopkassette zu einer geringeren Ausbeute bei der Transfektion bei.

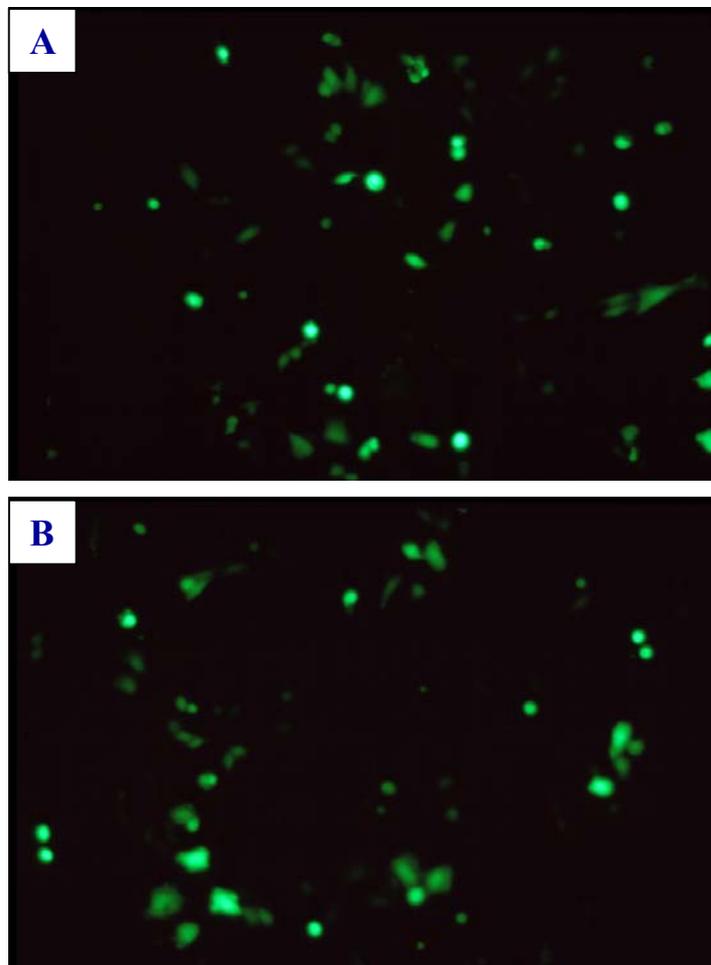


Abbildung 3.32: Nachweis der eGFP-Expression nach transientser Transfektion durch Fluoreszenzmikroskopie. **A:** Nach Doppeltransfektion von CHO-GeneSwitch™-Zellen mit den Plasmiden pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP und pGene/V5-His-A-Cre. Induktion mit 10^{-8} M Mifepristone für 48 Stunden 2 Tage nach der Transfektion. **B:** Nach Doppeltransfektion von CHO-TREx™-Zellen mit den Plasmiden pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP und pcDNA5/TO-Cre. Induktion mit 2 ng/ μ l Tetracyclin für 48 Stunden 2 Tage nach der Transfektion.

Die Induktion durch die Cre-Rekombinase kann bei dieser Versuchsanordnung nur einmal erfolgen, da die Exzision der Transkriptionsstopkassette zwischen dem Promotor und dem Transgen ein irreversibles Ereignis ist (siehe Kapitel 3.1.2.3). Die hier nach transienter Transfektion getesteten Ansätze konnten also nicht direkt zur Selektion stabiler Transfektanten herangezogen werden. Aus diesem Grund wurden Parallelansätze für die Selektion stabiler Transfektanten verwendet. Diese wurden einer 14-tägigen Selektion durch die entsprechenden Selektionsantibiotika (GeneSwitch™-System: 400 µg/ ml G418, 400 µg/ ml Zeocin, 100 µg/ ml Hygromycin B; TREx™-System: 400 µg/ ml G418, 10 µg/ ml Blasticidin, 150/ 100 µg/ ml Hygromycin B) ausgesetzt. Die eGFP-Expression wurde bei den so entstandenen Zellklonen mit dem entsprechenden Induktor wie oben beschrieben (10^{-8} M Mifepristone für das GeneSwitch™-System, 2 ng/ µl Tetrazyklin für das TREx™-System) induziert.

Nach dieser Selektion auf stabile Transfektanten konnte keine eGFP-Expression mehr nachgewiesen werden. Es ist also nicht möglich, über das in diesem Versuch angewendete System die eGFP-Expression zu induzieren. Es wurden insgesamt für jedes verwendete Expressionssystem (GeneSwitch™ und TREx™) jeweils zwölf Vertiefungen von Six-Well-Zellkulturplatten mit stabil transfizierten Zellklonen auf die Expression des eGFP-Gens untersucht. Bei einer Anzahl von etwa 1000 stabil transfizierten Zellklonen auf einer Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte wurden also etwa 12000 stabil transfizierte Zellklone untersucht. Alle untersuchten Zellklone erwiesen sich in Bezug auf die Expression des eGFP-Gens als negativ.

3.3.4.3 Versuche zur Herstellung stabil transfizierter, induzierbar HN-Protein exprimierender Helferzellen auf Basis des Cre/ loxP-Systems: Zusammenfassung der Ergebnisse

Nachdem sich das Adeno-Cre-Virus für die Induktion der eGFP-Expression von dem induzierbaren Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP als ungeeignet erwiesen hatte, sollte die Cre-Rekombinase durch Kotransfektion der induzierbaren Expressionsplasmide pGene/V5-His-A-Cre, beziehungsweise pcDNA5/TO-Cre in den Zellen exprimiert werden. Dazu wurden im Rahmen einer Doppeltransfektion CHO-GeneSwitch™- beziehungsweise CHO-TREx™-Zellen mit dem Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP und dem jeweiligen induzierbaren Expressionsplasmid für die Cre-Rekombinase (pGene/V5-His-A-Cre beziehungsweise pcDNA5/TO-Cre) kotransfiziert. Nach Induktion konnte in diesem Versuch eine eGFP-Expression im transienten Zustand der Transfektion festgestellt werden. Nach Se-

lektion stabiler Transfektanten und Induktion dieser Zellklone war in den Zellen jedoch keine eGFP-Expression mehr nachweisbar. Auf Basis des Cre/ loxP-Systems konnte somit keine stabil transfizierte, induzierbar HN-Protein exprimierende Helferzelle etabliert werden.

3.3.5 Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle auf Basis der Neuraminidase-reduzierten HN-Mutante HN^{41/6A}

Eine Helferzelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren muß vor der Infektion in der Neuraminidaseaktivität des membranständigen HN-Proteins so weit abgesenkt sein, daß durch dessen Aktivität die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus nicht zerstört werden; nach der Infektion muß die Helferzelle dann einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel aufweisen, wobei die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins zum Zeitpunkt der Freisetzung der Sendai Viren wiederum so hoch sein muß, daß eine Loslösung der Sendai Viren von der Zelle gewährleistet ist. Unter Einsatz der bisher verwendeten induzierbaren Expressionssysteme war es im Verlauf des experimentellen Vorgehens bis jetzt nicht möglich, eine stabil transfizierte, HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle mit den erforderlichen Eigenschaften herzustellen.

Aus diesem Grund wurde das Konzept zur Herstellung einer Helferzelle völlig geändert: Es sollte nun doch auf ein modifiziertes HN-Protein zurückgegriffen werden, das eine reduzierte Neuraminidaseaktivität bei gleichzeitig normal ausgeprägter Hämagglutinationsfunktion aufweist. Im Jahre 1991 war von Lyn *et al.* unter mehreren anderen eine Mutante des HN-Gens mit der Bezeichnung HN^{41/6A} beschrieben worden, die an Aminosäureposition 184 einen Austausch von Serin gegen Prolin aufweist (der zugrundeliegende Codonaustausch lautet von TCT nach CCT). Dieses modifizierte Protein weist laut Lyn *et al.* eine um 80 % verringerte Neuraminidaseaktivität auf, während sich die Hämagglutinationsfunktion zu 100 % intakt zeigte. Durch den Einsatz des HN^{41/6A}-Proteins sollte eine Helferzelle mit den erforderlichen Parametern bezüglich der HN-Protein Expression hergestellt werden können: Vor der Infektion sollte die durch die Modifikation auf 20 % reduzierte Neuraminidaseaktivität durch die zusätzliche Verwendung eines Neuraminidaseinhibitors so weit abgesenkt werden können, daß die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus intakt bleiben und somit die Infizierbarkeit der Helferzelle gewährleistet wäre. Für den Zusammenbau der Viruspartikel am Ende des Replikationszyklus würde dann ein HN-Protein mit einer zu 100 % intakten Hämagglutinationsfunktion zur Verfügung stehen. Unmittelbar nach der Infektion der Helferzellen muß der Neu-

raminidaseinhibitor abgesetzt werden. Die auf 20 % reduzierte Neuraminidaseaktivität des HN^{41/6A}-Proteins ist dann für eine Loslösung der Sendai Viren von der Helfierzelle ausreichend (Lyn *et al.*, 1991). Diese HN-Mutante HN^{41/6A} (siehe Kapitel 2.1.3.1 und 3.2.1.4) wurde im Rahmen dieser Arbeit im Expressionsplasmid pcDI18-HN^{41/6A} für die Herstellung stabil transfizierter, konstitutiv HN^{41/6A}-Protein exprimierender Helfierzellen eingesetzt.

Die vorangehenden Arbeiten (Fischer, 1998; Leyrer, 1997) hatten eindrucksvoll gezeigt, daß eine ausreichende Absenkung der Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins für die Herstellung einer infizierbaren HN-Protein exprimierenden Helfierzelle ein sehr entscheidender und kritischer Faktor ist. Um eine möglichst vollständige Unterdrückung der Neuraminidaseaktivität der HN-Mutante HN^{41/6A} zu erreichen, sollte aus diesem Grunde vor der Infektion zur Sicherheit zusätzlich mit dem Neuraminidaseinhibitor 2,3-Dehydro-2-deoxy-N-Acetylneuraminsäure (Calbiochem®) gearbeitet werden. Der Neuraminidaseinhibitor ist eine sehr hydrophile Substanz und kann daher nicht durch Membranen diffundieren; er würde also bei Zugabe zum Zellkulturmedium seine Wirkung primär extrazellulär entfalten. Die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins wird aber bereits im *trans*-Golgi-System und im Endoplasmatischen Retikulum aktiv (Lodish *et al.*, 1995). Neusynthetisierte Glykoproteine kämen also auch bei extrazellulärem Vorhandensein des Neuraminidaseinhibitors bereits mit abgespaltenen endständigen Neuraminsäuren zur Zelloberfläche und stünden so dem Sendai Virus als Rezeptoren nicht mehr zur Verfügung. Zur Erzeugung der Membrangängigkeit dieses Neuraminidaseinhibitors sollte dieser mit dem Lipofektionsreagenz LipofectACE komplexiert werden. So sollte der Neuraminidaseinhibitor durch die Zellmembran diffundieren und möglicherweise auch innerhalb des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums präsent sein können.

3.3.5.1.1 Vergleich der Hämagglutinationsaktivität des HN^{41/6A}-Proteins und des nicht mutierten HN-Proteins

Das HN^{41/6A}-Protein weist eine im Vergleich zum Wildtyp-HN (HN) zu 100 % intakte Hämagglutinationsaktivität auf (Lyn *et al.*, 1991). Um diesen Wert in einem eigenen Experiment nachzuvollziehen, wurden CHO-TREx™-Zellen mit absteigenden Mengen des Plasmids pcDI18-HN beziehungsweise pcDI18-HN^{41/6A} transfiziert (1000, 750, 500, 250, 125, 50 ng pro Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte). Diese Transfektionsexperimente fanden in Six-Well-Zellkulturgefäßen statt. Die Transfektion wurde nach Standardvorschrift durchgeführt (siehe Kapitel 5.3.5).

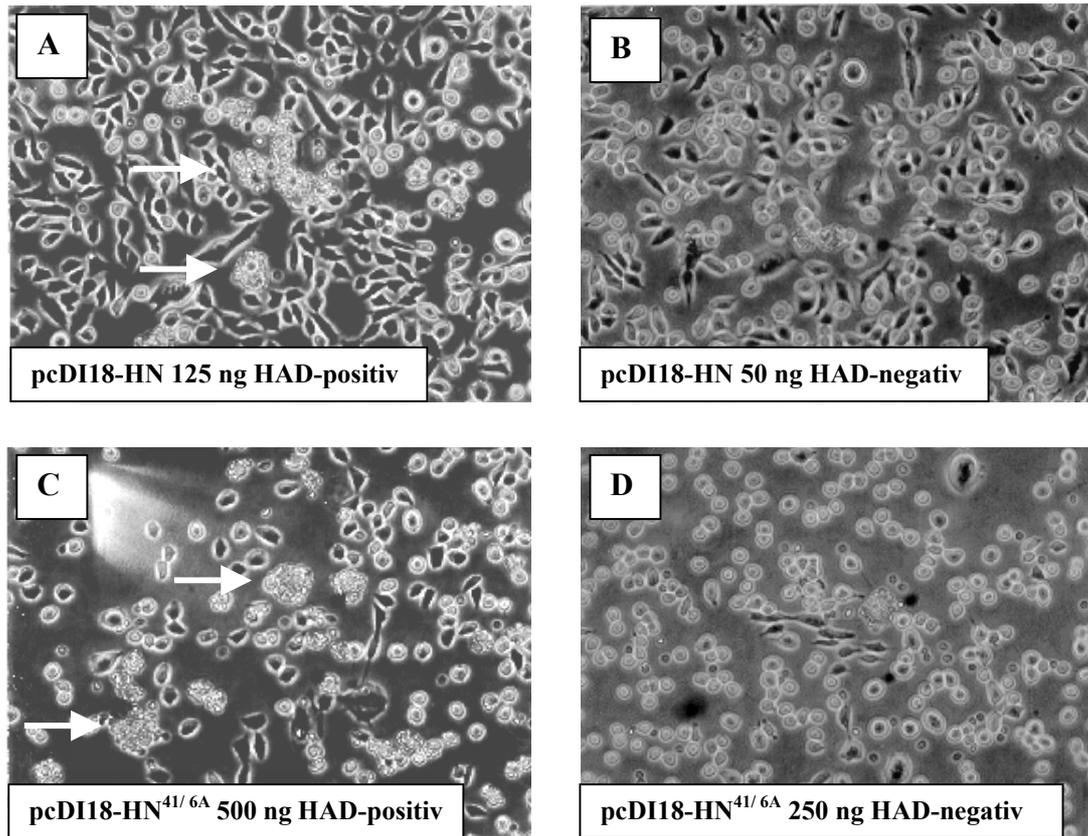


Abbildung 3.33: Entscheidende Grenzwerte der Verdünnungsreihe beim Vergleich der Hämagglutinationsaktivitäten des HN- und des HN^{41/6A}-Proteins. Nach transients Transfektion der Plasmide pcDI18-HN bzw. pcDI18-HN^{41/6A} wurde durch einen HAD-Test die Hämagglutinationsaktivität (Pfeile) bestimmt.

Bei der Auswertung durch den HAD-Test (siehe Kapitel 5.5.2) drei Tage nach der Transfektion zeigte sich, daß nach transients Transfektion des Plasmids pcDI18-HN das positive HAD-Signal ab einer Menge von 50 ng transfizierter Plasmid-DNA verschwunden war (siehe Abbildung 3.33; A, B, Pfeile), beim Plasmid pcDI18-HN^{41/6A} bereits ab einer Menge von 250 ng (siehe Abbildung 3.33; C, D, Pfeile). Ein positives Ergebnis im HAD-Test war bei dieser Versuchsanordnung nach transients Transfektion des Plasmids pcDI18-HN^{41/6A} jeweils erst bei der nächsthöheren Konzentration an transfizierter Plasmid-DNA zu detektieren als nach transients Transfektion des Plasmids pcDI18-HN. Die Hämagglutinationsaktivität scheint also entgegen der Aussage von Lyn *et al.* (1991) beim HN^{41/6A}-Protein reduziert zu sein. Diese verminderte Hämagglutinationsaktivität sollte sich aber für das hier geplante Vorgehen, nämlich die zelluläre Transkomplementation HN-defizienter mit dem HN^{41/6A}-Protein, nicht negativ auswirken, da auch eine verminderte Rezeptorbindefunktion des mutierten

HN^{41/6A}-Proteins noch für die Einleitung eines normalen Infektionszyklus ausreichen sollte (Fischer, 1998; siehe Kapitel 2.1.3.1 und 2.1.5).

Eine Abschätzung der Höhe der beim modifizierten HN^{41/6A}-Protein noch vorhandenen Neuraminidaseaktivität würde erst durch einen Infektionstest von stabil transfizierten, monoklonalen Zellen erfolgen können. Hierbei würde sich zeigen, ob durch die Mutation und den Neuraminidaseinhibitor die Neuraminidaseaktivität so weit abgesenkt werden könnte, um eine Infektion der Zellen durch das Sendai Virus zu ermöglichen. Es konnten im Rahmen einer Literaturrecherche keine diesbezüglichen Literaturdaten aufgefunden werden.

3.3.5.2 Herstellung und Charakterisierung stabil transfizierter, monoklonaler, konstitutiv HN^{41/6A}-Protein exprimierender Helferzellen

Um die Eignung der HN-Mutante HN^{41/6A} für den Einsatz in einer stabil transfizierten, HN^{41/6A}-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle zu untersuchen, sollten stabil transfizierte, monoklonale Zellen hergestellt werden. Dazu wurden CHO-TREx™-Zellen zu einer Konfluenz von 30 % auf Six-Well-Zellkulturplatten ausgelegt und mit jeweils 2 µg des Plasmids pcDI18-HN^{41/6A} pro Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte transfiziert (siehe Kapitel 5.3.5). Nach 14-tägiger Selektion mit 400 µg/ml G418 wurde mit den so entstandenen Zellklonen in den einzelnen Vertiefungen der Six-Well-Zellkulturplatten ein HAD-Test durchgeführt, um HN^{41/6A}-Protein exprimierende Zellklone an dem positiven HAD-Signal zu erkennen. Von den erhaltenen HAD-positiven Zellklonen wurden 24 markiert und auf je eine Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatte überführt. Diese 24 Zellklone wurden nach zwei Tagen wiederum einem HAD-Test unterzogen. Mit fünf Zellklonen, die im HAD-Test die höchste HN^{41/6A}-Protein Expression aufwiesen, wurde eine Monoklonalisierung auf 96-Well-Zellkulturplatten durchgeführt. Nach Auswahl und Verwerfen ungeeigneter Zellklone wurden bei Konfluenz der Zellen nach Kontrolle durch einen weiteren HAD-Test die besten 32 Zellklone weiter kultiviert.

Die Neuraminidaseaktivität des modifizierten HN^{41/6A}-Proteins muß zur Erhaltung der Infizierbarkeit einer HN^{41/6A}-Protein exprimierenden Helferzelle so weit reduziert sein, daß die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus erhalten bleiben und damit die Infizierbarkeit der Zellen durch das Sendai Virus gegeben ist. Das entscheidende Kriterium für die Beurteilung der Höhe der Neuraminidaseaktivität der HN^{41/6A}-Mutante ist also die Infizierbarkeit der erhaltenen monoklonalen HN^{41/6A}-Protein exprimierenden Helferzellen durch das Sendai Virus. Um diesen Parameter zu testen, wurden die 32 monoklonalen Zelllinien einem Infektions-

test mit dem Sendai Virus RS-P-eGFP unterzogen. Eine Infektion der Zellen mit diesem Virus sollte durch die Expression des eGFP-Proteins mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops leicht zu detektieren sein.

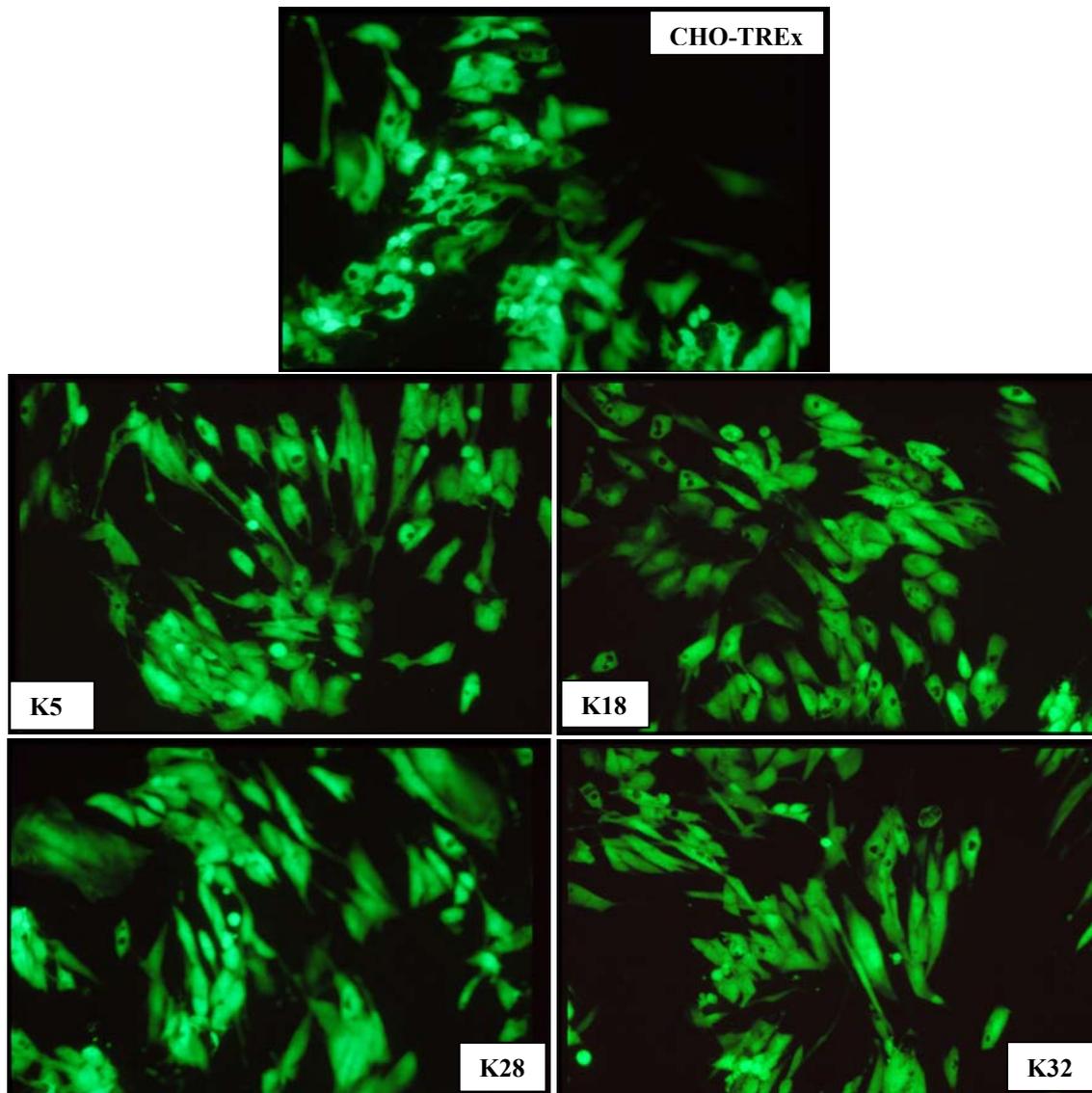


Abbildung 3.34: Infektionstest mit den Zellklonen CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** durch das Sendai Virus RS-P-eGFP. Unbehandelte CHO-TRExTM-Zellen wurden als Kontrollzellen infiziert.

Die 32 selektierten, monoklonalen CHO-HN^{41/6A}-Zelllinien wurden zur Durchführung des Infektionstests am Vortag zu einer Konfluenz von 70 % auf 24-Well-Zellkulturplatten ausgelegt. Um eine möglichst vollständige Unterdrückung der Neuraminidaseaktivität des HN^{41/6A}-Proteins zu gewährleisten, wurden diese Zellen mit dem Neuraminidaseinhibitor 2,3-Dehydro-2-deoxy-N-Acetylneuraminsäure behandelt. Um dem Neuraminidaseinhibitor Membran-

gängigkeit zu verleihen, wurde dieser zeitgleich mit dem Lipofektionsreagenz LipofectACE auf die Zellen gegeben. Das Zellmedium (Häm's F12) für diesen Versuch enthielt also neben 10 % FKS und 400 µg/ml G418 den Neuraminidaseinhibitor 2,3-Dehydro-2-deoxy-N-Acetylneuraminsäure (0,1 mM) sowie 20 µl/ml LipofectACE. Dieses Medium wird 72 h vor der Infektion zur Überschichtung der CHO-HN^{41/6A}-Zellklone eingesetzt (500 µl pro Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatte).

Weitere Mediumwechsel mit frischem Neuraminidaseinhibitor und LipofectACE-Reagenz werden 48 h, 24 h und ein letztes mal 3 h vor der Infektion durchgeführt. Als Kontrollzellen für die Infektion wurden unbehandelte CHO-TRExTM-Zellen eingesetzt.

Für die Infektion wurde das Sendai Virus RS-P-eGFP in F12-Medium (ohne FKS) auf die Zellen gegeben (MOI ≈ 2), nach einer Inkubation von 2 h (33°C) wieder abgenommen und durch frisches Medium (ohne FKS) ersetzt. Die Auswertung der eGFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop erfolgte am dritten Tag nach der Infektion.

Dieser abschließende HAD-Test zur Verifizierung der HN^{41/6A}-Expression zeigte bei allen vier untersuchten Zellklonen CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** ein positives Signal (siehe Abbildung 3.35). Die in diesem Versuch bezüglich der Expressionsparameter und der reduzierten Neuraminidaseaktivität des HN^{41/6A}-Proteins charakterisierten Zellklone CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** vereinten somit in sich alle Eigenschaften, die im Vorfeld der Arbeiten von einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren als Voraussetzung definiert worden waren: Sie zeigten ein positives Signal im HAD-Test, besitzen also einen für die Herstellung infektiöser, rekombinanter Sendai Viruspartikel ausreichend hohen HN^{41/6A}-Protein Expressionslevel; außerdem ist aufgrund der durch die Mutation und die Anwendung des Neuraminidaseinhibitors reduzierten Neuraminidaseaktivität die Infizierbarkeit dieser Helferzellen gewährleistet.

Mit dem hier beschriebenen Vorgehen konnten erstmals stabil transfizierte, monoklonale, HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzellen beschrieben werden. Die hier generierten Zellklone CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** zeigten ein positives Signal im HAD-Test, besitzen also einen HN-Protein Expressionslevel, der für die Herstellung rekombinanter, infektiöser Sendai Virus Partikel ausreichen sollte (Fischer, 1998). Die Zellen können außerdem mit dem beschriebenen

Vorgehen in ihrer Neuraminidaseaktivität so weit abgesenkt werden, daß eine Infizierbarkeit dieser Zellen durch das Sendai Virus gegeben ist.

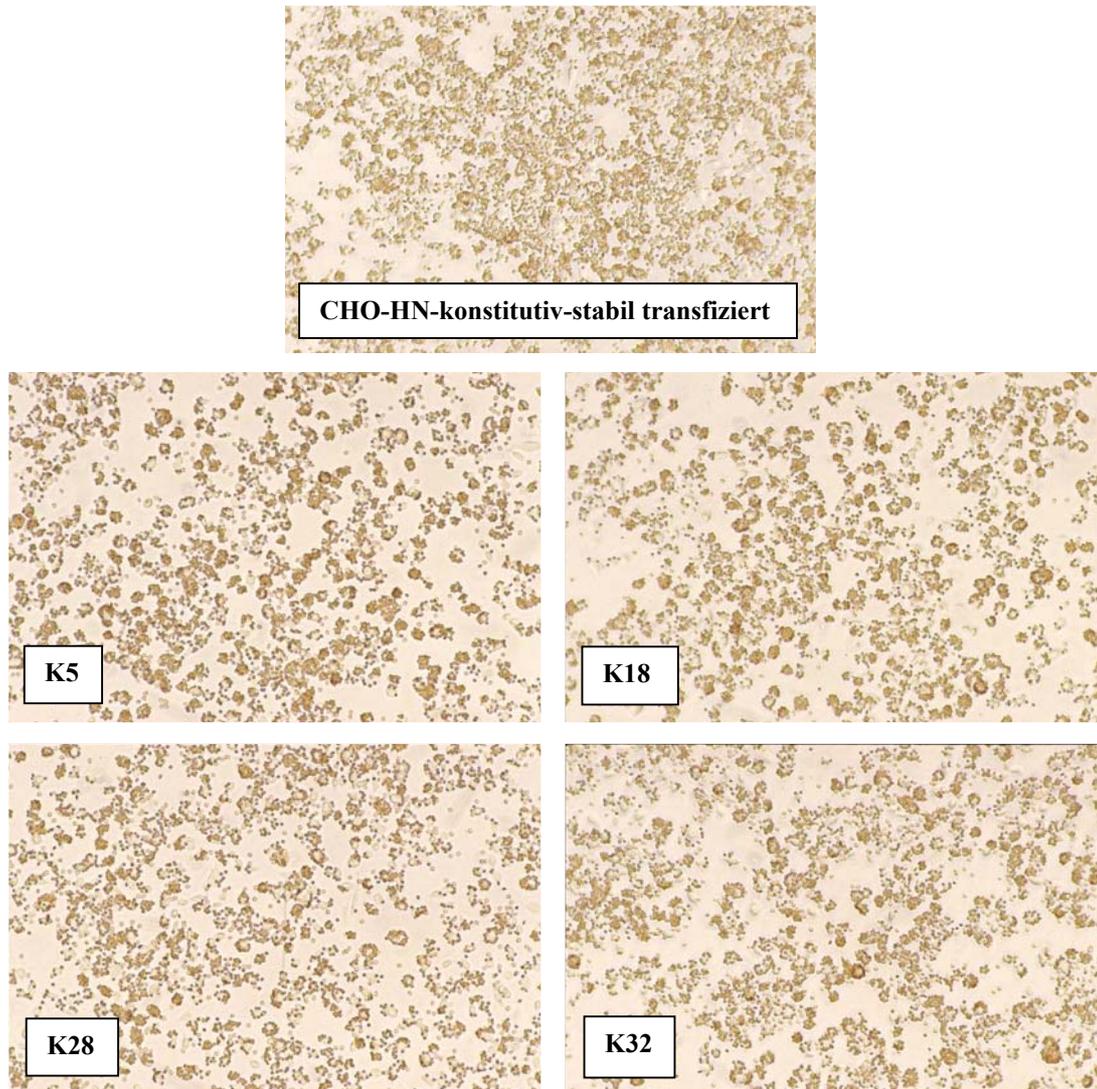


Abbildung 3.35: Nachweis der HN^{41/6A}-Protein Expression auf den Zellklonen CHO-HN^{41/6A}-K5, CHO-HN^{41/6A}-K18, CHO-HN^{41/6A}-K28 und CHO-HN^{41/6A}-K32 nach dem Infektionstest durch das Sendai Virus RS-P-eGFP. Der Nachweistest der HN^{41/6A}-Expression erfolgte durch den HAD-Test. Als Positivkontrolle dienten stabil transfizierte und konstitutiv HN-Protein exprimierende CHO-pcDI18-HN-Zellen (siehe Kapitel 3.2.5).

Ein wesentliches Ziel dieses Projekts, die Herstellung einer stabil transfizierten, monoklonalen HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle war damit erreicht. Nun sollte in einem weiteren Experiment die Fähigkeit dieser Helferzellen zur Unterstützung des Replikationszyklus HN-Protein defizienter Sendai Viren getestet werden.

3.3.5.3 Einsatz der HN^{41/6A}-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Zellklone für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren

In einem weiterführenden Experiment sollte versucht werden, die Zellklone CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** als HN-Protein Transkomplementationszellen für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren einzusetzen. Dabei würde sich zeigen, ob die beiden aufgrund der Vorversuche (Fischer, 1998) geforderten Eigenschaften einer Helfierzelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren – ein für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichender HN-Protein Expressionslevel bei gleichzeitiger Unterdrückung der Neuraminidaseaktivität zur Erhaltung der Infizierbarkeit der Helfierzellen – ausreichend sind und ob diese Zellklone tatsächlich in der Lage wären, mit dem von ihnen zur Verfügung gestellten HN^{41/6A}-Protein den Replikationszyklus HN-defizienter Sendai Viren zu unterstützen.

Die initiale Herstellung der HN-defizienten Sendai Viren für diesen Versuch erfolgte nach dem unter Punkt 5.5.1 und 3.2.4 beschriebenen Standardvorgehen in Six-Well-Zellkulturgefäßen unter Zugabe von 1,5 µg pTM-HN und Verwendung eines HN-defizienten RS-cDNA-Konstrukts, das das eGFP-Gen unmittelbar hinter der *leader*-Sequenz besitzt (RS Id-eGFP-ΔHN). Als Positivkontrolle kam das HN-haltige RS-cDNA-Konstrukt RS Id-eGFP zum Einsatz, das die vollständige Genomlänge des Sendai Virus besitzt und ebenfalls das eGFP-Gen direkt hinter der *leader*-Sequenz enthält. Unmittelbar vor der ersten Passagierung dieser initial hergestellten Sendai Viren waren pro Vertiefung auf einer Six-Well-Zellkulturplatte etwa 500 grün fluoreszierende Zellen detektierbar: Die Ausbeute bei der initialen Herstellung dieser HN-defizienten Sendai Viren ist als Ausgangsmenge für die Vermehrung ausreichend.

Für die Passagierung der HN-defizienten Sendai Viren wurden die Zellklone CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** eingesetzt, wobei für jeden der verwendeten Zellklone ein eigener Ansatz bei der initialen Herstellung der rekombinanten Sendai Viren angelegt wurde. Für die Passagierung der HN-haltigen Sendai Viren (Positivkontrolle; cDNA-Konstrukt RS Id-eGFP) wurden Vero-Zellen verwendet.

Die Helfierzelllinien CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** wurden 72 h vor der jeweils geplanten Viruspassage zu einer Konfluenz von 20 % auf Six-Well-Zellkulturplatten ausgelegt. Das Medium (1000 µl Häm's F12 mit 10 % FKS pro Six-Well-Vertiefung) enthielt außer dem Selektionsantibiotikum G418 (400 µg/ml) zusätzlich den Neuraminidaseinhibitor 2,3-Dehydro-2-deoxy-N-Acetylneuraminsäure (0,1 mM) und 20 µl LipofectACE-Reagenz (5.3.5.1). Dieses Medium wurde 48 h,

24 h und noch einmal 3 h vor der Viruspassage (Infektion) durch frisches Medium ersetzt (siehe oben).

Die erste Viruspassage der initial hergestellten Sendai Viren auf die HN^{41/6A}-exprimierenden Helferzellen wurde gemäß Standardvorschrift nach 60 h durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.6). Bei der initialen Herstellung der HN-defizienten Sendai Viren war das Plasmid pTM-HN zugegeben worden. Damit entstanden initial Sendai Viren, die zwar genotypisch HN-defizient, phänotypisch aber HN-Protein haltig sind und damit die ersten Passagezellen infizieren können. Dies konnte durch die eGFP-Expression auf den Helferzellen der ersten Viruspassage mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops bestätigt werden: In allen Ansätzen waren einige hundert grün fluoreszierende Zellen pro Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte zu sehen. Dieses Resultat ist zugleich die Bestätigung, daß die initiale Herstellung der HN-defizienten Sendai Viren korrekt verlaufen war und daß aus den initialen Herstellungszellen tatsächlich funktionsfähige Sendai Viren entlassen worden waren.

Nach weiteren 60 h erfolgte die zweite Viruspassage (VP2) auf frischen Helferzellen. Diese waren, wie oben beschrieben, ebenfalls 72 h vor der geplanten Viruspassage zu einer Konfluenz von 20 % auf Six-Well-Zellkulturplatten ausgelegt worden. Das Medium (1000 µl Häm's F12 mit 10 % FKS pro Six-Well-Vertiefung) enthielt außer dem Selektionsantibiotikum G418 (400 µg/ml) zusätzlich den Neuraminidaseinhibitor 2,3-Dehydro-2-deoxy-N-Acetylneuraminsäure (0,1 mM) und 20 µl LipofectACE-Reagenz (siehe Kapitel 5.3.5.1). Dieses Medium wurde 48 h, 24 h und noch einmal 3 h vor der Viruspassage (= Infektion) durch frisches Medium ersetzt (siehe oben). Eine Untersuchung dieser Passagezellen mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigte in keinem der Ansätze grün fluoreszierende Zellen. Dieses Experiment wurde in identischer Vorgehensweise dreimal mit demselben Resultat wiederholt. Um einer möglicherweise veränderten Zeitdauer für den Replikationszyklus HN-defizienter Sendai Viren Rechnung zu tragen, wurde in einem weiteren Ansatz die Viruspassage nicht nach 60 h, sondern nach 50 h, beziehungsweise 80 h durchgeführt. Auch hier konnten in keinem der Ansätze grün fluoreszierende Zellen detektiert werden.

Eine Passagierung und Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren war somit mit diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Offenbar sind die beiden geforderten Eigenschaften für eine HN-Transkomplementationszelllinie, nämlich ein ausreichend hoher HN-Expressionslevel und die Infizierbarkeit der Zellen, nicht ausreichend für den erfolgreichen Einsatz dieser Zellen bei der Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren (siehe Kapitel 4).

3.3.5.4 Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle mit Hilfe des HN^{41/6A}-Proteins: Zusammenfassung der Ergebnisse

Die durch stabile Transfektion von CHO-TRExTM-Zellen mit dem Plasmid pcDI18-HN^{41/6A} erhaltenen Zellklone CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** erfüllen die Parameter, die als Voraussetzung als HN-Protein transkomplementierende Helferzellen für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren definiert worden waren: Die Neuraminidaseaktivität kann durch die Mutation und die zusätzliche Anwendung des Neuraminidaseinhibitors so weit abgesenkt werden, daß die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus intakt bleiben und die Infizierbarkeit der Helferzellen somit gegeben ist. Außerdem besitzen diese Helferzellen einen HN-Protein Expressionslevel, dessen Höhe für einen Nachweis im HAD-Test ausreicht. Es konnten hier somit erstmals Helferzellen beschrieben werden, die sich trotz Expression des HN-Proteins durch das Sendai Virus infizieren lassen.

Trotzdem konnten mit Hilfe dieser Zellen HN-defiziente Sendai Viren nicht vermehrt werden. Möglicherweise bedarf es für das Entstehen effektiver *budding*-Strukturen der simultanen Expression weiterer Proteine des Sendai Virus oder eine funktionsfähige Faltung des HN-Proteins kann nur bei gleichzeitigem Vorliegen des HN- und des F-Proteins erfolgen. Die hier beschriebenen Zellen werden die Grundlage für die weitere Etablierung eines zellulären Hilffsystems zur Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren bilden.

4 DISKUSSION

Als im Jahre 1996 zum ersten mal rekombinante Sendai Viren in einem zellgestützten System im Vaccinia-Expressionssystem ausgehend ausschließlich von cDNA hergestellt werden konnten (Kato *et al.*, 1996; siehe Kapitel 3.2.6), wurde damit der Grundstein gelegt für den Einsatz des Sendai Virus als Vektorsystem in der somatischen Gentherapie und bei Vakzinierungsanwendungen. Zudem ermöglichen HN-defiziente Sendai Viren über die Wechselwirkung des F-Proteins mit dem Asialoglykoproteinrezeptor einen leberzellspezifischen Gentransfer (Leyrer *et al.*, 1998 a; Markwell *et al.*, 1985). Um bei diesen *in vivo*-Anwendungen einen effektiven Transfer der genetischen Information in das Zielgewebe zu gewährleisten, werden sehr viele Viruspartikel benötigt. Da aber der komplexe Prozeß der initialen Herstellung rekombinanter Sendai Viren sehr ineffektiv abläuft und von sehr vielen Faktoren abhängt, ist dabei nur eine geringe Ausbeute an rekombinanten Sendai Viren zu erreichen. Die weitere Vermehrung der auf diese Weise generierten Sendai Viren zu experimentell und klinisch anwendbaren Mengen ist somit ein entscheidender Vorgang.

Diese Vermehrung kann im Fall von Sendai Viren mit voller Genomlänge problemlos durch aufeinanderfolgende Viruspassagen auf Helferzellen erfolgen (siehe Kapitel 3.2.6). Bei HN-defizienten Sendai Viren ist diese Vorgehensweise allerdings nicht anwendbar, da ihnen das HN-Protein als Bindeprotein fehlt und somit der Infektionszyklus auch nicht über den normalen zellulären Rezeptor (endständige Neuraminsäuren auf zellulären Oberflächenproteinen und Lipiden; siehe Kapitel 2.1.3.2 und 2.1.5) eingeleitet werden kann. Aus diesem Grund sind für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren Helferzellen nötig, die das HN-Protein für den viralen Replikationszyklus *in trans* zur Verfügung stellen. Auf diese Weise sollten bei Viruspassagen auf den HN-Protein exprimierenden Helferzellen genotypisch HN-defiziente, phänotypisch aber HN-Protein haltige Sendai Viren entstehen, die in der Lage sein sollten, den Zelleintritt im Rahmen der Virusvermehrung über den klassischen zellulären Sialorezeptor zu initiieren (siehe Kapitel 2.1.5).

Um als Helferzelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren in Frage zu kommen, muß eine HN-Protein exprimierende Zelllinie allerdings wesentliche Eigenschaften aufweisen. Die wichtigsten Erfordernisse für eine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle liegen in den Expressionsparametern des HN-Proteins, insbesondere in der Möglichkeit der selektiven Regulierung der Rezeptorbindefunktion und der Neuraminida-

seaktivität des HN-Proteins: Während die Rezeptorbindefunktion des HN-Proteins in der Hülle des Sendai Virus für die Einleitung des Infektionszyklus bei der Passagierung der Sendai Viren unentbehrlich ist, muß die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins, das in der Helferzelle exprimiert wird, bis nach der Infektion abgesenkt, nach Ablauf des Replikationszyklus der Sendai Viren aber wieder vorhanden sein, um eine Freisetzung der Sendai Viren von der Zelle zu ermöglichen. Diese strikten Kriterien für eine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle wurden im Rahmen von Vorversuchen untersucht (Fischer, 1998): Bei diesen Versuchen konnte festgestellt werden, daß eine stabil transfizierte, konstitutiv HN-Protein exprimierende Zelllinie nicht durch das Sendai Virus infizierbar ist, da durch die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus zerstört werden (Superinfektionsschutz, siehe Kapitel 2.1.3.2 und 2.1.5). Die Neuraminidaseaktivität war dabei auch nach Absenkung der Menge des HN-Proteins auf ein Zehntel des Wertes in akut mit Sendai Virus infizierten Zellen für die Rezeptorzerstörung noch ausreichend. Das bedeutet, daß die Neuraminidasefunktion des HN-Proteins auch bei Vorliegen dieser sehr geringen Menge an HN-Protein noch eine ausreichend hohe Aktivität aufweist, um die zellulären Rezeptoren auf der Oberfläche der Helferzelle zu zerstören und dieser Resistenz gegen eine Sendai Virus Infektion zu verleihen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß ein auf ein Zehntel der HN-Protein Menge in akut infizierten Zellen reduzierter HN-Protein Expressionslevel für die Herstellung infektiöser Sendai Viren gerade noch ausreichend ist (Fischer, 1998).

Eine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle sollte außerdem auf einer stabil transfizierten, monoklonalen Zelllinie basieren. Eine solche Zelle bietet gegenüber einer lediglich transienten Expression des HN-Proteins den Vorteil, daß ausnahmslos alle Zellen in der Lage sind, das HN-Protein für den Replikationszyklus des Sendai Virus zur Verfügung zu stellen und nicht nur der geringe Prozentsatz an transient transfizierten Zellen in einem Ansatz. Damit sollte eine einmal etablierte Zelllinie eine optimale Effektivität und Produktivität bei der Vermehrung der HN-defizienten Sendai Viren bieten. Außerdem sollte durch den Einsatz einer stabil transfizierten, monoklonalen Zelllinie eine Basis für vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse geschaffen werden.

Mit diesen Ergebnissen waren die für die **Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren erforderlichen Parameter definiert**: Die Helferzelle mußte einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel aufweisen und außer-

dem gleichzeitig aber auch durch das Sendai Virus infizierbar sein. Diese beiden Eigenschaften schließen sich eigentlich durch die beiden entgegengesetzt wirkenden Funktionen des HN-Proteins aus (siehe Kapitel 2.1.5). Die Schwierigkeit bei der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle bestand daher vor allem auch darin, eben diese beiden Eigenschaften in einer Helferzelle zu vereinigen.

So wurde als erste Strategie zur Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle der Einsatz eines **induzierbaren Expressionssystems** in Betracht gezogen. Durch die induzierbare Expression des HN-Proteins in den Helferzellen sollten die beiden Anforderungen an eine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle realisiert werden können: Im uninduzierten Zustand sollte die HN-Protein Expression in den Helferzellen so niedrig sein, daß dessen Neuraminidaseaktivität nicht für eine Zerstörung der zellulären Rezeptoren ausreicht; nach Induktion der HN-Protein Expression sollte ein für die Herstellung funktionsfähiger und infektiöser Sendai Virus Partikel ausreichender HN-Protein Expressionslevel erreicht werden können. Aus den Helferzellen sollten Sendai Viren entlassen werden, die ein in Bezug auf die Rezeptorbindungsfunktion und die Neuraminidaseaktivität normales HN-Protein in der Hülle tragen und die den Zelleintritt auf den jeweils nächsten Passagezellen über den klassischen HN-Protein vermittelten Infektionsweg einleiten können.

Bei der Auswahl eines geeigneten induzierbaren Expressionssystems für die Herstellung einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle wurde als **Parameter mit der höchsten Priorität die Infizierbarkeit** und damit die Absenkung der Neuraminidaseaktivität erachtet. Die Eigenschaften des induzierbaren Expressionssystems sollten so gewählt sein, daß eine Infizierbarkeit der Helferzellen in jedem Fall gewährleistet sein würde. Zu Beginn der Arbeiten wurde die Höhe des maximal erreichbaren HN-Protein Expressionslevels als kein kritischer Faktor erachtet, da die Herstellung infektiöser Sendai Virus Partikel auch mit einem Zehntel der HN-Protein Menge von akut mit Sendai Virus infizierten Zellen noch möglich ist (Fischer, 1998; siehe oben). Aus diesem Grund kam als erstes induzierbares Expressionssystem das **GeneSwitch™-System** (siehe Kapitel 3.1.2.1 und 5.2.1) zum Einsatz. Dieses leitet sich ab von einem hormonellen Promotorsystem und besitzt die für solche Mechanismen typischen Eigenschaften: Einer sehr niedrigen Basisexpression im uninduzierten Zustand steht ein nicht sehr hoher maximal erreichbarer Expressionslevel des Transgens nach Induktion gegenüber. Diese sehr niedrige Basisexpression im uninduzierten Zustand konnte im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestätigt werden: Im transien-

ten Expressionsversuch von CHO-GeneSwitch™-Zellen mit einem β -Galaktosidase exprimierenden Plasmid konnte mit diesem sehr sensitiven Nachweissystem ohne Induktion auch nach mehrtägiger Inkubation der Färbereaktion keinerlei Blaufärbung der Zellen beobachtet werden (siehe Kapitel 5.4.6). Eine derartige Nachweisreaktion gilt als sehr sensitiv, da auch nur sehr geringe Mengen an β -Galaktosidase-Molekülen aufgrund ihrer enzymatischen Tätigkeit über einen so langen Inkubationszeitraum wenigstens zu einer geringen Blaufärbung führen würden. Wenn auch das Resultat dieses Versuchs keinen definitiven Beweis dafür darstellt, daß die Basisexpression des HN-Proteins so niedrig gehalten werden könnte, um eine Infizierbarkeit der Helferzellen zu ermöglichen, so ist es doch sehr eindrucksvoll (Abruzzese, 1999). Nach diesem Versuch könnte das GeneSwitch™-System also möglicherweise tatsächlich in der Lage sein, eine für die Aufrechterhaltung der Infizierbarkeit der Helferzellen ausreichend niedrige HN-Protein Basisexpression zu gewährleisten. Allerdings kann das GeneSwitch™-System offensichtlich aufgrund seines verhältnismäßig schwachen Promotors einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hohen HN-Protein Expressionslevel nicht erreichen (Abruzzese, 1999). Nach Transfektion des HN-Protein exprimierenden, induzierbaren Expressionsplasmids pGene/V5-His-A-HN und Selektion stabiler Transfektanten konnte nämlich weder mit Hilfe eines HAD-Tests, noch durch einen Western Blot eine HN-Protein Expression in den selektierten Zellklonen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.1.2). In Vorarbeiten war bereits festgestellt worden, daß ein positives Signal im Western Blot erst bei Vorliegen einer für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Menge in den Zellen erreicht werden kann. Dabei wurden die Western Blot-Analysen der selektierten Zellklone in dieser Arbeit mit bereits selektierten, monoklonalen Zellpopulationen durchgeführt. Das vorliegende Ergebnis kann also auch nicht auf einen möglicherweise großen Anteil untransfizierter Zellen zurückzuführen sein, wie er beispielsweise nach transienter Transfektion aufgrund einer eventuell geringen Transfektionseffizienz vorliegen würde. Zudem schließt die sehr hohe Zahl von rund 120.000 getesteten stabil transfizierten Transfektanten statistische Fehler aus. Laut Auskunft der Herstellerfirma (persönliche Kommunikation mit der Firma Valentis; 77381 Texas, USA) des GeneSwitch™-Systems sollte dieses induzierbare Expressionssystem nach Induktion durchaus zu einem hohen Expressionslevel des Transgens in der Lage sein. Allerdings war bis zu diesem Zeitpunkt auch noch nicht versucht worden, mit diesem System virale Glykoproteine in stabil transfizierten Zellen zu hoher Menge zu exprimieren. Und bei den bis dahin mit diesem System exprimierten en-

zymatischen Proteinen war die Höhe des Expressionslevels möglicherweise nicht so entscheidend (Abruzzese *et al.*, 1999).

Ein bemerkenswerter Befund bei der Arbeit sowohl mit dem GeneSwitch™, als auch mit dem TReX™-System, war die Beobachtung, daß es offensichtlich einen sehr großen Unterschied bezüglich der Expressionsstärke nach **transienter und stabiler Transfektion** gibt: So war es nach transienter Transfektion auch mit dem verhältnismäßig schwachen Promotor des GeneSwitch™-Systems möglich, einen so hohen HN-Protein Expressionslevel zu erhalten, daß das Kriterium für einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel erreicht werden konnte: eine Anlagerung von Erythrocyten und damit ein positiver HAD-Test. Die HN-Protein Nachweisreaktionen (HAD-Test oder Western Blot) werden erst nach der Selektion stabiler Transfektanten, nachdem also wenige oder vielleicht nur eine einzige der Plasmidkopien ins zelluläre Genom eingebaut worden waren, negativ. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die bereits angesprochenen Verluste beim Einbau der Plasmidkopien ins zelluläre Genom zu erklären (siehe Kapitel 3.2.4, persönliche Kommunikation mit Invitrogen; Knippers, 1997; Lodish *et al.*, 1995). Möglicherweise führt nach transienter Transfektion das Vorhandensein einer sehr großen Anzahl von Plasmidmolekülen im oder am Zellkern zu einer sehr starken Expression, zumal zelluläre Regulationsmechanismen zur Kontrolle der Genexpression und der Proteinmenge in diesem Stadium nur unzureichend greifen (Knippers, 1997). Werden die Plasmidkonstrukte durch seltene Rekombinationsereignisse ins zelluläre Genom integriert, so kommt es aufgrund der dazu notwendigen Linearisierung, der Insertionsmutagenese und der Aktivität der zellulären Rekombinasen zu einem beträchtlichen Verlust an Plasmidkopien, so daß nach der Selektion stabiler Transfektanten nur noch eine sehr geringe Zahl, möglicherweise auch nur noch eine einzige Plasmidkopie, im zellulären Genom vorliegt (siehe Kapitel 3.2.4, persönliche Kommunikation mit der Firma Invitrogen; Knippers, 1997; Mortensen, 1997). Die für die Integration der Plasmidkopien verantwortlichen Rekombinasen sind während der mitotischen Zellteilungen in Zellkultur größtenteils nicht oder nur in sehr geringen Mengen exprimiert (Knippers, 1997; Seyffert *et al.*, 1998), so daß dieser Einbau ins zelluläre Genom in gewisser Weise ein Nadelöhr darstellt, nach dessen Durchgang von den wohl einigen hundert oder tausend pro Zelle nach transienter Transfektion vorliegenden Plasmidkopien nur noch sehr wenige oder nur ein einziges funktionsfähiges übrigbleiben. Und bei diesen wenigen ins Genom integrierten Plasmidkopien ist die Transkription des HN-Gens und die Expression des HN-Proteins dann zusätzlich noch von der Unversehrtheit des HN-Gens und vom genomischen Insertionsort abhängig. Außer-

dem unterliegt dann die Expression dieses Fremdgens den zellulären Regulationsmechanismen für die Genexpression (Knippers, 1997; Seyffert *et al.*, 1998) und es ist durchaus denkbar, daß die Zelle die Expression eines fremden viralen Glykoproteins mit enzymatischer Aktivität herunterreguliert, um keinen Schaden zu nehmen. Ein negativer Selektionsdruck könnte hier möglicherweise durch Interaktionen der Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins mit der intrazellulären Zielsteuerung von neusynthetisierten Proteinen entstehen. Die intrazelluläre Zielsteuerung von Proteinen basiert unter anderem auch auf Zuckerseitenketten, die kotranslational im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat an die wachsenden Polypeptidketten angefügt werden. Dabei spielen auch Neuraminsäuren eine wichtige Rolle (Lodish *et al.*, 1995; Stryer, 1998). Ein Eingreifen der Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins in dieses komplexe Netzwerk könnte für die Zelle durchaus ein ernstes Problem darstellen, so daß es zu den beschriebenen Effekten des Rückgangs des HN-Protein Expressionslevels über die Zeit und mehrere Zellpassagen kommen könnte.

In diesem Zusammenhang sei eine Arbeit aus dem Jahr 2000 (Hu *et al.*, 2000) erwähnt, in der festgestellt wurde, daß bei Expression des HN-Proteins des Sendai Virus in Säugerzellen die Menge des vorhandenen **HN-Proteins nur sehr gering ist** im Vergleich zu akut mit Sendai Virus infizierten Zellen, obwohl die Menge der vorhandenen **HN-spezifischen mRNA sehr hoch ist** und durchaus im Bereich der Menge von akut infizierten Zellen liegt. Der HN-Transkriptionslevel entspricht also im Fall des Sendai Virus HN-Gens nicht unbedingt dem HN-Protein Expressionslevel. Die Annahme, daß der HN-Protein Expressionslevel auf Proteinebene herunterreguliert wird, könnte durch diesen Befund bestätigt werden. Daher muß diskutiert werden, ob möglicherweise bis jetzt unbekannt virale Faktoren für eine positive Regulation der HN-Protein Menge verantwortlich sein könnten. Wenn auch im Rahmen dieser Arbeit der HN-Expressionslevel auf mRNA-Ebene nicht direkt bestimmt worden war, so erscheinen in diesem Zusammenhang auch die in dieser Arbeit beschriebenen Erfahrungen mit der schrittweisen Absenkung des HN-Protein Expressionslevels bis unter die Nachweisgrenze mit zunehmender Anzahl von Zellpassagen sehr interessant. Es war hierbei beobachtet worden, daß bei stabil transfizierten Zellen bei konstitutiver und längerfristiger Expression des HN-Proteins der HN-Protein Expressionslevel mit jeder Zellpassage abnimmt und schließlich nach einigen Zellpassagen ganz unter die Nachweisgrenze fällt (siehe Kapitel 3.2.5, Kapitel 3.3.2.2 und Abbildung 3.22).

Interessanterweise konnte bei den Zellen, die stabil und konstitutiv das mutierte Protein HN^{41/6A} exprimieren, weder eine Abnahme des HN-Expressionslevels über die Zellpassagen,

wie sie sich bei den stabil transfizierten und konstitutiv HN-Protein exprimierenden Zellen zeigte, noch eine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit und der Adhäsionseigenschaften, wie sie bei den CHO-K17-Zellen infolge der HN-Expression auftrat (siehe Kapitel 3.3.2.2), beobachtet werden. Sollte dieser Umstand möglicherweise auf die geringere Neuraminidaseaktivität des in diesem Versuch exprimierten HN-Proteins HN^{41/6A} zurückzuführen sein können, dann wäre eine Abklärung der Auswirkung der Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins auf die Zellen sehr interessant, zumal die Herstellung stabil transfizierter Zellen und die längerfristige Expression von Proteinen, die mit dem HN-Protein verwandt sind, aber keine Neuraminidaseaktivität aufweisen, kein Problem zu sein scheint. So finden sich in der Literatur viele Arbeiten, die beispielsweise eine stabile Transfektion und andauernde konstitutive Expression des G-Proteins des Vesicular Stomatitis Virus (Klenk & Roberts, 2002) oder des Oberflächenglykoproteins des Ross River Virus (Sharkey et al., 2001) beschreiben. Beide Proteine sind virale Oberflächenglykoproteine und ähneln dem HN-Protein des Sendai Virus in Glykosylierung und Größe, besitzen eine Hämagglutinations-, aber keine Neuraminidaseaktivität. Allerdings scheint es nach stabiler Transfektion und Expression des H-Proteins des Masernvirus, das ebenfalls keine Neuraminidaseaktivität besitzt, zu ähnlichen Problemen zu kommen wie nach stabiler Transfektion und dauerhafter Expression des HN-Proteins: auch hier wurde eine offensichtliche Cytotoxizität festgestellt, die sich in einer Abnahme des HN-Protein Expressionslevels über die Zeit und mehrere Zellpassagen äußerte. Und auch hier war der Expressionslevel des H-Proteins unter der Nachweisgrenze, wohingegen die virale mRNA für das H-Protein durchaus detektierbar war (Hirano & Wong, 1991; Wong & Hirano, 1986). Dieses Resultat deckt sich mit der Beobachtung von Hu *et al.* (2000), in der von einer Abnahme des HN-Protein Expressionslevels über mehrere Zellpassagen berichtet worden war, wobei die HN-spezifische mRNA konstant in hohen Mengen vorhanden war (vergleiche Hu *et al.*, 2000, siehe oben). Allerdings könnte dieser Befund möglicherweise eine Ausnahme darstellen und durch die Wechselwirkung des H-Proteins des Masernvirus mit dem CD46-Oberflächenprotein der Zelle erklärt werden: Dieses CD46-Protein dient dem Masern Virus als zelluläres Bindeprotein für den Zelleintritt. Durch den H-Protein vermittelten Adsorptionsvorgang und die Aufnahme des Masern Virus in die Zelle über die durch das F-Protein eingeleitete Membranfusion wird das CD46-Protein von einigen Masern Virus Stämmen verändert und verliert so sein Funktionsfähigkeit. In seiner normalen Funktion schützt das CD46-Protein die Zelle vor unspezifischer Lyse durch das Komplementsystem, erfüllt also im Organismus für die Zelle eine lebenswichtige Aufgabe. Nun könnte das CD46-Protein auf diese

Weise auch durch ein in der Zelle konstitutiv exprimiertes H-Protein verändert werden, was die Zelle dazu veranlaßt, die Menge des H-Protein zu reduzieren, um selbst keinen Schaden zu nehmen (Fields, 2001; Modrow & Falke, 1998). Für die erfolgreiche Herstellung stabil transfizierter Zellen mit anderen viralen Glykoproteinen, die eine Neuraminidaseaktivität aufweisen, wie etwa dem NA-Protein des Influenza Virus, finden sich keine Arbeiten in der Literatur. Der erreichbare Expressionslevel von stabil ins Genom integrierten Plasmidkonstrukten geht also im Vergleich zur transienten Transfektion sehr stark zurück.

Das **Regulatorprotein des GeneSwitch™-Systems (GeneSwitch™-Protein)** ist ein Fusionsprotein aus verschiedenen Domänen. Dabei wird die sequenzspezifische Bindung dieses Regulatorproteins an den Promotor durch die DNA-Bindedomäne des GAL4-Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* vermittelt, während die Transaktivierungsdomäne des humanen Transkriptionsfaktors NFκB die Transkription steuert (siehe Kapitel 3.1.2.1). Eine Modifikation an diesem induzierbaren Expressionssystem zur Erhöhung der Expressionsleistung müßte sowohl die jeweilige Komponente des regulatorischen, hybriden GeneSwitch™-Proteins als auch die entsprechende DNA-Sequenz innerhalb des Promotors berücksichtigen und wäre daher nur unter sehr hohem Arbeits- und Materialaufwand durchführbar. Zudem wäre nicht vorherzusehen, ob die besondere Eigenschaft des GeneSwitch™-Systems, nämlich seine sehr geringe Basisexpression, dann noch vorhanden wäre.

Aus diesem Grund wurde zur Erhöhung der Expressionsleistung ein anderes induzierbares Expressionssystem eingesetzt. Die Wahl fiel auf das **TREx™-System**: Dabei handelt es sich um ein Tetrazyklin-abhängiges induzierbares Expressionssystem, das für die Expression des Transgens im Gegensatz zu dem ursprünglich von Gossen und Bujard (siehe Kapitel 3.1.2.2; Gossen & Bujard, 1992) beschriebenen und entwickelten System keine zusätzlichen viralen Transaktivatoren benötigt (Yao *et al.*, 1998). Die Expression wird bei der kommerziell verfügbaren Form des TREx™-Systems durch einen hCMV-Promotor gesteuert. Nach transienter Transfektion der CHO-TREx™-Zellen mit dem Plasmid pcDNA5/TO-HN konnte in den Zellen ein positives HAD-Signal detektiert werden, das aber ebenfalls, wie beim GeneSwitch™-System (siehe oben), nach Selektion stabiler Transfektanten nicht mehr nachweisbar war. Dieses Ergebnis entspricht dem bei der Expression des HN-Proteins mit dem GeneSwitch™-System beobachteten Resultat (vergleiche Kapitel 3.3.1.2; 3.3.2.1; Abbildung 3.26 und Abbildung 3.29): Während nach transienter Transfektion des Expressionsplasmids pcDNA5/TO-HN mittels HAD-Test eine HN-Protein Expression detektierbar war, fand bei den vielen Zellteilungen während der Selektion durch die entsprechenden Antibiotika und der

damit verbundenen Aufteilung der Zell- und Kernmasse offensichtlich eine „Ausverdünnung“ der transient vorliegenden Plasmidmoleküle statt, so daß mit zunehmender Anzahl der Zellteilungen nicht mehr genügend Plasmidkonstrukte für die Expression des HN-Proteins zu einer mit dem HAD-Test detektierbaren Menge zur Verfügung standen (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). Auch die Expressionsstärke des im TREx™-System eingesetzten hCMV-Promotors reicht also offensichtlich nach stabiler Transfektion nicht aus, um einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel zu erreichen. Auch bei den Experimenten von Susanne Fischer (Fischer, 1998) war der hCMV-Promotor alleine, ohne das Verstärkerelement Intron A, in seiner Expressionsleistung nicht stark genug für einen HN-Protein Expressionslevel, der für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausgereicht hätte. Allerdings sind die Sequenzen des hCMV-Promotors, der bei den Arbeiten von Susanne Fischer eingesetzt wurde, und des hCMV-Promotors im TREx™-System, vor allem in den 3'- und 5'-Randbereichen nicht völlig identisch. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit nochmals versucht, das HN-Protein mit Hilfe des unveränderten hCMV-Promotors des TREx™-Systems zu einem für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden Expressionslevel zu exprimieren (siehe Kapitel 3.3.2.1 und Abbildung 3.29).

Parallel dazu erfolgte aber bereits der Einbau des *enhancer*-Elements Intron A in das Expressionsplasmid pcDNA5/TO-HN. Durch diese Verstärkung des Promotors sollte eine Erhöhung der Expressionsleistung erreicht werden: es entstand das Expressionsplasmid pcDNA5/TO-HN-2xP. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erst durch den Einsatz dieses verstärkten Expressionsplasmids für die Herstellung stabil transfizierter Zellen ein positives HAD-Signal und damit ein für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichender HN-Protein Expressionslevel detektiert werden. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen von Susanne Fischer (1998): In diesen Versuchen konnte ebenfalls ein positives HAD-Signal auf stabil transfizierten Zellen erst nach Modifikation des hCMV-Promotors mit dem Verstärkerelement Intron A erreicht werden. Nach Selektion stabiler Transfektanten konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Zelllinien mit einem ausreichenden HN-Protein Expressionslevel hergestellt werden. Nach einem abschließenden HAD-Test wurde ein Zellklon für die weiteren Arbeiten ausgewählt: Hierbei handelte es sich um den **Zellklon CHO-K17** (siehe Kapitel 3.3.2.2).

Um die zweite erforderliche Qualität dieser potentiellen **Helferzelllinie CHO-K17** zu prüfen, wurde unmittelbar nach der Selektion stabil transfizierter Zellklone dieser HN-Protein exprimierenden Zelllinie **CHO-K17 ein Infektionstest mit einem Sendai Virus** durchge-

führt (siehe Kapitel 3.3.2.2): Dieser brachte allerdings das Ergebnis, daß diese Helferzellen CHO-K17 aufgrund einer zu hohen HN-Protein Basisexpression und der durch die Neuraminidaseaktivität offensichtlich verursachten Zerstörung der zellulären Rezeptoren nicht durch das Sendai Virus infizierbar waren. Eine verhältnismäßig hohe Basisexpression im uninduzierten Zustand ist ein bekanntes Problem bei Tetrazyklin-induzierbaren Expressionsystemen (Hillen & Berens, 1994; Hillen *et al.*, 1983); in der Tat wurde hier die HN-Protein Basisexpression nach einigen Zellpassagen nach der Monoklonalisierungsprozedur sogar so hoch, daß diese durch einen HAD-Test nachgewiesen werden konnte. Diese hohe HN-Protein Basisexpression konnte auch nicht durch den Einsatz eines speziellen, geprüft Tetrazyklin-freien fötalen Kälberserums (siehe Kapitel 3.1.2.2 und 5.10) für die Zellkultur gelöst werden; dieses sollte unerwünschte Kreuzreaktionen verhindern, die von möglicherweise von der Kälbermast im fötalen Kälberserum verbliebenen Rest-Tetrazyklin verursacht werden könnten. Eine hohe Basisexpression konnte beim TREx™-System auch nach Transfektion eines eGFP- oder β -Galaktosidase-exprimierenden induzierbaren Expressionsplasmids beobachtet werden: Schon nach kurzer Zeit nach der Transfektion war auch im jeweils nicht induzierten Kontrollansatz eine schwache Transgenexpression nachweisbar, die sich nach längerer Inkubationszeit auch zu einem deutlichen Signal entwickelte. Dies war beim GeneSwitch™-System niemals der Fall gewesen.

Mit dem TREx™-System zur induzierbaren Expression von Transgenen in Säugerzellen konnte also, wie auch mit dem GeneSwitch™-System (siehe oben), nur jeweils einer der beiden erforderlichen Parameter einer stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle erreicht werden: Beim GeneSwitch™-System war die Neuraminidaseaktivität im uninduzierten Zustand so gering, daß eine Infektion der stabil transfizierten Zellen höchstwahrscheinlich möglich gewesen wäre, aber der maximal erreichbare HN-Protein Expressionslevel war für die Herstellung infektiöser Sendai Viren zu niedrig (siehe Kapitel 3.3.1). Mit Hilfe des TREx™-Systems hingegen konnte (nach Modifikation des Promotors mit dem Intron A; Boshart *et al.*, 1985) nach Induktion ein ausreichend hoher HN-Protein Expressionslevel erreicht werden; allerdings war die HN-Protein Expression und damit die Neuraminidaseaktivität im uninduzierten Zustand durch den verstärkten Promotor noch so hoch, daß offensichtlich die endständigen Neuraminsäuren der zellulären Rezeptoren zerstört wurden, da eine Infektion der Zellen durch das Sendai Virus nicht möglich war (siehe Kapitel 3.3.2).

Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll die **Limitierungen beim Einsatz induzierbarer Expressionssysteme**: Es war offensichtlich bisher nicht möglich, ein induzierbares Expressionssystem zu entwickeln, das im uninduzierten Zustand einerseits eine sehr niedrige Basisexpression und andererseits nach Induktion aber auch einen sehr hohen Expressionslevel bietet. Bei beiden eingesetzten induzierbaren Expressionssystemen ist offensichtlich der Regulationspielraum zu gering. Um beide Eigenschaften in einem einzigen induzierbaren Expressionssystem zu vereinen, ist offensichtlich ein sehr hoher Entwicklungsaufwand nötig (siehe weiter unten). Die Schwierigkeit bei der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle scheint also darin zu bestehen, durch den Einsatz eines starken Promotors einen für die Herstellung funktionsfähiger und infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel zu erreichen und andererseits die Expression des HN-Proteins und damit die Neuraminidaseaktivität im uninduzierten Zustand so weit abzusinken, daß die zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus intakt bleiben.

Diese Schwierigkeit sollte durch den Einsatz des **Cre/ loxP-Systems** (Sternberg & Hamilton, 1981) gelöst werden: Dabei wurde in das für die konstitutive Expression des HN-Proteins bereits bewährte Expressionsplasmid pcDI18-HN eine von zwei loxP-Sequenzen flankierte Transkriptionsstopkassette zwischen dem Promotor und dem Transgen eingesetzt. Diese Transkriptionsstopkassette kann durch die Cre-Rekombinase ausgeschnitten werden, wodurch die Induktion der Expression erfolgt. Die Transkriptionsstopkassette besteht aus vier direkt hintereinandergeschalteten SV40-Polyadenylierungssequenzen inklusive der Transkriptionsterminationssignale und erstreckt sich über eine Länge von etwa 800 Basenpaaren. Diese Art der Transkriptionshemmung hat gegenüber der Bindung des Tetrazyklin-Repressor-Proteins an die Tetrazyklin-Operator-Sequenz, wie sie im TReXTM-System eingesetzt wird, zwei entscheidende **Vorteile**: Erstens kann die Transkriptionsstopkassette beliebig lang (und damit effektiv) sein und hat trotzdem keinen störenden Einfluß auf die Transkription, da sie durch die Cre-Rekombinase ausgeschnitten und damit entfernt wird. Nach diesem Exzisionsprozess bleibt lediglich eine Sequenz von 34 Basenpaaren zwischen dem Promotor und dem Transgen bestehen, die sich aber nicht negativ auf die Expression auswirkt (Hoess & Abremski, 1985; Stricklett *et al.*, 1999). Zweitens muß die Transkription im reprimierten Zustand nicht aktiv durch eine starke Bindung eines Regulatorproteins an eine DNA-Sequenz vor dem Transgen inhibiert werden (Hillen & Berens, 1994; Hillen *et al.*, 1983), sondern es ist vielmehr so, daß die Transkriptionsstopkassette in sich die entsprechenden Signale trägt, die die RNA-Polymerase II dazu veranlassen, ihr Template zu verlassen. Daher sollte es auch

nicht zu der Art von „Ermüdungserscheinung“ in der Repression der Transgenexpression kommen, wie sie beim Einsatz des TRExTM-Systems zu beobachten war (siehe Kapitel 3.3.2; Helferzelle CHO-K17, Kapitel 3.3.2.2 und Abbildung 3.30).

Die Cre-Rekombinase könnte für einen schnellen Vorversuch sehr leicht durch ein **Cre-Rekombinase exprimierendes Adeno Virus** in der Zelle exprimiert werden (Glotzer *et al.*, 2000; Michou *et al.*, 1999). Als endgültige Methode für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren wäre dieses Vorgehen allerdings ungeeignet, da es zu einer Kontamination der so vermehrten HN-defizienten Sendai Viren mit dem Adeno-Cre Virus führen würde. Das Adeno-Cre Virus würde möglicherweise aufgrund seiner hohen Immunogenität bei einem späteren *in vivo*-Einsatz der so vermehrten HN-defizienten Sendai Viren unerwünschte Kreuzreaktionen und Komplikationen verursachen. Um das zu vermeiden, sollte im Rahmen dieser Versuche zur Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle auf die Verwendung eines zusätzlichen Helfervirus verzichtet werden. Lediglich für eine rasche Überprüfung der prinzipiellen Funktionsfähigkeit des Cre/ loxP-System wurden HeLa-Zellen nach Transfektion mit dem Plasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP mit einem Adeno Virus, das die Cre-Rekombinase exprimiert, infiziert.

Durch die von dem Adeno Virus exprimierte Cre-Rekombinase sollte die Transkriptionsstopkassette in dem Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP ausgeschnitten und damit die Expression des *enhanced green fluorescent protein* induziert werden. Bei dem darauf folgenden Nachweisverfahren am Fluoreszenzmikroskop konnte in diesem Versuch allerdings keine eGFP-Expression in den Zellen detektiert werden. Um ein möglicherweise nicht funktionsfähiges Adeno-Cre Virus zu umgehen, wurde dann doch sofort auf die als endgültige Methode geplante Vorgehensweise übergegangen: Im Rahmen einer Kotransfektion wurden CHO-GeneSwitchTM-, beziehungsweise CHO-TRExTM-Zellen mit den entsprechenden induzierbaren Expressionsplasmiden für die Cre-Rekombinase pGene/V5-His-A-Cre, beziehungsweise pcDNA5/TO-Cre und dem durch die Cre-Rekombinase induzierbaren Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP transfiziert. Bei diesem Vorgehen wird die Cre-Rekombinase durch die jeweiligen induzierbaren Expressionsplasmide pGene/V5-His-A-Cre, beziehungsweise pcDNA5/TO-Cre zur Verfügung gestellt. Die Induktion der HN-Protein Expression von dem induzierbaren Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-eGFP erfolgt dabei in zwei Stufen: Durch Zugabe des Induktors Mifepristone beziehungsweise Tetrazyklin wird primär die Expression der Cre-Rekombinase induziert. Dieses Protein kann dann die genomische zelluläre DNA beziehungsweise nicht integrierte Plasmidkonstrukte nach loxP-

Sequenzen durchsuchen und die dazwischenliegende Transkriptionsstopkassette ausschneiden, was zur Induktion der Expression des Transgens führt.

Der Vertreiber des GeneSwitch™- und des TReX™-Systems (Firma Invitrogen) empfiehlt für beide induzierbaren Expressionssysteme eine **Standardinkubationszeit von 24 Stunden**. Nach dieser Zeit ist der höchstmögliche Expressionslevel erreicht. Bei weiterem Vorhandensein des Induktors im Medium wird dieser Expressionslevel gehalten. Möglicherweise wäre diese Inkubationszeit für ein derartiges zweistufiges Induktionsverfahren beim Cre/ loxP-System nicht ausreichend. Daher wurde die Inkubationszeit des Induktors auf den Zellen bei diesen Versuchen auf 48 Stunden erhöht. Mit diesem Vorgehen war nach transienter Kotransfektion der beiden Plasmide mit beiden Systemen (GeneSwitch™- und TReX™-System) in den Zellen eine eGFP-Expression nachweisbar. Nach Selektion stabiler Transfektanten konnte allerdings keine eGFP-Expression detektiert werden. Das gleiche Vorgehen wurde mit dem durch die Cre-Rekombinase induzierbaren HN-Protein Expressionsplasmid pcDI18-loxP-Stop-loxP-HN durchgeführt. Hier konnte nach Induktion weder nach transienter Transfektion noch nach Selektion stabiler Transfektanten eine HN-Protein Expression nachgewiesen werden (HAD-Test).

Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte eine für diese Anwendung nicht ausreichende Aktivität der Cre-Rekombinase sein. Wie oben erwähnt, ist das Erreichen eines mit dem HAD-Test nachweisbaren HN-Protein Expressionslevels bei stabil transfizierten Zellen ein sehr kritischer Faktor und kann möglicherweise nur dann erreicht werden, wenn alle ins Genom integrierten Kopien des HN-Expressionskonstrukts zur Expression des HN-Proteins beitragen. Bei Verwendung des Cre/ loxP-Systems ist es dazu aber notwendig, daß die Cre-Rekombinase alle im Genom integrierten Kopien finden kann, was wahrscheinlich einen sehr hohen Expressionslevel der Cre-Rekombinase voraussetzt. Wird dieser nicht erreicht, so kann es auch nicht zu einem ausreichenden HN-Protein Expressionslevel kommen und die Zellklone werden im Nachweistest als negativ erkannt.

Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde von der **japanischen Arbeitsgruppe um Yoshiyuki Nagai** (Li *et al.*, 2000) ein Helferzellsystem für die Vermehrung F-defizienter Sendai Viren vorgestellt, das auf zellulärer Transkomplementation des F-Proteins und Induktion der F-Protein Expression durch die Cre-Rekombinase basiert. Der Versuchsaufbau ähnelte dabei dem in dieser Arbeit verwendeten insofern, als das Expressionsplasmid das F-Gen hinter dem starken hCMV-Promotor beinhaltete und zwischen beide eine von zwei gleichsinnig orientierten loxP-Sequenzen flankierte Transkriptionsstopkassette

geschaltet war. Durch Zugabe eines Adeno Virus, das die Cre-Rekombinase exprimierte, konnte diese Transkriptionsstopkassette irreversibel ausgeschnitten werden. Durch die nun einsetzende Expression des F-Gens konnte auf diese Weise in LLCMK₂-Zellen ein F-Protein Expressionslevel von etwa 15 % des F-Protein-Levels in akut mit Sendai Virus infizierten Zellen erreicht werden. Diese Menge ist ganz offensichtlich ausreichend für die Herstellung infektiöser Sendai Viren (Li *et al.*, 2000).

Es besteht allerdings ein sehr entscheidender **Unterschied** zwischen der Herstellung HN-Protein exprimierender Helferzellen in dieser Arbeit und der Herstellung F-Protein exprimierender Helferzellen in der japanischen Arbeitsgruppe: Das F-Protein ist ohne Aktivierung durch Acetyltrypsin (siehe Kapitel 2.1.3.2; Ohuchi & Homma, 1976) nicht fusionsaktiv. Es besitzt also keine für die Herstellung einer infizierbaren Helferzelle hinderliche enzymatische Aktivität. Es muß in der Helferzelle lediglich zu einem ausreichend hohen F-Protein Expressionslevel exprimiert werden. Eine induzierbare Expression ist dabei aber dennoch sinnvoll, um die Helferzelle nicht einer übermäßigen Belastung durch einen andauernden und hohen F-Protein Expressionslevel auszusetzen. Dagegen ist die Schwierigkeit bei der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle ja gerade die Absenkung der enzymatischen Neuraminidaseaktivität zur Aufrechterhaltung der Infizierbarkeit, während in derselben Helferzelle aber auch ein für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichend hoher HN-Protein Expressionslevel erreicht werden muß.

Basierend auf dem gleichen Mechanismus war von dieser Arbeitsgruppe (Li *et al.*, 2000) auch eine stabil transfizierte Helferzelle geplant, die induzierbar das HN-Protein exprimiert und dieses so für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren zur Verfügung stellt. Dieses geplante Vorgehen wurde auf einem Kongress vorgestellt (11th International Conference on Negative Strand Viruses, June 24th – 29th, 2000, Québec City, Canada). Ein abschließendes Ergebnis dieser Arbeit wurde nie publiziert. Es ist anzunehmen, daß die Arbeitsgruppe um Yoshiyuki Nagai mit denselben Schwierigkeiten konfrontiert war, die auch im Rahmen dieser Arbeit aufgetreten waren (siehe Anmerkung am Ende der Diskussion).

Bezüglich der HN-Protein Expressionsstärke scheint es einen **markanten Unterschied** zwischen dem hCMV-Promotor ohne das Verstärkerelement Intron A und dem hCMV-Promotor mit Intron A zu geben. An dieser Stelle sei erwähnt, daß es offensichtlich der Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes des HN-Expressionslevel bedarf, ehe es zu einer Anlagerung von Erythrocyten an die Zellen und damit zu einem positiven Signal im HAD-Test kommen kann. Dieser Schwellenwert kann nur durch die Wirkung des Verstärker-

elements Intron A überschritten werden (siehe Kapitel 3.3.2; Boshart *et al.*, 1995). Dieses Schwellenwertverhalten wurde auch in unserer Tübinger Kooperationsgruppe um Uli Lauer beobachtet: Dort wurden HN-defiziente Sendai Viren durch Transkomplementation mit einem HN-Protein exprimierenden Adeno Virus vermehrt. Dabei war für eine nachweisbare Expression des HN-Proteins in den Zellen die Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes bei der Adeno-HN-Partikelmenge nötig. Dieser lag bei 150 Viruspartikel pro Zelle. Erst dann konnte mittels HAD-Test eine HN-Protein Expression in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Möglicherweise wird die Überschreitung dieses Schwellenwertes erst durch den Einsatz des Verstärkerelements Intron A im Promotor ermöglicht.

Der HAD-Test scheint also diesbezüglich ein eher unsensibler Nachweistest zu sein, denn es muß wohl für die Anlagerung von Erythrocyten eine bestimmte Menge an HN-Proteinen in der Zellmembran vorhanden sein. Trotzdem ist der HAD-Test bei der Herstellung von stabil transfizierten, HN-Protein exprimierenden Helferzellen für die Beurteilung der Höhe des HN-Protein Expressionslevels sehr hilfreich, denn offensichtlich zeigt der HAD-Test erst ein positives Signal bei Vorliegen der HN-Protein Menge, die zur Herstellung rekombinanter, infektiöser Nachkommenviren notwendig ist (Fischer, 1998). Betrachtet man die Größen- und Massenverhältnisse einer Zelle und eines Erythrocyten, dann ist ein solcher Schwellenwert durchaus plausibel, da wahrscheinlich eine bestimmte Mindestanzahl an HN-Protein Molekülen in der Zellmembran für die Adhäsion eines Erythrocyten notwendig ist. Das Bindungsepitop auf dem HN-Protein wurde zwar noch nicht identifiziert, aber wenn man von einer nicht sehr großen Zahl an schwachen nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen dem HN-Protein und dem Glykophorin-Molekül auf der Oberfläche eines Erythrocyten ausgeht, dann ist es gut vorstellbar, daß für eine Bindung und Immobilisierung eines Erythrocyten auf einer HN-Protein exprimierenden Zelle eine große Anzahl an HN-Proteinen nötig ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es **nicht möglich, mit Hilfe eines regulierbaren Expressionssystems** die beiden erforderlichen Eigenschaften für eine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle in einer Zelle zu vereinigen: Je nach eingesetztem Expressionssystem könnte die hergestellte Helferzelle entweder in ihrer Neuraminidaseaktivität sehr weit abgesenkt werden (GeneSwitch™-System), womit die Anforderung der Infizierbarkeit dieser Helferzellen erfüllt werden könnte (siehe Kapitel 3.3.1.1 und Abbildung 3.25) und war dabei aber nicht in der Lage, einen nachweisbaren HN-Protein Expressionslevel zu erreichen (siehe Kapitel 3.3.1.2); oder die Helferzelle konnte einen nachweisbaren und für die Herstellung infektiöser Sendai Viren wahrscheinlich ausreichenden HN-

Protein Expressionslevel erreichen, hatte allerdings eine so hohe HN-Protein Basisexpression, daß die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins zu einer Zerstörung der zellulären Rezeptoren für das Sendai Virus führte und damit eine Infizierbarkeit dieser Helferzelle nicht mehr gegeben war (TREx™-System; siehe Kapitel 3.3.2). Die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins ist damit zu stark für eine völlige Unterdrückung durch ein induzierbares Expressionssystem.

Der entscheidende **Durchbruch** bei der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle kam erst durch einen völlig anderen Ansatz, nämlich den Einsatz des **modifizierten HN^{41/6A}-Proteins**, das eine um 80 % reduzierte Neuraminidaseaktivität besitzt (siehe Kapitel 3.3.5; Lyn *et al.*, 1991). Zur weiteren Absenkung der Rest-Neuraminidaseaktivität von 20 % wurde ein Neuraminidaseinhibitor eingesetzt, der allerdings nicht nur extrazellulär, sondern auch im Golgi-Apparat und im Endoplasmatischen Retikulum präsent sein muß, um die Neuraminidaseaktivität des HN-Proteins von Beginn der Translation an, also bereits auf dem Syntheseweg der zellulären Glykoproteine vom Ribosom zur Zellmembran, zu inhibieren (vergleiche Kapitel 3.3.5.3).

Da die vom Hersteller (Calbiochem®) empfohlene Konjugation des Neuraminidaseinhibitors mit einem lipophilen Protein zur Erhöhung der Membrangängigkeit eine sehr umfangreiche und zeit- und arbeitsintensive Vorgehensweise wäre und zudem keineswegs gesichert ist, daß der so modifizierte Neuraminidaseinhibitor seine Funktion als Inhibitor noch erfüllen kann, wurde eine andere, wesentlich einfachere Modifikationsmöglichkeit in Betracht gezogen: Eine Komplexierung der Substanz mit dem Lipofektionsreagenz LipofectACE.

Bei einer „Transfektion“ des Komplexes aus **2-Deoxy-2,3-Dehydro-N-Acteylneuraminsäure** und dem LipofectACE-Reagenz wird dieser wohl in erster Linie in die Cytoplasmamembran eingelagert. Die zellulären Membransysteme besitzen allerdings einen höchst flüssigen Aggregatzustand, so daß eingelagerte Phospholipide eine sehr hohe laterale Beweglichkeit besitzen (Stryer, 1998; Lodish *et al.*, 1995). Der in die Membran eingelagerte Komplex aus 2-Deoxy-2,3-Dehydro-N-Acteylneuraminsäure und dem LipofectACE-Reagenz sollte daher bei ausreichender Konzentration auch in die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums diffundieren und von dort aus durch die ständigen Abknospungsprozesse auch die Membranen des Golgi-Systems erreichen können (Stryer, 1998; Lodish *et al.*, 1995). Außerdem können durch endocytotische Abknospungsprozesse von der Zellmembran zum Endoplasmatischen Retikulum und zum Golgi-System ebenfalls Membranteile mitsamt der einge-

lagerten Neuraminidaseinhibitor-LipofectACE-Komplexe zu diesen Organellen übertragen werden (Lodish *et al.*, 1995).

Um auf diese Weise eine effektive und dauerhafte **Absenkung der Neuraminidaseaktivität des HN^{41/6A}-Proteins** gewährleisten zu können, mußte der Komplex aus Neuraminidaseinhibitor und LipofectACE-Reagenz dauerhaft im Zellmedium vorhanden sein und regelmäßig erneuert werden. Im Rahmen der Standardkultivierung der Helferzellen erfolgte dabei ein Mediumwechsel alle 24 Stunden. Vor einer geplanten Infektion dieser Helferzellen wurde der Mediumwechsel in kürzeren Intervallen durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.5.2). Eine dauerhaft abgesenkte Neuraminidaseaktivität würde allerdings auch dazu führen, daß die Freisetzung der Sendai Viren von der Zelle nach dem Replikationszyklus nicht mehr gewährleistet ist. Die Halbwertszeit des Neuraminidaseinhibitors beträgt bei 37°C laut fernmündlicher Auskunft der Herstellerfirma (Calbiochem®) drei bis vier Stunden. Um eine Freisetzung der Sendai Viren nach der Infektion der Helferzellen zu ermöglichen, wurde nach der Infektion der Zellen durch die zu vermehrenden HN-defizienten Sendai Viren die Zugabe des komplexierten Neuraminidaseinhibitors zum Zellmedium unterlassen (siehe Kapitel 3.3.5.2).

Es konnten **fünf Zellklone** hergestellt werden, die stabil mit dem Expressionskonstrukt für das **HN^{41/6A}-Protein (Plasmid pcDI18-HN^{41/6A})** transfiziert worden waren. Diese Zellklone zeigten nach der Monoklonalisierungsprozedur ein positives Signal im HAD-Test und erfüllten damit eine Anforderung an eine stabil HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle: Sie besitzen einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel. Um den zweiten erforderlichen Parameter, nämlich ihre Infizierbarkeit überprüfen zu können, wurde ein **Infektionstest mit einem Sendai Virus** durchgeführt. Mit diesem Infektionstest konnte die Infizierbarkeit dieser Zellklone gezeigt werden.

Mit den Zellklonen CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** konnten **hier zum ersten mal Helferzellen etabliert werden, die durch das Sendai Virus infizierbar sind, obwohl sie das HN-Protein des Sendai Virus in einer für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden Menge exprimieren**. Die Höhe des Expressionslevels des dafür eingesetzten HN^{41/6A}-Proteins bei dieser konstitutiven Expression scheint dabei im Gegensatz zu dem bei den stabil mit dem HN-Protein transfizierten Zellen (siehe Kapitel 3.2.5, Kapitel 3.3.2.2, Abbildung 3.21 und Abbildung 3.30) so stabil zu sein, daß eine Abnahme des HN-Protein Expressionslevels über die Zeit und mehrere Zellpassagen nicht stattfindet. Möglicherweise hat die durch die Mutation abgesenkte Neuraminida-

seaktivität keinen negativen Einfluß auf die intrazellulären Protein Zielsteuerungsmechanismen, so daß hier kein negativer Selektionsdruck besteht und somit der HN^{41/6A}-Protein Expressionslevel auch längerfristig über mehrere Zellpassagen stabil hoch bleiben kann. Auch einige Zellpassagen nach der Selektion stabiler Transfektanten und dem Abschluß der Monoklonalisierungsprozedur war hier mittels HAD-Test noch eine durchgehende Erythrocytenbindung auf allen Zellen zu beobachten.

Bei einem Einsatz dieser etablierten HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzellen für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren zeigte sich allerdings, daß diese Helferzellen nicht in der Lage sind, den Replikationszyklus HN-defizienter Sendai Viren durch Transkomplementation des HN-Proteins zu unterstützen. Ganz offensichtlich muß eine HN-Protein exprimierende und trotzdem infizierbare Helferzelle zusätzlich zu einem für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel und einer für die Aufrechterhaltung der Infizierbarkeit genügend abgesenkten Neuraminidaseaktivität noch weitere Eigenschaften besitzen, um die Transkomplementation des HN-Proteins für HN-defiziente Sendai Viren zu ermöglichen. Diese Eigenschaften könnten beispielsweise bei Wechselwirkungen des HN-Proteins mit anderen Sendai Virus Proteinen zu suchen sein: Für das Newcastle Disease Virus, einem nahen Verwandten des Sendai Virus (siehe Kapitel 2.1), konnte gezeigt werden, daß es einen engen Zusammenhang gibt zwischen den korrekten räumlichen Strukturen und dem Oligomerisierungsgrad des HN- und des F-Proteins (McGinnes *et al.*, 2002). Möglicherweise kann ein HN-Protein, das in Bezug auf seine Rezeptorbindefunktion funktionell ist, nur bei gleichzeitiger Expression von HN- und F-Protein entstehen, so daß eine Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen bereits während der Proteinfaltung auf dem Syntheseweg und bei der Prozessierung geschehen und so eine korrekte Faltung des HN-Proteins bewirken kann. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß das HN- und das F-Protein simultan neusynthetisiert werden muß, um die korrekte Funktion für die Oligomerisierung und Interaktion ausüben zu können. Bei Susanne Fischer (Fischer, 1998) wurden die drei Hüllproteine des Sendai Virus, HN-, F-, und M-Protein, in den Zellen auch simultan exprimiert.

In unserer Tübinger Kooperationsgruppe um Uli Lauer (persönliche Kommunikation) wurde eine Methode zur Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren entwickelt, die auf der Transkomplementation des HN-Proteins durch ein Adeno-HN-Virus beruht. Dabei werden die Helferzellen bei jeder Viruspassage mit einem Adeno-HN-Virus infiziert, so daß das HN-Protein in diesen Zellen exprimiert und für den Replikationszyklus der HN-defizienten Sendai

Viren zur Verfügung gestellt wird. Mit diesem Vorgehen können durch mehrere aufeinanderfolgende Viruspassagen HN-defiziente Sendai Viren zu Titern von bis zu 10^7 Viruspartikeln pro Milliliter angereichert werden. Möglicherweise kann bei dieser Vorgehensweise aufgrund der engen zeitlichen Verhältnisse eine Transkomplementation des HN-Proteins erfolgen: Das HN-Protein wird durch das Adeno Virus zeitgleich mit dem F- und M-Protein des Sendai Virus exprimiert. Die HN-Protein Expression durch das Adeno Virus ist transient, es handelt sich also nicht um eine Expression nach stabiler Transfektion. Dadurch kann die Expression des HN-Proteins möglicherweise im gleichen Rhythmus erfolgen wie die Expression des F- und des M-Proteins des Sendai Virus.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Zellklone CHO-HN^{41/6A}-**K5**, CHO-HN^{41/6A}-**K18**, CHO-HN^{41/6A}-**K28** und CHO-HN^{41/6A}-**K32** (siehe Kapitel 3.3.5) besitzen einen für die Herstellung infektiöser Sendai Viren ausreichenden HN-Protein Expressionslevel und sind trotzdem durch das Sendai Virus infizierbar. **Damit wurden hier erstmals Helferzellen beschrieben, die diese beiden Eigenschaften in sich vereinen.** Eine Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren konnte mit Hilfe dieser Helferzellen nicht durchgeführt werden.

Diese Zelllinien werden als Basis dienen für die Etablierung eines zellulären Hilfsystems für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren. Möglicherweise müssen diese Zelllinien so weiterentwickelt werden, daß sie zugleich das M- und das F-Protein induzierbar exprimieren, um eine korrekte Interaktion der viralen Hüllproteine zu gewährleisten (siehe oben).

Ein leberzellspezifischer Nukleinsäuretransfer, der auf rekombinanten, HN-defizienten Sendai Viren basiert, stellt sowohl wissenschaftlich, als auch kommerziell ein sehr attraktives Ziel dar. Daher wäre die Etablierung eines Systems zur Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren sehr wünschenswert.

Anmerkung:

Der Einsatz HN-defizienter Sendai Viren als Gentransfervektoren für den Einsatz in der leberzellspezifischen Gentherapie stellt sowohl wissenschaftlich, als auch kommerziell ein sehr attraktives Ziel dar. Die japanische Arbeitsgruppe um Yoshiyuki Nagai der Firma DNAVEC Research Inc., Kannondai, Japan, hatten auch das Ziel der Herstellung einer HN-Protein exprimierenden und trotzdem infizierbaren Helferzelle für die Vermehrung HN-defizienter Sendai Viren. Dieses Vorhaben wurde auf einem Kongress in Quebec im Juni 2000 vorgestellt (11th International Conference on Negative Strand Viruses, June 24th – 29th, 2000, Québec City, Canada; siehe Diskussion, Kapitel 4). Ein abschließendes Ergebnis wurde niemals publiziert. Auch auf einem Kongress im Juni 2003 in Italien (12th International Conference on Negative Strand Viruses, June 14th – 19th, 2003, Pisa, Italy) konnte uns von dieser Arbeitsgruppe auf Anfrage noch immer kein positives Resultat dieser Arbeiten mitgeteilt werden. Möglicherweise wurde die Arbeitsgruppe um Yoshiyuki Nagai mit denselben Problemen und Schwierigkeiten konfrontiert, die auch im Rahmen dieser Arbeit beschrieben wurden.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde - soweit nicht explizit anderweitig erläutert - standardmäßig folgender Ansatz verwendet: 1 ng Template-DNA; 5 µl dNTPs (10 mM) (MBI-Fermentas); 5 µl 10x-Puffer; je 2,5 µl Primer (20 pmol/ µl); 0,5 µl Taq-Polymerase; Wasser *ad* 50 µl.

Bei größeren, etwa präparativen Ansätzen, wurden die Mengen entsprechend erhöht. Die Ansätze wurden je nach PCR-Maschine mit Mineralöl überschichtet. Die Primer wurden stets bei der Firma MWG (Grafing bei München) erworben. Es wurde standardmäßig die Taq-Polymerase von MBI-Fermentas nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.1.2 Hybridisierung von komplementären Einzelstrang-DNA-Oligonukleotiden zu Doppelstrang-DNA-Fragmenten

Für die Herstellung von kurzen doppelsträngigen DNA-Stücken wurden komplementäre einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (Oligos) zu doppelsträngigen DNA-Molekülen hybridisiert. Die Oligos wurden bei der Firma MWG Biotech kommerziell erworben (5'-Phosphat-Modifikation).

Zur Hybridisierung wurden äquimolare Mengen der beiden komplementären Oligonukleotide (300-500 pmol) zu einer Konzentration von 100-300 ng/ µl in 10 mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen. Der Ansatz wurde in einem Heizblock mit Aluminiumdeckel (alternativ Ölüberschichtung der Ansätze) je nach Sekundärstrukturneigung 10-20 min auf 96°C aufgeheizt.

Parallel dazu wurden entsprechende Ansätze einer NaCl-Lösung in demselben Heizblock erhitzt. Nach Ablauf dieser Denaturierungszeit wurde NaCl zu einer Konzentration von 100-250 mM zu dem Hybridisierungsansatz gegeben, der daraufhin in einem auf 62°C temperierten Brutschrank für 30 min inkubiert wurde. Nach Ablauf der Hybridisierungszeit wurde der Brutschrank abgeschaltet, so daß der Hybridisierungsansatz im geschlossenen Brut-

schränk langsam abkühlen konnte. Nach einer kurzen Lagerung auf Eis war das hybridisierte Doppelstrang-DNA-Stück bereit für die Verwendung.

Sollten die Oligonukleotide ohne 5'-Phosphatgruppe vorgelegen haben (was normalerweise bei Lieferung durch Firmen wie MWG der Fall ist), konnten diese 5'-Phosphatgruppen nachträglich durch die T4-Polynukleotid-Kinase angefügt werden (Vorgehen nach Standardprotokoll des Herstellers). Der Phosphatidylgruppendonor bei dieser Reaktion war ATP (Lithiumsalz), von dem 1 nmol in dem 50 µl-Ansatz eingesetzt wurde.

5.1.3 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei der Firma Medigenomix, Martinsried, in Auftrag gegeben.

5.1.4 Aufreinigung von DNA, Gelextraktion, Restriktionsverdau, Ligation und Klonierung

Die Aufreinigung von DNA aus Restriktions- oder PCR-Ansätzen wurde mit dem Qiaquick PCR *Purification Kit*, die Extraktion von DNA aus Agarosegelen mit dem Qiaquick *Gel Extraction Kit* durchgeführt. Das Ausschneiden der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde auf einem UV-Leuchttisch durchgeführt. Die Benutzung der Kits erfolgte stets nach Angaben des Herstellers (siehe Kapitel 5.1.7).

Alle Restriktionsenzyme wurden, soweit nicht explizit anders angegeben, bei der Firma Amersham Biosciences kommerziell erworben. Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase von MBI Fermentas oder der Rapid Ligation Kit von Roche (siehe Kapitel 5.1.7) verwendet. Bei Ligation von DNA-Fragmenten mit *blunt-ends* wurde dem Ligationsansatz 10 % Polyethylenglycol 4000 zugefügt, um die Ausbeute an positiven Klonen zu erhöhen. Um bei *blunt-end*-Ligationen eine Rezirkulation des Plasmids zu verhindern, wurde dieses vor der Ligation mit Alkalischer Phosphatase (SAP – *shrimp alkaline phosphatase*) behandelt, um die 5'-Phosphatgruppe zu entfernen (Amersham Biosciences).

Um eine *blunt-end*-Ligation von unterschiedlichen *sticky-ends* zu ermöglichen, wurden diese entweder mit Klenow-Polymerase behandelt (3'-Überhänge - Auffüllreaktion) oder mit Mungo-Bohnen-Nuklease entfernt. Die Verwendung dieser Enzyme erfolgte stets nach Angabe des Herstellers (siehe Kapitel 5.1.7).

5.1.5 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (*E. coli* XL-1)

Mit einem Einzelklon der letzten Charge kompetenter Zellen oder mit anderen Stämmen von *E. coli* wurde abends eine Vorkultur (ÜN) angesetzt, die am Morgen zu einer 100x-Verdünnung in eine Tagkultur überführt wurde. Diese Tagkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 auf einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert, dann abzentrifugiert (2000-3000 rpm, 4°C) und das Pellet sofort auf Eis gekühlt. Dieses Pellet wurde in TSB-Puffer (siehe Kapitel 5.13) aufgenommen (3 ml TSB je 100 ml Kultur).

Zusätzlich zu den selbst hergestellten kompetenten Zellen wurden für kritische Anwendungen, wie beispielsweise Ligationen mit *blunt-end*-Schnittstellen an beiden Enden, chemisch kompetente *E. coli*-Zellen der Firma Stratagene[®] verwendet (SoloPack[®] Gold Competent Cells).

5.1.6 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen, Picken von Klonen, Animpfen von Mini-Kulturen und Überführung in Maxi-Kulturen

Für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA wurden diese vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit einer entsprechenden Menge an vorgekühlter Plasmid-DNA (1 ng) oder einem Ligationsansatz vereinigt und 20-30 min auf Eis gekühlt. Nach einem Hitzeschock (42°C, 60 s), einer Inkubation auf Eis (2 min) und Zugabe von 100 µl LB-Medium (siehe Kapitel 5.13) wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C auf einem Drehrad oder unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann konnte der Ansatz auf vorgewärmte LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert werden. Nach einer ÜN-Inkubation bei 37°C konnten am nächsten Tag die Zellklone zum Animpfen von Minikulturen und weiteren Analyse mit einer kleinen Pipettenspitze gepickt werden. Die Minikultur (5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum) wurde in einem Schüttelinkubator bei 200-220 rpm inkubiert (ÜN, 37°C). Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Minikulturen erfolgte mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben (siehe Kapitel 5.1.7). Vom Rest der Minikultur konnte ein Aliquot (100-500 µl) in eine 200 ml-LB-Kultur (mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum) überführt werden. Diese wurde in einem Schüttelinkubator inkubiert (200-220 rpm, 37°C, ÜN). Am nächsten Tag konnte von dieser Kultur die Plasmid-DNA isoliert werden. Dazu wurde der QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit (Quiagen) verwendet (siehe Kapitel 5.1.7).

5.1.7 Liste der verwendeten Kits zur DNA-Bearbeitung

Kit	Katalog-Nr.	Hersteller
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	Cat. No. 12162	QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, Deutschland
QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit	Cat. No. 12143	QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, Deutschland
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Cat. No. 28104	QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, Deutschland
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Cat. No. 28704	QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, Deutschland
QIAquick [®] Nucleotide Removal Kit	Cat. No. 28304	QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, Deutschland
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Cat. No. 27104	QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, Deutschland
Ready-To-Go [™] T4 DNA Ligase	27-0361-01 Lot: 2080361012	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Munzinger Str. 9, D-79111 Freiburg
Roche Rapid Ligation Kit	1635379	Roche Diagnostics GmbH, Sandhoferstr. 116, D-68305 Mannheim, Germany

5.1.8 Liste der verwendeten Nukleinsäuren und Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle	Resistenzgen für Eukaryonten	Verweis
pcD118	Susanne Fischer	G418	Fischer, 1998
pcD118-eGFP	Eigene Herstellung	G418	3.2.1.3.5
pcD118-HN	Susanne Fischer	G418	Fischer, 1998
pcD118-HN ^{41/6A}	eigene Herstellung	G418	3.2.1.4
pcD118-loxP-Stop-loxP-eGFP	eigene Herstellung	G418	3.2.1.3.4
pcD118-loxP-Stop-loxP-HN	eigene Herstellung	G418	3.2.1.3.3
pcDNA5/TO	Invitrogen	Hygromycin B	Invitrogen
pcDNA5/TO-Cre	eigene Herstellung	Hygromycin B	3.2.1.3.7
pcDNA5/TO-eGFP	eigene Herstellung	Hygromycin B	Martin Auer
pcDNA5/TO-HN	eigene Herstellung	Hygromycin B	3.2.1.2
pcDNA5/TO-HN-1xP	eigene Herstellung	Hygromycin B	3.2.1.2.2
pcDNA5/TO-HN-2xP	eigene Herstellung	Hygromycin B	3.2.1.2.2
pcDNA6/TR	Invitrogen	Blasticidin	Invitrogen
pDP	eigene Herstellung	nur Prokaryonten (Ampicillin)	3.2.1.3.1
pDP-PF49-3	eigene Herstellung		3.2.1.3
pDP-PF49-2xPA	eigene Herstellung		3.2.1.3
pDP-PF49-4xPA	eigene Herstellung		3.2.1.3
PF49	MPI für Biophysikalische Chemie, Abt. f. mol. Zellbiologie, Göttingen Luc St. Onge, P. Furth	?	
pGene/V5-His-A	Invitrogen	Zeocin	Invitrogen
pGene/V5-His-A-Cre	eigene Herstellung	Zeocin	3.2.1.3.6
pGene/V5-His-A-eGFP	eigene Herstellung	Zeocin	Martin Auer
pGene/V5-His-A-HN	eigene Herstellung	Zeocin	3.2.1.1
pGene/V5-His-A-HN ^{41/6A}		Zeocin	3.2.1.4
pGene/V5-His-A-lacZ	Invitrogen	Zeocin	Invitrogen
pGene/V5-His-B	Invitrogen	Zeocin	Invitrogen
pGene/V5-His-B-HN	eigene Herstellung	Zeocin	3.2.1.1
pGene/V5-His-C	Invitrogen	Zeocin	Invitrogen
pGene/V5-His-C-HN	eigene Herstellung	Zeocin	3.2.1.1
pKS-Cre	Martin Hrabě de Angelis, GSF, Neuherberg	?	
pTM1	AG Neubert		Moss <i>et al.</i> , 1990

Plasmid	Bezugsquelle	Resistenzgen für Eukaryonten	Verweis
pTM-HN	AG Neubert		AG Neubert
pTM-L	AG Neubert		AG Neubert
pTM-N	AG Neubert		AG Neubert
pTM-P	AG Neubert		AG Neubert

5.2 Expressionssysteme für die Expression von Transgenen in Säugerzellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Expressionssysteme für die induzierbare Expression von Transgenen in Säugerzellen zum Einsatz. Die Vorgehensweisen bei der Arbeit mit diesen Expressionssystemen sollen im Folgenden erläutert werden.

5.2.1 Das GeneSwitch™-System

Zur Durchführung einer auf dem GeneSwitch™-System beruhenden induzierbaren Expression in Säugerzellen wurden die Zellen mit den beiden Plasmiden pSwitch und pGene/V5-His transfiziert. Dabei wurden für eine Six-Well-Zellkulturplatte, auf denen die Zellen am Vortag zu einer Konfluenz von etwa 15-20 % ausgelegt wurden, jeweils 2 µg DNA eingesetzt. Bei Verwendung der CHO-GeneSwitch™-Zellen, die bereits stabil mit dem Plasmid pSwitch transfiziert sind, wurde die Transfektion nur mit dem eigentlichen Expressionsplasmid pGene/V5-His durchgeführt.

Die Induktion erfolgte standardmäßig durch Zugabe von Mifepristone zu einer Konzentration von 10^{-8} M zum normalen Kulturmedium. Der maximale Expressionslevel sollte nach spätestens 24 h erreicht sein.

Für die Herstellung stabiler Zellen konnte unmittelbar nach Abschluß der Transfektion mit der Selektion begonnen werden (siehe Kapitel 3.2.3).

5.2.2 Das TReX™-System

Zur Durchführung einer auf dem TReX™-System basierenden induzierbaren Expression in Säugerzellen wurden die Zellen mit den beiden Plasmiden pcDNA6/TR und pcDNA5/TO transfiziert. Die Zellen wurden in einer Six-Well-Zellkulturplatte am Vortag zu einer Konfluenz von etwa 15-20 % ausgelegt und mit jeweils 2 µg DNA transfiziert. Auch hier wurde bei Verwendung der CHO-TReX™-Zellen, die bereits stabil mit dem Plasmid pcDNA6/TR transfiziert sind, für die Transfektion nur das eigentliche Expressionsplasmid pcDNA5/TO eingesetzt.

Die Induktion der Genexpression erfolgt gemäß Angaben des Herstellers standardmäßig mit 2 ng/ μ l Tetrazyklin. Nach einer Induktionszeit von 24 h sollte der maximale Expressionslevel erreicht sein.

Für die Herstellung stabil transfizierter Zellen konnte unmittelbar nach Abschluß der Transfektion (siehe Kapitel 3.2.3) mit der Selektion nach stabilen Transfektanten begonnen werden.

5.2.3 Induzierbare Expression von Transgenen in Säugierzellen mit Hilfe des Cre/loxP-Systems

5.2.3.1 Das Cre-loxP-System

Die Absenkung der Expression im uninduzierten Zustand erfolgt beim Cre/loxP-System durch eine von zwei loxP-Sequenzen flankierte Transkriptionsstopkassette, die zwischen dem Promotor und dem Transgen liegt. Zur Induktion der Expression wird diese Transkriptionsstopkassette durch die Cre-Rekombinase, die die beiden loxP-Sequenzen erkennt, ausgeschnitten. Hierfür stand ein Adeno-Cre-Virus zur Verfügung, das nach Infektion der Zellen die Cre-Rekombinase exprimiert. Außerdem wurde das Gen für die Cre-Rekombinase in mehreren induzierbaren Expressionsplasmiden (GeneSwitchTM-, TRExTM-System) eingesetzt.

Die Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das die Transkriptionsstopkassette trägt, transfiziert. Bei Einsatz des Adeno-Cre-Virus erfolgte die Induktion der Expression durch Infektion mit dem Adeno-Cre-Virus. Alternativ dazu konnte eine Doppeltransfektion mit dem Expressionsplasmid, das die Transkriptionsstopkassette trägt, und dem induzierbaren Expressionsplasmid für die Cre-Rekombinase durchgeführt werden. In diesem Fall erfolgte die Induktion der Expression durch Induktion der Cre-Rekombinase, die wiederum die Transkriptionsstopkassette ausschneidet und so die Expression des eigentlichen Transgens induziert.

5.2.3.2 Das Adeno-Cre Virus

Das Adeno-Cre Virus wurde uns von Herrn Dr. Matt Cotten von der Firma Axxima in Martinsried zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein Adeno Virus Typ 5. Es ist defizient für die Regionen E1 und E3 und daher replikationsdefizient. Anstelle der E1-Region ist die Cre-Rekombinase mit Kernlokalisationsignal eingefügt. Dieses Virus kann auf 293-Zellen vermehrt werden. Es verwendet den CAR (*cocksackie-adenovirus*)-Rezeptor der auf der Oberflä-

che von CHO-Zellen nicht sehr hoch exprimiert ist. Daher eignen sich diese Zellen nicht für Versuche mit Adenoviren. Die Arbeiten mit diesem Adeno-Cre Virus wurden unter S2-Bedingungen ausgeführt.

Die zu infizierenden Zellen sollten bei Infektion zu etwa 70-80 % konfluent sein. Zur Infektion wurde das Adeno Virus mit einer MOI von etwa 100-500 auf die Zellen gegeben. Diese erfolgte in Medium mit reduziertem Serumanteil (2 % FKS) in einem möglichst geringen Volumen (beispielsweise 1 ml pro Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte). Das Medium konnte nach 4 h gewechselt werden. Die Expression der Cre-Rekombinase beginnt nach 4-6 h p.I., steigt aber zum maximalen Wert an nach 24-48 h. Die hier verwendete Virussuspension besaß einen Titer von $0,2-0,8 \times 10^9$ Viruspartikeln/ μl (Michou *et al.*, 1999; Glotzer *et al.*, 2000).

5.3 Zellkulturmethoden

5.3.1 Allgemeine Zellkultur

Die Kultivierung von adhärennten Säugerzellen erfolgte in speziell beschichteten Kunststoffflaschen (Roux-Flaschen) in entsprechendem Zellmedium. Das Medium wurde mit fötalem Kälberserum (FKS) und den entsprechenden Antibiotika supplementiert. Die Zellen wurden in einem speziellen Brutschrank in einer 5 %-igen CO_2 -Atmosphäre und bei 90 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Bei Konfluenz wurde der Zellrasen zur Passagierung mit PBS gewaschen, mit Trypsin/ EDTA (0,5 % Trypsin, 0,2 % EDTA in DMEM) überschichtet und je nach Zelltyp für etwa 5-10 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden je nach Bedarf in einer entsprechenden Verdünnung wieder ausgesät.

5.3.2 Verwendete Zelllinien

Für die initiale Herstellung von Sendai Viren und für einige Transfektionsversuche wurden **HeLa**-Zellen (Medium: DMEM) verwendet. Es handelt sich hierbei um humane zervikale Karzinomzellen (ATCC-Nummer: CCL-2).

Zur standardmäßigen Passagierung von in Zellkultur hergestellten HN-haltigen Sendai Viren kamen **Vero**-Zellen (Medium: DMEM) zum Einsatz. Es sind Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*; ATCC-Nummer: CCL-81).

Die von Invitrogen angebotenen **CHO-GeneSwitch™**-Zellen (Medium: Häm's F12) sind stabil mit dem pSwitch-Regulatorplasmid transfizierte Zellen. Es sind Ovarienzellen des

chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*), die von der Zelllinie CHO-K1 (ATCC-Nummer: CCL-61) abgeleitet wurden (Invitrogen, Katalog-Nummer: R772-07). Diese Zellen wurden standardmäßig unter 100 µg/ml Hygromycin B gehalten, um die Erhaltung des Transgens (des stabil transfizierten Regulatorplasmids) zu gewährleisten.

Außerdem fanden **CHO-TRExTM**-Zellen (Medium: Häm's F12) Verwendung. Diese Zellen sind stabil transfiziert mit dem Regulatorplasmid pcDNA6/TO[®], das für das Tetrazyklin-Repressorprotein kodiert. Diese Zellen basieren ebenfalls auf der Zelllinie CHO-K1 (siehe oben) (Invitrogen, Katalog-Nummer: R718-07). Diese Zellen wurden standardmäßig unter 10 µg/ml Blastocidin S HCl gehalten, um die Erhaltung des Transgens (des stabil transfizierten Regulatorplasmids) zu gewährleisten.

5.3.3 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl in einer Suspension erfolgte durch Anfärben der Zellen und anschließendes Auszählen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dabei wurden 50 µl einer vollständig homogenisierten Zellsuspension mit 50 µl einer Trypanblau-Lösung (0,5%ig in physiologischer Kochsalzlösung) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min bei RT wurde die Zellsuspension langsam und vorsichtig unter das Deckglas der Neubauer-Zählkammer pipettiert. Dann wurden jeweils die 16 Quadrate eines Sektors ausgezählt. Der Mittelwert der Anzahl der Zellen aus den vier Sektoren wurde mit 2 (Verdünnung) und mit 10^4 multipliziert (Formel: Mittelwert $\times 2 \times 10^4$). Der Wert gibt die Zellzahl in 1 ml an.

5.3.4 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum zu konservieren, wurden diese in flüssigem Stickstoff bei -196°C tiefgefroren. Dazu wurden die Zellen wie gewohnt trypsiniert. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 5 min) wurden etwa 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO und 15 % FKS in normalem Zellmedium) aufgenommen und in ein Kryogefäß (Nunc) überführt. Die stufenweise Abkühlung auf -120°C erfolgte in einer Einfriermaschine (Cryosan; siehe Kapitel 5.8). Daraufhin wurden die Zellen direkt in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße mit den Zellen in einem 37°C -Wasserbad möglichst rasch erwärmt und dann in entsprechendes Medium mit 10 % FKS überführt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 5 min) wurde das Zellpellet in zellspezifischem Medium (mit 10 % FKS) aufgenommen und in eine Zellkulturflasche ausgesät. Wurden die Zellen standardmäßig unter einem Selektionsantibiotikum gehalten, so

wurde dieses in der adäquaten Konzentration am zweiten Tag nach dem Auftauen zum Medium gegeben.

5.3.5 Transfektionsmethoden

5.3.5.1 Lipofektion

In dieser Arbeit kamen je nach Zelltyp und Anwendung die beiden Transfektionsreagenzien LipofectACE und LipofectAMINE PLUS zum Einsatz. Die Transfektion von CHO-Zellen erfolgte mit dem LipofectAMINE PLUS-Reagenz gemäß den Angaben des Herstellers.

Das LipofectACE-Reagenz (Taylor *et al.*, 1996) besteht aus 10 mg DOPE (L- α -Phosphatidylethanolamin-Dioleoyl) und 4,2 mg DDAB (Dimethyldioctadecylammonium Bromid) in 1 ml Ethanol (=20 x Stammlösung). Die 1 x - Gebrauchslösung besteht aus der entsprechenden Verdünnung in Wasser.

5.3.5.2 Calciumphosphatpräzipitation

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag zu einer Konfluenz von 60-80 % ausgelegt. 30 min vor der Transfektion wurde 10 μ l Chloroquin (2 mM) pro ml Medium zu den Zellen gegeben. Für die Transfektion wurde 1-2 μ g DNA in einem 1,5 ml-ERG auf 112,5 μ l mit sterilem H₂O aufgefüllt, dann 12,5 μ l 2,5 M CaCl₂ zugegeben und vorsichtig gemischt. 125 μ l 2x HBS wurden zupipettiert. Dieser Ansatz wurde für 8-10 min bei RT inkubiert, bevor er mit normalem Zellmedium (ohne FKS) auf 750 μ l aufgefüllt und auf die Zellen gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 3-6 h wurde das Medium auf den Zellen mit normalem Zellmedium (mit 10 % FKS) auf 1,5 ml aufgefüllt. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel gegen das normale Zellmedium.

5.4 Proteinchemische Methoden

5.4.1 Herstellung von Zellextrakten (Gesamtprotein)

Die Zellen in einem Zellkulturgefäß mit der geeigneten Größe (idealerweise eine T25-Zellkulturflasche oder die Vertiefung einer Six-Well-Zellkulturplatte) wurden einmal mit PBS gewaschen und dann mit einem Zellschaber in PBS abgeschabt. Diese Suspension wurde in ein 10 ml-Röhrchen überführt, das bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert wurde. Zu dem so gewonnenen Pellet wurde 1 ml RIPA gegeben. Diese Menge wurde möglichst zügig in ein

1,5 ml ERG überführt und für 1 min einer Ultraschallbehandlung im Wasserbad ausgesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10-20 min, 14.000 rpm) konnte die Lösung bei -20°C eingefroren und gelagert werden. Alle Arbeitsschritte wurden in Plastikmaterial vorgenommen.

5.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Herstellung der Zellextrakte erfolgte wie unter Punkt 5.4.1 beschrieben. Von diesem Zellysate wurden 10 µl mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl Lösung A (siehe Kapitel 5.13) wurde sofort kräftig gemischt und dann 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung B (siehe Kapitel 5.13), kräftigem Mischen und einer Inkubationszeit (30 min, RT) erfolgte eine photometrische OD-Bestimmung bei einer Wellenlänge von 540, 660 oder 750 nm in Plastikkuvetten. Bei einer Reihe genau eingewogener Proteinstandards (BSA) (beispielsweise Konzentrationen von 50 ng/ µl bis 2000 ng/ µl) wurde die OD in genau demselben Ansatz gemessen. Die OD-Werte der Proteinstandards wurden auf Millimeterpapier in einem Diagramm gegen die Konzentration aufgetragen. Aus dieser Darstellung kann die Konzentration der Proben zeichnerisch aus der Geraden ermittelt werden (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1983).

5.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach Denaturierung und Bindung an SDS nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden diskontinuierliche Gele mit einem 5 %-igen Sammelgel und einem 10 %-igen Trenngel verwendet. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen an Proteinprobenpuffer, dem frisch β-Mercaptoethanol zu einer Konzentration von 10 % zugegeben wurde, versetzt. Diese Proben wurden für 4 min auf 94° C aufgeheizt. Die so denaturierten Proteinproben wurden auf das Gel aufgetragen und bei 15 mA über Nacht aufgetrennt.

5.4.4 Westernblot – Transfer der Proteine auf eine Membran

Beim Western Blot werden die bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinfractionen entlang eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wird in einer Blotapparatur das Gel und die Membran so positioniert, daß ein Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran entlang eines senkrecht zur Gel- und Membranebene angelegten elektrischen Feldes stattfinden kann (siehe Abbildung 5.1). Der Blot erfolgte für 6 h bei 400mA.

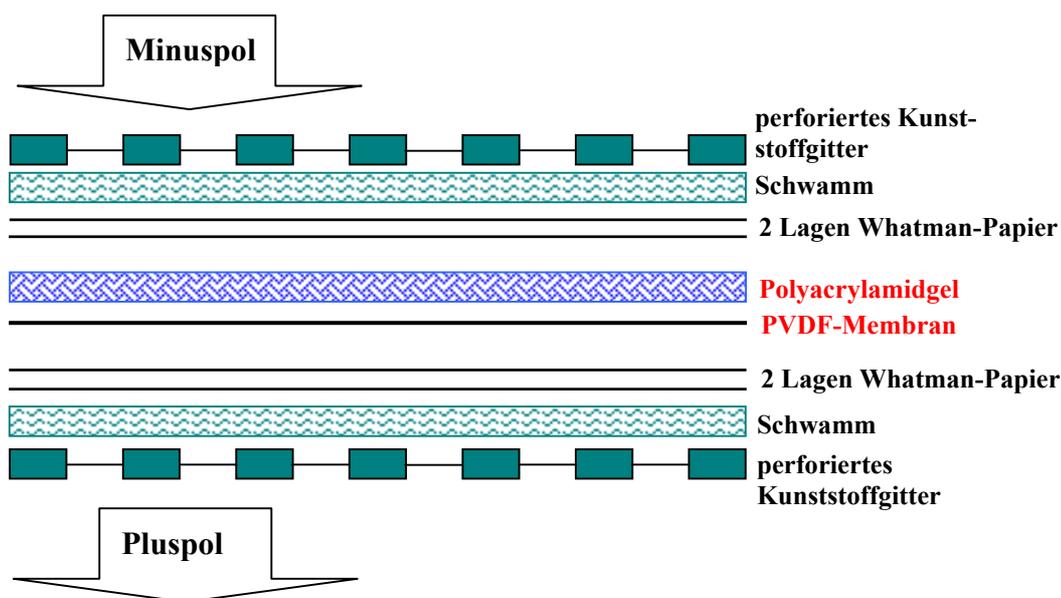


Abbildung 5.1: Aufbau der Schichtung beim Transfer von Proteinen von einem SDS-Gel auf eine Membran

5.4.5 Immunologischer Nachweis der Proteine auf der Membran

Um freie Bindungsstellen auf der PVDF-Membran abzusättigen, wurde diese für 1 h unter leichtem Schwenken bei RT in einem geeigneten Gefäß in Rotiblocklösung inkubiert. Daraufhin wurde der erste Antikörper ebenfalls in Rotiblocklösung für 1 h unter leichtem Schwenken in das Gefäß mit der Membran gegeben. Zur Entfernung des Antikörpers wurde die Membran 5 x mit TBST-Puffer (siehe Kapitel 5.13) gewaschen, und zwar 1 x 1 min, 2 x 10 min und 2 x 5 min. Der zweite Antikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in TBST-Puffer zugegeben und wieder 1 h unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Die Membran wurde wieder wie oben beschrieben 5 x in TBST-Puffer gewaschen. Nach einem kurzen Trocknen der Membran wurde diese für 1- 2 min (RT) in ECL-Lösung geschwenkt und nach erneutem Trocknen in Haushaltsfolie eingepackt. In dieser Form erfolgt die Exposition eines Röntgenfilms in einer Filmkassette für 5 s - 10 min.

5.4.6 Nachweis der β -Galaktosidase-Expression in Zellen

Um die Expression der β -Galaktosidase in Zellen nachzuweisen, wurden diese nach einer Fixierung mit einer X-Gal-haltigen Färbelösung (siehe Kapitel 5.13) angefärbt. Für die Fixierung der Zellen direkt in der Zellkulturschale wird nach zweimaligem Waschen mit PBS eine

entsprechende Menge der Fixierlösung (siehe Kapitel 5.13) auf die Zellen aufgebracht (bei einer Vertiefung einer 6-Well-Zellkulturplatte etwa 1 ml). Nach einer Inkubation von 5 min (oder länger) bei 4°C werden die Zellen erneut 2 x mit PBS gewaschen.

Dann wurden die Zellen mit der Färbelösung überschichtet. Diese Färbelösung besteht aus 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$, 2 mM $MgCl_2$ und 1 mg/ml X-Gal in PBS. Während der Inkubationszeit (2-24 h bei 37°C) setzt das Enzym β -Galaktosidase das Substrat X-Gal in einer Hydrolysereaktion zu einem blauen, unlöslichen Indigofarbstoff um. Alle β -Galaktosidase-exprimierenden Zellen weisen folglich eine Blaufärbung auf, die unter dem Lichtmikroskop leicht erkannt werden kann.

5.5 Virologische Methoden

5.5.1 Herstellung rekombinanter Sendai Viren

5.5.1.1 Das MVA-T7-Virus

Um die T7-Polymerase in den Zellen zu exprimieren, stand das MVA-T7-Virus zur Verfügung. Es handelt sich um ein modifiziertes Vaccinia Virus, das die T7-Polymerase exprimiert. Dieses Virus ist attenuiert, es sollte also nach der ersten Infektion zu keinem weiteren Infektionszyklus mehr in der Lage sein (Wyatt *et al.*, 1995, Leyrer *et al.*, 1998 b).

5.5.1.1.1 Passagierung und Vermehrung des MVA-T7-Virus

Das MVA-T7-Virus kann auf primären Hühnerembryo Fibroblastenzellen vermehrt werden. Diese werden in Medium M199 mit Antibiotikum-Antimykotikum (Antibiotic-Antimycotic, Gibco; siehe Kapitel 5.9) inkubiert (4 d, 37°C). Die Zellen wurden mit MVA-T7-Virus infiziert (MOI = 2). Nach Inkubation (1 h, 37 °C) wurden die Zellen mit Medium M199 gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation (3 d, 37 °C) in Medium 199 (mit 2 % FKS). Nach dieser Inkubationszeit ließen sich die Zellen durch Klopfen leicht von der Platte ablösen. Die Zellen und das Zelldebris wurden durch einen Zentrifugationsschritt (10-15 min, 2000 rpm) pelletiert. Dieses Pellet wurde in PBS aufgenommen, drei aufeinanderfolgenden Gefrier/ Tau-Zyklen (> 40 min bei -20 °C, 5 min bei 30 °C) und schließlich einer Ultraschallbehandlung (3 x 1 min) unterworfen. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (10 min, 2000 rpm) konnte der Überstand in entsprechenden Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

5.5.1.1.2 Titerbestimmung des MVA-T7-Virus

Das MVA-T7-Virus trägt das Gen für die β -Galaktosidase. Daher können infizierte Zellen im β -Galaktosidase-Nachweistest (siehe Kapitel 5.4.6) an einer Blaufärbung leicht erkannt werden. Für die Titerbestimmung wurden CV1- oder HeLa-Zellen in Mikrotiterplatten ausgelegt. Das MVA-T7-Virus wurde in geeigneten Verdünnungsstufen auf die Zellen gegeben, wobei von Vertiefung zu Vertiefung jeweils eine Verdünnungsstufe von 1:2 eingehalten wird. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit (2 Tage, 37 °C) werden die Zellen aller Vertiefungen fixiert, so daß ein β -Galaktosidase-Nachweistest nach Standardprotokoll durchgeführt werden kann (siehe Kapitel 5.4.6).

Die Anzahl der blauen Zellen in den jeweiligen Vertiefungen kann mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt werden. Dieser Wert läßt sich unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnungsstufe in die Viruskonzentration in der Stammsuspension umrechnen.

5.5.1.2 Die pRS-cDNA bei der Herstellung rekombinanter Sendai Viren

Die Abkürzung "RS" steht für *rekombinantes Sendai Virus*. Die pRS-cDNA ist ein Plasmid, das auf dem pUC-Vector basiert und einen T7-Promotor gefolgt von einem SeV-*leader*, dann die sendaviralen Gene N, P, M, F, HN und L, einen SeV-*trailer*, ein Ribozym und den T7-Terminator enthält. Das pRS-Plasmid enthält also alle genetischen Elemente des Sendai Virus unter der Kontrolle des T7-Promotors. Die Herstellung rekombinanter Sendai Viren, die für bestimmte Gene defizient sind, ist unter Verwendung einer entsprechenden pRS-cDNA unter Einhaltung der entsprechenden Erfordernisse und Transkomplementation der fehlenden Gene bei der initialen Herstellung der Sendai Viren und bei der Passagierung sehr gut machbar.

5.5.1.3 Die Herstellung rekombinanter Sendai Viren

Die Herstellung rekombinanter Sendai Viren erfolgte in HeLa-Zellen, die am Vortag zu einer Konfluenz von 60-80 % in Six-Well-Zellkulturplatten ausgelegt worden waren. Diese Zellen wurden mit dem MVA-T7 Virus in 500 μ l DMEM infiziert (MOI 15). Vor der Infektion wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml DMEM gewaschen. Die Infektion erfolgte für 1.15 h bei 33°C. Während der Inkubationszeit sollte die Six-Well-Zellkulturplatte alle 15 min leicht geschwenkt werden.

Für die Transfektion der HeLa-Zellen wurde die benötigte DNA (5,4 μ g pTM-HN; 2,9 μ g pTM-P; 260 ng pTM-L; 15,0 μ g pRS-cDNA und bei Herstellung von HN-defizienten

Sendai Viren 1,5 µg pTM-HN) in 600 µl Opti-MEM gelöst. Nach Zugabe von 47 µl Lipofect-ACE (siehe Punkt 5.3.5.1) wurde das ERG sorgfältig gemischt, kurz abzentrifugiert und inkubiert (15-20 min, RT). Dabei sollte das Ende dieser Inkubationszeit mit dem Ende der Inkubationszeit des MVA-T7 Virus zusammenfallen. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die HeLa-Zellen zweimal mit je 1 ml DMEM gewaschen. Dann wurde der Transfektionsmix auf die Zellen pipettiert und jedem Ansatz einzeln 500 µl Opti-MEM zugegeben, so daß nach einer Inkubationszeit (5-10 h, 33°C) ein Mediumwechsel gegen 1 ml DMEM erfolgen konnte. Die erste Viruspassage erfolgte nach weiteren 48 h.

5.5.2 Hämadsorptionstest (HAD-Test)

Mit Hilfe des Hämadsorptionstests kann die Expression des HN-Proteins auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Dazu wurden entsprechend vorbereitete Erythrocyten in einer Verdünnung auf die Zellen gegeben. Die durch die hämagglutinierende Eigenschaft des HN-Proteins hervorgerufene Bindung der Erythrocyten an die Zellen konnte im Vergleich mit einer Negativkontrolle mit Hilfe eines Lichtmikroskops leicht nachgewiesen werden. Dieser Test gilt als funktioneller Nachweis für das Vorhandensein des HN-Proteins in einer Menge, die zu Herstellung infektiöser Nachkommenviren ausreicht (Fischer, 1998).

Zur Vorbereitung der Erythrocyten wurden 5 ml Frischblut (human, Blutgruppe 0) in 45 ml sterilem PBS verdünnt. Die Suspension wurde zentrifugiert (2000 rpm, 10 min, RT). Nach Abnahme und Verwerfen des Überstandes wurden 40 ml PBS zugegeben. Dieser Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar erschien. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Erythrocytensuspension in ein 10 ml-Röhrchen überführt und zur Lagerung mit Alsever-Lösung aufgefüllt.

Zur experimentellen Verwendung der Erythrocyten wurde der Alsever-Überstand abgenommen und verworfen. Das verbleibende Pellet wurde als Erythrocyten-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 % definiert. Dieses Pellet wurde mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, RT). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 10 ml PBS aufgenommen und geschüttelt. Der Zentrifugationsschritt wurde so oft wiederholt, bis der Überstand nach der Zentrifugation farblos erschien. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das PBS abgenommen.

Zur Herstellung einer 1 %-igen Erythrocytenlösung wurde von dem Erythrocyten-Pellet (entspricht *per definitionem* einer Erythrocytenkonzentration von 100 %) die erforderliche Menge abgenommen und mit Medium verdünnt.

Zur Durchführung des Hämadsorptionstests wurden die Zellen mit DMEM gewaschen und mit einer 1 %-igen Erythrocytenlösung überschichtet. Nach einer Inkubation bei 4°C für 1 h wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die auf den Zellen adsorbierten Erythrocyten konnten mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Leitz) leicht erkannt werden. Die Menge unspezifisch adsorbierter Erythrocyten kann durch den Vergleich mit einer Negativkontrolle (Zellen ohne Protein mit hämadsorbierender Wirkung) beurteilt werden.

5.6 Liste der verwendeten Chemikalien, Substanzen und Lösungsmittel

Bezeichnung	Lot/ Chargen-Nr.	Hersteller
Agarose high EEO	0550	Biomol Feinchemikalien GmbH, D-22769 Hamburg
ATP (<i>adenosine-tri-phosphate</i>), <i>lithium salt</i> 100 mmol/l	1140965, 84186420-37	Boehringer Mannheim GmbH, Germany
Bacto [®] Yeast Extract	Lot: 49573JC	Difco Laboratories, Detroit MI, 48232-7058 USA
Borsäure	K 23286165712	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	145 L 631122	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Casein	C-5890 Lot: 129F0609	Sigma [®] Chemical Company, St. Louis, USA
Chloroquine	No. C-6628 Lot: 127F-0833	Sigma [®] Chemical Company, St. Louis, USA
2,3-Dehydro-2-deoxy-N-Acetylneuraminsäure	Cat.Nr.: 252926	Calbiochem-Novabiochem Corporation, 10394 Pacific Center Court, San Diego, California, 92121 USA
<i>Deoxycholic Acid Sodium Salt (5β-Cholan-24-oic acid-3α, 12α-diol)</i>	86H0067	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid	9501620005	J.T. Baker B.V. Deventer-Holland
EDTA (siehe Titriplex [®] III)		
Ethanol absolut p.A.	1L 10530	Riedel-de Haën [®] , Sigma-Aldrich, D-30926 Seelze
Formamid p.A.	K24389084 740	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Glycerin	K26033794 901	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
HEPES	H-9136 Lot: 95H5719	Sigma Cell Culture [™] , Sigma Chemical Co, MO 63178, St. Louis, USA
Kristallviolett	106F-3508	Sigma Chemical Co St. Louis, USA, P-1379
Lithiumchlorid	730A268079	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Methanol p.A.	K29044809 113	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	K91107704 821	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.A.	K21914280 522	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxidplättchen (NaOH)	B394198 925	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	4360	Carl Roth GmbH & Co KG, Chemische Fabrik Karlsruhe
2-Propanol (Isopropanol)	K29459134 128	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Salzsäure rauchend 37% p.A.	K28314917 039	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
SDS, siehe Natriumlaurylsulfat		
Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	109F-079215	Sigma-Chemie, D-8024 Deisenhofen
Titriplex [®] III p.A. (Ethylendinitriilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat)	K21193318 450	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	10210	Riedel-de Haën [®] , Sigma-Aldrich, D-30926 Seelze
Trypanblau 0,5%ig in physiologischer Kochsalzlösung; Seromed [®]	Kat.-Nr: L6323 Ch.B. 302032	Biochrom KG, Leonorenstr. 2-6, D-1000 Berlin 46

Bezeichnung	Lot/ Chargen-Nr.	Hersteller
Trypton	8952.2	Carl Roth GmbH & Co KG, Chemische Fabrik Karlsruhe
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	70H0171	Sigma Chemical Co St. Louis, USA, P-1379
UDP- α -D-Galaktose, 2 x Na	Cat. No.: 670111	Calbiochem-Novabiochem Corporation, 10394 Pacific Center Court, San Diego, California, 92121 USA

5.7 Liste der verwendeten Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden - soweit nicht explizit anders angegeben - bei der Firma Amersham Biosciences bezogen.

Enzym	Lot-Nr.	Hersteller
Acetyltrypsin		Sigma
β -1,4-Galactosyltransferase, Bovine, Recombinant, <i>Spodoptera frugiperda</i>	Cat. No.: 345650	Calbiochem-Novabiochem Corporation, 10394 Pacific Center Court, San Diego, California, 92121 USA
Klenow-Polymerase	P/N : 2141Y Lot : 209135	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Munzinger Str. 9, D-79111 Freiburg
Neuraminidase (Sialidase)	1080725	Roche Diagnostics GmbH, Sandhoferstr. 116, D-68305 Mannheim, Germany
<i>Mung Bean Nuclease</i>	Lot-Nr.: C1701-3B	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Munzinger Str. 9, D-79111 Freiburg
Ready-To-Go™ T4 DNA Ligase	Produktnummer: 27-0361-01 Lot-Nummer: 2080361012	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Munzinger Str. 9, D-79111 Freiburg
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)</i>	P/N 70092Y; Lot-Nr.:111433	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Munzinger Str. 9, D-79111 Freiburg
T4-DNA-Ligase	#EL0331, Lot-Nr.:1231	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Heidelberg, Germany
T4-Polynukleotid-Kinase	E70031Y	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Munzinger Str. 9, D-79111 Freiburg
Taq DNA Polymerase	Lot: 11158	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Munzinger Str. 9, D-79111 Freiburg
Taq DNA Polymerase	Lot: 4333	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Heidelberg, Germany

5.8 Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Seriennummer	Hersteller
Bidest-Anlage Destamat		Heraeus
Einfriermaschine für Zellen Cryoson TRA5	Type: M 122-A9, F.-Nr. K10-196	Cryoson
ELISA-Photometer DY-NATECH MR 7000	Serien-Nr: G838 Modell-Nr: MR 7000 Katalog-Nr: DL 2000	DYNATECH Guernsey Channel Islands
Eppendorf Zentrifuge 5417R	5407B00393	Eppendorf GmbH, D-04436 Engelsdorf
Feinwaage Mettler AE100	1113041354	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland

Gerät	Seriennummer	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop Leitz DM IL HC inklusive Wild MPS 52 Fotokassette		Wetzlar
Geldokumentationsanlage Image Master VDS Modell-Nr.: 80-6247-01	9608-E-189	Pharmacia Biotech
Gilson Pipetten		Gilson International
Heizblock Eppendorf Thermomixer 5436	No. 5436B06744	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22331 Hamburg
Inkubator 37°C Typ B5042 E	Fabriksnummer 8301216	Heraeus
Invertmikroskop Leica Diavert (S2-Labor)	Ident-Nr.: 109833 Serien-Nr.: 949897	Lilienthalstr. 39-45, 6140 Bensheim
Invertmikroskop Leica Diavert (S2-Labor) inklusive Fotoeinrichtung Wild MPS 12 (Heerbrugg, Schweiz)	Ident-Nr.: 109834 Serien-Nr.: 992204	Lilienthalstr. 39-45, 6140 Bensheim
Photometer DU [®] 640 Spectrophotometer, Typ: UV-DU 640 mit angeschlossenem EPSON FX-870 Drucker	4317269	Beckmann
Quarzküvette Hellma [®]	105.020.02B-QS	Hellma [®] -Präzisionsküvetten
Schüttelinkubator innova TM 4200		New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Thermocycler Statagene Robocycler TM Gradient 40	086294372053	Stratagene RoboCycler TM , La Jolla, USA
Tischzentrifuge Hettich EBA12 Typ 1000	Werknummer: 613	Hettichzentrifugen, D-78532 Tuttlingen
UV-Leuchtschirm Typ IL-200-M		Bachofer GmbH, D-7410 Reutlingen, Deutschland
Ultraschallgerät BRANSON Sonifier [®] Cell Disruptor B15 Modell B-15P	BG60020	BRANSON
Ultrazentrifuge Sorvall [®] RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	8802951	Du Pont Instruments
Waage Mettler P2210 Type 2210	No. 479818	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Wasserbad Thermomix 1441	Typ 850201 Nr. 512	B. Braun Melsungen AG

5.9 Liste der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Wirkmechanismus	Wirkspektrum	Katalog-Nr:	Hersteller
Blasticidin S HCl	Translationsinhibitor	Eukaryonten	R210-01	Invitrogen
Hygromycin B	Translationsinhibitor	Eukaryonten	10687-010	Invitrogen
Geneticin [®] (G418 Sulfat)	behindert die Funktion des 80S-Ribosoms und blockiert die Proteinsynthese	Eukaryonten	10131-019	Invitrogen
Zeoicin TM	DNA-Interkalation und Spaltung	Eukaryonten	R250-01	Invitrogen
Ampicillin		Prokaryonten		
Antibiotic-Antimycotic		Breitspektrum-Inhibitor für Kontaminationen in der Zellkultur	15240-062 Lot: 1097422	Gibco BRL

5.10 Zellkulturmedien und Seren

Bezeichnung	Hersteller
Dulbeccos's Modified Eagle's Medium DMEM	Invitrogen
Fötale Kälberserum (Komplement inaktiviert bei 56°C, 30 min)	Invitrogen
OptiMEM	Invitrogen
Häm's F12 Nutrient Mixture	Invitrogen
FKS - Fetal Bovine Serum (Tetrazyklin-rückstandsfrei geprüft), Lot: 51K8412	Sigma
FKS - Fötale Kälberserum	Invitrogen

5.11 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Typennummer	Hersteller
ERGs 1,5 und 2,0 ml		Eppendorf
Falcons 15 ml und 50 ml		Falcon
6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well-Zellkulturplatten		Nunc
Zellkulturflaschen		Nunc
Handschuhe semperguard latex powderfree		Semperit Technische Produkte GmbH & Co KG, Modecenterstraße 22, 1031 Wien, Austria
Handschuhe semperguard nitrile powderfree		Semperit
Kryogefäße 1,0 ml Nunc CryoTube™ Vials	u.a. Batch 057465	Nunc
Plastikpipetten		Nunc
Zellschaber		Nunc

5.12 Sicherheitsbestimmungen

Alle Experimente mit infektiösen Viruspartikeln wurden nach den Bestimmungen des Infektionsschutzgesetzes in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe II in entsprechenden Laminar-Air-Flow-Werkbänken durchgeführt. Kontaminierte Geräte und Gefäße wurden in Lorasol/ Intersporol (2 %) desinfiziert und anschließend autoklaviert. Die Handhabung von gentechnisch veränderten Organismen erfolgte nach den Bestimmungen des Gentechnikgesetzes, die Arbeit mit Chemikalien und Lösungsmitteln nach den Vorschriften der Gefahrstoffverordnung.

5.13 Liste der verwendeten Lösungen und Puffersubstanzen

Blotpuffer:

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

CTC (Copper/ Tartrat/ Carbonat)
(4x-Lösung):

I: 0,1 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
0,2 g Na-Tartrat
werden in 45 ml H_2O gelöst
II: 10 g Na_2CO_3 werden in 45 ml H_2O
gelöst
Lösung I wird vorsichtig unter lang-
samem Rühren in Lösung II gegeben
und mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

ECL-Lösung:

Lösung I und Lösung II unmittelbar
vor Gebrauch im Verhältnis
1:1 mischen (laut Angaben des Herstellers)

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris/ HCl pH 8,7
150 mM Glycerin
0,1 % SDS frisch zugeben
im Kühlschrank lagern

Fixierlösung:

2 % Paraformaldehyd
0,2 % Glutaraldehyd
in PBS

Färbelösung:

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
1 mg/ml X-Gal
in PBS

2x HBS (*hepes buffered saline*),
pH 6,95:

für 250 ml:
4,003 g NaCl
0,186 g KCl
2,383 g HEPES
0,062 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
sterilfiltrieren

Lösung A (frisch):

5 ml CTC-Lösung
5 ml 10 % SDS
4 ml 1 M NaOH
6 ml H_2O

Lösung B:

1 Teil Folin Ciocalteaus Phenolreagenz
5 Teile H_2O

LB-Medium:

10 g Tryptone
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
(15 g/ l Agar)
pH 7,0 (mit % N NaOH)
ad 1 Liter H_2O , autoklavieren

2x Proteinprobenpuffer:

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

RIPA-Puffer:

5 ml 3M NaCl \rightarrow 150 mM
1 g Na-Deoxycholat \rightarrow 1 %
10 ml 10 % Triton X-100 \rightarrow 1 %
0,5 ml 20 % SDS \rightarrow 0,1 %
1 ml 1 M Tris/ HCl (pH 8,7) \rightarrow 10 mM
Bei Verwendung von 1 M Tris/ HCl
(pH 8,7) ergibt sich ein pH-Wert für den
RIPA-Puffer von 8,2.
(Roux L. & Waldvogel F.A., 1982)

5 % Sammelgel:

7 ml H_2O
1,65 ml Protogel Acrylamid
1,25 ml Tris/ HCl pH 6,8
100 μl 10 % SDS
50 μl 10 % APS
16 μl Temed

TBST:

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

10 % Trenngel:

7,25 ml H_2O
10 ml Protogel Acrylamid
11,25 ml 1 M Tris/ HCl pH 8,7
300 μl 10 % SDS
150 μl 10 % APS
22,5 μl Temed

TSB:

10 % Polyethylenglycol (MW 3350)
5 % DMSO
10 mM MgCl_2
10 mM MgSO_4
in LB-Medium
Sterilfiltrieren

5.14 Sequenzen von Primern und Oligonukleotiden

Primer pDP-Seq-for (3.2.1.3.1):

5'-GACCTCCATAGAAGACACCGGG)

Primer loxP-for-mut (3.2.1.3):

5' – AGGTCGAGGGACCTAATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATT-
AAGG

Primer loxP-rev (3.2.1.3):

5' – GGCTGATCAGCGGGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCC

Linker MfeI/ KpnI-1 (3.2.1.3):

5'-CCTGGTACCACCGCAATTGCGCT

Linker MfeI/ KpnI-2 (3.2.1.3):

5'-AATTAGCGCAATTGCGGTGGTACCAGGGTAC

Oligonukleotid loxP1 (3.2.1.3):

5'-TTAAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGGTAC

Oligonukleotid loxP2 (3.2.1.3):

5'-CATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATC

Linker L-XhoI-EcoRI-1 (3.2.1.3.4):

5'-TCGAGCCGGACGG

Linker L-XhoI-EcoRI-2 (3.2.1.3.4):

5'-AATTCCGTCCGGC

Primer 1 for (3.2.1.4):

5'-TCCCCTGCTATTCTGCTCAACCTTCCTATCAG

Primer 2 rev (3.2.1.4):

5'-GTTGTAGAACCAGGTAACAA**G**CTCGGACCAGG (**G** = mutagen)

Primer 3 for (3.2.1.4):

5'-CCTGGTCCGAGCTTGTTA**C**CTGGTTCTACAAC (**C** = mutagen)

Primer 4 rev (3.2.1.4):

5'-GGGTGGTTAGCCCACCATACCCAAGAAATATC

Primer: SeV-HN-5'-Sal-for (3.2.1.4):

5'-TTCGGAATTC**GTCGAC**ATGGATGGTGATAGGGG (Rot: Zum HN-ORF komplementäre Sequenzbereiche, Blau: Schnittstellen SalI bzw. XhoI)

Primer: SeV-HN-3'-XhoI-rev (3.2.1.4):

5'-TTCGGAATTC**CTCGAG**TTAAGACTCGGCCTTGC (Rot: Zum HN-ORF komplementäre Sequenzbereiche, Blau: Schnittstellen SalI bzw. XhoI)

Primer HN7132+ (3.2.1.1):

5'-GCATGGTGGACTGCGATC

Primer HN7668 (3.2.1.1):

5'-CGGCATTGCAACAGAAGGC

Primer HN7866+ (3.2.1.1):

5'-CTGAGAGATAGTCATTGACC

Primer HN8362 (3.2.1.1):

5'-CCTTACAGCCGATGCTCT

6 LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AcTr	Acetyltrypsin
AS	Aminosäure(n)
ASGP-R	Asialoglykoproteinrezeptor
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaar(e)
d	Tag(e)
Δ	Delta = defizient
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
evtl.	Eventuell
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GT	Galaktosyltransferase (β-1,4-Galaktosyltransferase; Calbiochem 345650)
h	Stunde(n)
m	Meter
M	Molar
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
min	Minute(n)
mg	Milligramm
μm	Mikrometer
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (bezeichnet die Anzahl der eingesetzten Viruspartikel pro Zelle)
mU	Milli-Units
μU	Mikro-Units
N	Nukleotid(e)
NAase	Neuraminidase (Roche 1080725)
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹ g)
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
No	<i>number</i>
Nr	Nummer
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PFU	<i>plaque-forming-units</i>
p.I.	<i>post infection</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde(n)
SeV	Sendai Virus
Tet	Tetrazyklin
U	Unit
VP	Viruspassage

7 LITERATURLISTE

- Abruzzese R.V., Godin D., Burcin M., Mehta V., French M., Li Y., O'Malley B.W., Nordstrom J.L. (1999):** Ligand-dependent regulation of plasmid-based transgene expression in vivo. *Hum Gene Ther*, **10(9)**: 1499-1507
- Ali A., Nayak D.P. (2000):** Assembly of Sendai virus: M protein interacts with F and HN proteins and with the cytoplasmic tail and transmembrane domain of F protein. *Virology*, **276(2)**: 289-303
- Ashwell G., Morell A. (1974 a):** The dual role of sialic acid in the hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *Biochem Soc Symp*, **40**: 117-124
- Ashwell G., Morell A. (1974 b):** The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **41(0)**: 99-128
- Bagai S., Puri A., Blumenthal R., Sarkar D.P. (1993):** Hemagglutinin-neuraminidase enhances F protein-mediated membrane fusion of reconstituted Sendai virus envelopes with cells. *J Virol*, **67(6)**: 3312-3318
- Bagai S., Sarkar D.P. (1993 a):** Reconstituted Sendai virus envelopes as biological carriers: dual role of F-protein in binding and fusion with liver cells. *Biochim Biophys Acta*, **1152(1)**: 15-25
- Bagai S., Sarkar D.P. (1993 b):** Kinetics of fusion with cells of reconstituted Sendai virus envelopes lacking hemagglutinin-neuraminidase. *Indian J Biochem Biophys*, **30(6)**: 395-396
- Bagai S., Lamb R.A. (1995 a):** Quantitative measurement of paramyxovirus fusion: differences in requirements of glycoprotein between simian virus 5 and human parainfluenza virus 3 or Newcastle disease virus. *J Virol*, **69(11)**: 6712-6719
- Bagai S., Lamb R.A. (1995 b):** Individual roles of N-linked oligosaccharide chains in intracellular transport of the paramyxovirus SV5 fusion protein. *Virology*, **209(1)**: 250-256
- Becker S., Spiess M., Klenk H.D. (1995):** The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol*, **76(Pt2)**: 393-399
- Berman P., Dowbenko D., Lasky L.A. (1983):** Detection of antibodies to Herpes Simplex Virus with a continuous cell line expressing cloned glycoprotein D. *Science*, **222**: 524-527

- Bitzer M.**, Lauer U., Spiegel M., Gregor M., Neubert W.J. (1997): Sendai virus efficiently infects cells via the asialoglycoprotein receptor and requires the presence of cleaved F0 precursor proteins for this alternative route of cell entry. *J Virol*, **71(7)**: 5481-5486
- Bitzer M.**, Ungerechts G., Bossow S., Graepler F., Sedlmeier R., Armeanu S., Bernloehr C., Spiegel M., Gross C.D., Gregor M., Neubert W.J., Lauer U.M. (2003): Negative-Strand RNA Viral Vectors: Intravenous Application of Sendai Virus Vectors for the Systemic Delivery of Therapeutic Genes. *Mol Ther*, **7(2)**: 210-217
- Blumberg B.**, Giorgi C., Roux L., Raju R., Dowling P., Chollet A., Kolakofsky D. (1985 a): Sequence determination of the Sendai virus HN gene and its comparison to the influenza virus glycoproteins. *Cell*, **41(1)**: 269-278
- Blumberg B.**, Giorgi C., Rose K., Kolakofsky D. (1985 b): Sequence determination of the Sendai virus fusion protein gene. *J Gen Virol*, **66(Pt2)**: 317-331
- Boshart M.**, Weber F., Jahn G., Dorsch-Hasler K., Fleckenstein B. (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, **41(2)**: 521-530
- Brown W.R.**, Kloppel T.M. (1989): The role of the liver in translocation of IgA into the gastrointestinal tract. *Immunol Invest*, **18(1-4)**: 269-285
- Calain P.**, Roux L. (1993) : The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol*, **67(8)**: 4822-4830
- Canchola**, J.G., Channock R.M., Jeffries B.C., Christmas, E.E., Kim H.W., Vargosko A.J., Parrott R.H. (1965): Recovery and identification of human myxoviruses. *Bacteriol Rev*, **29(4)**: 496-503
- Connolly D.T.**, Townsend R.R., Kawaguchi K., Hobish M.K., Bell W.R., Lee Y.C. (1983): Binding and endocytosis of glycoproteins and neoglycoproteins by isolated rabbit hepatocytes. *Biochem J*, **214(2)**: 421-431
- Curran J.A.**, Kolakofsky D. (1988): Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C mRNA. *EMBO J*, **7**: 245-251
- Curran J.A.**, Kolakofsky D. (1989): Scanning independent ribosomal initiation of the Sendai virus Y-proteins in vitro and in vivo. *EMBO J*, **8**: 521-526
- Drickamer K.**, Mamon J.F., Binns G., Leung J.O. (1984): Primary structure of the rat liver asialoglycoprotein receptor. Structural evidence for multiple polypeptide species. *J Biol Chem*, **259(2)**: 770-778
- Drickamer K.** (1996): Ca(2+)-dependent sugar recognition by animal lectins. *Biochem Soc Trans*, **24(1)**: 146-150
- Fields** (2001): Virology. *Lippincott Williams & Wilkins*, Vierte Auflage

- Fischer** Susanne (1998): Herstellung von Verpackungszelllinien zur Trans-Komplementation der drei viralen Hüllproteine bei der Erzeugung rekombinanter replikationsdefizienter Sendai-Viren. Dissertationsarbeit in der AG Neubert.
- Fouillot-Coriou** N., Roux L. (2000): Structure-function analysis of the Sendai virus F and HN cytoplasmic domain: different role for the two proteins in the production of virus particle. *Virology*, **270(2)**: 464-475
- Fuerst** 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 USA*, **83(21)**: 8122-8126
- Gallia** G.L., Khalili K. (1998): Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system. *Oncogene*, **16(14)**: 1879-1884
- Garcin** D., De Melo M., Roux L., Kolakofsky D., Curran J. (1994): Presence of a truncated form of the Sendai virus P protein in a long-term persistent infection: implications for the maintenance of the persistent state. *Virology*, **201(1)**: 19-25
- Giniger** E., Varnum S.M., Ptashne M. (1985): Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, **40(4)**: 767-774
- 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 FA, Clyde W.A. Jr., Senior R.J., Sheaffer C.I., Conley W.G., Denny F.W. (1971): Epidemiologic patterns of acute lower respiratory disease of children in a pediatric group practice. *J Pediatr*, **78(3)**: 397-406
- Glotzer** J.B., Saltik M., Chiocca S., Michou A.I., Moseley P., Cotten M. (2000): Activation of heat-shock response by an adenovirus is essential for virus replication. *Nature*, **407(6801)**: 207-211
- Gorman** C.M., Moffat L.F., Howard B.H. (1982): Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **2(9)**: 1044-1051
- Gorman** J.J., Nestorowicz A., Mitchell S.J., Corino G.L., Selleck P.W. (1988): Characterization of the sites of proteolytic activation of Newcastle disease virus membrane glycoprotein precursors. *J Biol Chem*, **263(25)**: 12522-12531
- Gossen** M., Bujard H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89(12)**: 5547-5551
- Gupta** K.C., Kingsbury D.W. (1984): Complete sequences of the intergenic and mRNA start signals in the Sendai virus genome: homologies with the genome of vesicular stomatitis virus. *Nucleic Acids Res*, **12(9)**: 3829-3841

- Hamaguchi M.**, Nishikawa K., Yoshida T., Hanaichi T., Nagai Y. (1985): Transcriptive complex of Newcastle disease virus: I. Both L and P protein are required to constitute an active complex. *Virology*, **128**: 105-117
- Herrler G.**, Compans R.W. (1982): Synthesis of mumps virus polypeptides in infected Vero cells. *Virology*, **119(2)**: 430-438
- Hillen W.**, Berens C. (1994): Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*, **48**: 345-369
- Hillen W.**, Gatz C., Altschmid L., Schollmeier K., Meier I. (1983): Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes. Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. *J Mol Biol*, **169(3)**: 707-721
- Hoess R.H.**, Abremski K. (1985): Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombinant system. *J Mol Biol*, **181(3)**: 351-362
- Homann H.**, Hofschneider P.H., Neubert W.J. (1990): Sendai virus gene-expression in lytically and persistently infected cells. *Virology*, **177**: 131-140
- Hu J.H.**, Qi B., Nakanishi M., Qi Y.P. (2000): Transcription and Translation of Sendai Virus Hemagglutinin-neuraminidase (HN) in Mammalian Cells. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, **32(3)**: 229-234
- Hubbard A.L.**, Stukenbrok H. (1979): An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver. II. Intracellular fates of the 125I-ligands. *J Cell Biol*, **83(1)**: 65-81
- 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
- Kamboj R.K.**, Schoepp D.D., Nutt S., Shekter L., Korczak B., True R.A., Rampersad V., Zimmerman D.M., Wosnick M.A. (1994): Molecular cloning, expression, and pharmacological characterization of humEAA1, a human kainate receptor subunit. *Journal of Neurochemistry*, **62**: 1-9
- Kano M.**, Matano T., Kato A., Nakamura H., Takeda A., Suzaki Y., Ami Y., Terao K., Nagai Y. (2002): Primary replication of a recombinant Sendai virus vector in macaques. *J Gen Virol*, **83**: 1377-1386
- Kano M.**, Matano T., Kato A., Shioda T., Nagai Y. (2002): Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector. *Jpn J Infect Dis*, **55(2)**: 59-60
- Kawano M.**, Bando H., Yuasa T., Kondo K., Tsurudome M., Komada H., Nishio M., Ito Y. (1990): Sequence determination of the hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of human parainfluenza type 2 virus and the construction of a phylogenetic tree for HN proteins of all the paramyxoviruses that are infectious to humans. *Virology*, **174(1)**: 308-313

- 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
- Knippers Rolf (1997):** Molekulare Genetik. 7. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- 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
- Lambert D.M. (1988):** Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology*, **164(2)**: 458-466
- Lasky L.A., Gropman J.E., Fennie C.W., Benz P.M., Capon D. J., Dowbenko D.J., Nakamura G.R., Nunes W.M., Renz M.E., Berman P.W. (1986):** Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glykoprotein. *Science*, **233**: 209-212
- Lee R.T., Lee Y.C. (1987):** Affinity labeling of the galactose/N-acetylgalactosamine-specific receptor of rat hepatocytes: preferential labeling of one of the subunits. *Biochemistry*, **26(20)**: 6320-6329
- Leyrer Sonja (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., Bitzer M., Lauer U., Kramer J., Neubert W.J., Sedlmeier R. (1998 a):** Sendai virus-like particles devoid of hemagglutinin-neuraminidase protein infect cells via the human asialoglycoprotein receptor. *J Gen Virol*, **79(Pt4)**: 683-687
- Leyrer S., Neubert W.J., Sedlmeier R. (1998 b):** Rapid and efficient recovery of Sendai virus from cDNA: factors influencing recombinant virus rescue. *J Virol Methods*, **75(1)**: 47-58
- Li H.O., Zhu Y.F., Asakawa M., Kuma H., Hirata T., Ueda Y., Lee Y.S., Fukumura M., Iida A., Kato A., Nagai Y., Hasegawa M. (2000):** A Cytoplasmic RNA-Vector Derived from Nontransmissible Sendai Virus with Efficient Gene Transfer and Expression. *J Virol*, **74 (14)**: 6564-6569
- Lillie J.W., Green M.R. (1989):** Transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Nature*, **338(6210)**: 39-44

- Lodish H.F. (1991):** Recognition of complex oligosaccharides by the multi-subunit asialoglycoprotein receptor. *Trends Biochem Sci*, **16(10)**: 374-377
- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Darnell J. (1995):** Molecular Cell Biology. Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York
- Lowry O.H. et al. (1951):** *J Biol Chem*, **193**: 265
- Lyn D., Mazanec M.B., Nedrud J.G., Portner A. (1991):** Location of amino acid residues important for the structure and biological function of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Sendai virus by analysis of escape mutants. *J Gen Virol*, **72**: 817-824
- Malatynska E., Wang Y., Knapp R.J., Santoro G., Li X., Waite S., Roeske W.R., Yamamura H.I. (1995) :** Human delta opioid receptor : a stable cell line for functional studies od opioids. *Neuroreport*, **6**: 613-616
- Markwell M.A., Portner A., Schwartz A.L. (1985):** An alternative route of infection for viruses: entry by means of the asialoglycoprotein receptor of a Sendai virus mutant lacking its attachment protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82(4)**: 978-982
- Mathew E.C., Sanderson C.M., Hollinshead R., Hollinshead M., Grimley R., Smith G.L. (1999):** The effects of targeting the virus B5R protein to the endoplasmic reticulum on virus morphogenesis and dissemination. *Virology*, **265(1)**: 131-146
- Mee A.P. (1999):** Paramyxoviruses and Paget's disease: the affirmative view. *Bone*, **24 (5 Suppl)**: 19S-21S
- Michou A.I., Lehrmann H., Saltik M., Cotten M. (1999):** Mutational analysis of the avian adenovirus CELO, which provides a basis for gene delivery vectors. *J Virol*, **73(2)**: 1399-1410
- Mochizuki Y., Tashiro M., Homma M. (1988):** Pneumopathogenicity in mice of a Sendai virus mutant, TSrev-58, is accompanied by in vitro activation with trypsin. *J Virol*, **62(8)**: 3040-3042
- Modrow, S., Falke, D. (1998):** Molekulare Virologie, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin
- Monroe R.S., Huber B.E. (1994):** Characterization of the „hepatic“ asialoglycoprotein receptor in rat late-stage spermatids and epididymal sperm. *Gene*, **148(2)**: 261-268
- Morrison T.G., Simpson D. (1980):** Synthesis, stability, and cleavage of Newcastle disease virus glycoproteins in the absence of glycosylation. *J Virol*, **36(1)**: 171-180
- Mortensen R., Chesnut J.D., Hoeffler J.P., Kingston R.E. (1997):** Selection of Transfected Mammalian Cells. *Curr Prot Mol Biol*, Supplement 39, **Unit 9.5**, 9.5.1-9.5.19
- Moss B., Elroy-Stein O., Mizukami T., Alexander W.A., Fuerst T.R. (1990):** Product review. New mammalian expression vectors. *Nature*, **348(6296)**: 91-92

- Mottet G., Muller V., Roux L. (1999):** Characterization of Sendai virus M protein mutants that can partially interfere with virus particle production. *J Gen Virol*, **80 (Pt11)**: 2977-2986
- Mu J.Z., Tang L.H., Alpers D.H. (1993):** Asialoglycoprotein receptor mRNAs are expressed in most extrahepatic rat tissue during development. *Am J Physiol*, **264 (4Pt1)**: G752-762
- Nagai Y. (1999):** Paramyxovirus replication and pathogenesis. Reverse genetics transforms understanding. *Rev Med Virol*, **9(2)**: 83-99
- Nakamura K., Homma M., Compans R.W. (1982):** Effect of tunicamycin on the replication of Sendai virus. *Virology*, **119(2)**: 474-487
- 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(3)**: 1147-1150
- Ozaki K., Lee R.T., Lee Y.C., Kawasaki T. (1995):** The differences in structural specificity for recognition and binding between asialoglycoprotein receptors of liver and macrophages. *Glycoconj J*, **12(3)**: 268-274
- Pacifico F., Laviola L., Ulianich L., Porcellini A., Ventra C., Consiglio E., Avvedimento V.E. (1995):** Differential expression of the asialoglycoprotein receptor in discrete brain areas, in kidney and thyroid. *Biochem Biophys Res Commun*, **210(1)**: 138-144
- Park J.H., Cho E.W., Shin S.Y., Lee Y.J., Kim K.L. (1998):** Detection of the asialoglycoprotein receptor on cell lines of extrahepatic origin. *Biochem Biophys Res Commun*, **244(1)**: 304-311
- Pelet T., Delenda C., Gubbay O., Garcin D., Kolakofsky D. (1996):** Partial characterization of a Sendai virus replication promoter and the role of six. *Virology*, **224(2)**: 405-414
- 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. *J Gen Virol*, **77(Pt10)**: 2465-2469
- Peterson G.L. (1983):** Determination of total protein. *Methods Enzymol*, **91**:95-119
- Ralston S.H., Helfrich M.H. (1999):** Are paramyxoviruses involved in Paget's disease? A negative view. *Bone*, **24(5 Suppl)**: 17S-18S
- Reddy S.V., Kurihara N., Menea C., Roodman G.D. (2001):** Paget's disease of bone: a disease of the osteoclast. *Rev Endocr Metab Disord*, **2(2)**: 195-201
- Robbins P.D., Tahara H., Ghivizzani S.C. (1998):** Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol*, **16(1)**: 35-40

- Roux L.**, Waldvogel F.A. (1982): Instability of the viral M protein in BHK-21 cells persistently infected with Sendai virus. *Cell*, **28(7)**: 293-302
- 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(2)**: 651-663
- Sanger C.**, Mühlberger E., Klenk H.D., Becker S. (2001): Adverse effects of MVA-T7 on the transport of Marburg virus glycoprotein. *J Virol Methods*, **91(1)**: 29-35
- Scheid A.**, Caliguirri L.A., Compans R.W., Choppin P.W. (1972): Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinating and neuraminidase activities with the larger SV5 glycoprotein. *Virology*, **50(3)**: 640-652
- Scheid A.**, Choppin P.W. (1973): Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *J Virol*, **11(2)**: 263-271
- Seyffert W.**, Gassen H.G., Hess O., Jäckle H., Fischbach K.-F. (1998): Seyffert - Lehrbuch der Genetik; Gustav Fischer Verlag. ISBN 3-437-25610-6.
- Sharkey C.M.**, North C.L., Kuhn R.J., Sanders D.A. (2001): Ross River Virus Glycoprotein-Pseudotyped Retroviruses and Stable Cell Lines for Their Production. *J Virol*, **75(6)**: 2653-2659
- Spiess M.**, Lodish H.F. (1985): Sequence of a second human asialoglycoprotein receptor: conservation of two receptor genes during evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82(19)**: 6465-6469
- Spiess M.**, Schwartz A.L., Lodish H.F. (1985): Sequence of human asialoglycoprotein receptor cDNA. An internal signal sequence for membrane insertion. *J Biol Chem*, **260(4)**: 1979-1982
- Sternberg N.**, Hamilton D. (1981): Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, **150(4)**: 467-486
- 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(Pt5)**: 1031-1042
- Stricklett P.K.**, Nelson R.D., Kohan D.E. (1999): The Cre/loxP system and gene targeting in the kidney. *Am J Physiol*, **276(5 Pt 2)**: F651-657
- Stryer L.** (4.Auflage, 1998): Biochemie, *Spektrum Akademischer Verlag*, ISBN: 3-86025-346-8
- Sutter G.**, Ohlmann M., Erfle V. (1995): Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett*, **371(1)**: 9-12
- Tashiro M.**, McQueen N.L., Seto J.T. (1999): Determinants of organ tropism of sendai virus. *Front Biosci*, **4**: D642-645

- Taylor** N.A., Shennan K.I., Cutler D.F., Docherty K. (1996): Mutations in the pro-peptide of PC2 prevent transit through the secretory pathway. *Biochem Soc Trans*, **24(2)**: 193S
- Townsend** R.R., Hardy M.R., Wong T.C., Lee Y.C. (1986): Binding of N-linked bovine fetuin glycopeptides to isolated rabbit hepatocytes: Gal/GalNAc hepatic lectin discrimination between Gal beta(1,4)GlcNAc and Gal beta(1,3)GlcNAc in a triantennary structure. *Biochemistry*, **25(19)**: 5716-5725
- Tozawa** H., Watanabe M., Ishida N. (1973): Structural components of Sendai virus. Serological and physiochemical characterization of hemagglutinin subunit associated with neuraminidase activity. *Virology*, **55(1)**: 242-253
- Vegeto** E., Allan G.F., Schrader W.T., Tsai M.J., McDonnell D.P., O'Malley B.W. (1992): The mechanism of RU 486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell*, **69(4)**: 703-713
- Vidal** S., Curran J., Kolakofsky D. (1990): A stuttering model of Paramyxovirus P mRNA editing. *EMBO J*, **9**: 2017-2022
- Vidal** S., Kolakofsky D. (1989): Modified model for the switch from Sendai virus transcription and replication. *J Virol*, **63**: 1951-1958
- Vulliemoz** D., Roux L. (2001): « Rule of six »: how does the Sendai virus RNA polymerase keep count? *J Virol*, **75(10)**: 4506-4518
- Wall** D.A., Hubbard A.L. (1981): Galactose-specific recognition system of mammalian liver: receptor distribution on the hepatocyte cell surface. *J Cell Biol*, **90(3)**: 687-696
- Wang** Y., O'Malley B.W.Jr, Tsai S.Y., O'Malley B.W. (1994): A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91(17)**: 8180-8184
- Wang** Y., Xu J., Pierson T., O'Malley B.W., Tsai S.Y. (1997): Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator. *Gene Ther*, **4(5)**: 432-441
- Waterson**, A.P. (1962): Two kinds of myxovirus. *Nature*, **48**: 1163-1164
- Weigel** P.H. (1994): Galactosyl and N-acetylgalactosaminyl homeostasis: a function for mammalian asialoglycoprotein receptors. *Bioessays*, **16(7)**: 519-524
- Willenbrink** Wolfgang (1991): Herstellung und Charakterisierung von Sendai Virus NP- und P-Protein exprimierenden Helferzellen. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Wong** T.C., Hirano A. (1986): Functional cDNA library for efficient expression of measles virus-specific gene products in primate cells. *J Virol*, **57**: 343-348

- Wyatt** L.S., Moss B., Rozenblatt S. (1995): Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology*, **210(1)**: 202-205
- Yao** F., Svensjo T., Winkler T., Lu M., Eriksson C., Eriksson E. (1998): Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, **9(13)**: 1939-1950
- Yoshida** T., Nagai Y., Yoshii S., Maeno K., Matsumoto T. (1976): Membrane (M) protein of HVJ (Sendai virus): its role in virus assembly. *Virology*, **71(1)**: 143-161
- Yoshima** H., Nakanishi M., Okada Y., Kobata A. (1981): Carbohydrate structures of HVJ (Sendai virus) glycoproteins. *J Biol Chem*, **256(11)**: 5355-5361
- Yoshima** H., Furthmayr H., Kobata A. (1980): Structures of the asparagine-linked sugar chains of glycoprotein A. *J Biol Chem*, **255(20)**: 9713-9718

8 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Neubert** am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Abteilung für Molekulare Virologie angefertigt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Neubert** für die bereitgestellten Mittel und das Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie die äußerst motivierende Gesprächsbereitschaft und die wertvollen Anregungen im Rahmen der Betreuung der Dissertationsarbeit. In derselben Weise möchte ich mich bei Herrn **Dr. Axel Ullrich** für den Arbeitsvertrag bedanken.

Bei Herrn **PD Dr. Jerzy Adamski** möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die zahlreichen fachlichen Anregungen und die Gesprächsbereitschaft bei allen zellbiologischen Fragestellungen, Promotorproblemen und auch solchen außerhalb der Dissertation; außerdem für die Vertretung der Dissertationsarbeit vor der Fakultät Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, TUM Weihenstephan. Der herzlichste Dank gebührt ihm allerdings für sein langfristiges Vertrauen in mich und die ständige Hilfsbereitschaft.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinem ersten Prüfer, Herrn **Prof. Dr. Dr. Johann Bauer**, Lehrstuhl für Tierhygiene, TUM, WZW, und beim Vorsitzenden der Prüfung, Herrn **Prof. Dr. B. Hock** für die Übernahme dieser verantwortungsvollen Tätigkeit.

Auch sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau **Sabine Schlecht** für die tolle Freundschaft, den Rückhalt, die netten Gespräche während der Kaffee- und Balkonpausen und die sehr hilfreiche und äußerst wertvolle seelische Unterstützung in vielen verschiedenen Situationen.

Herzlicher Dank gebührt auch meinem geschätzten Arbeitskollegen **Herrn Marian Wiegand** für die Aufmunterung und Auflockerung der vielen Arbeitstage.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bedanken beim Präsidenten der Max-Planck-Gesellschaft, Herrn **Prof. Dr. Peter Gruss** und seinem Doktoranden **Joachim Berger**, Göttingen, für die schnelle, unbürokratische und bereitwillige Zusendung des Plasmids PF49 und die beiliegenden Kühlaggregate; bei Herrn **Dr. Matt Cotten**, Firma Axxima, Martinsried, für die schnelle und bereitwillige Überlassung einer Charge des Adeno-Cre Virus; bei Herrn **Dr. Martin Hrabé de Angelis**, GSF, Neuherberg, für die sehr rasche und unbürokratische Überlassung des Plasmid pKS-Cre, ebenso bei Frau **Dr. Uli Mayer, Manchester** für die Übersendung des Plasmids pCre.

Auch bei Herrn **Dr. Helmut Rausch**, Firma Axxima, Martinsried, möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die Einladungen zum Kaffee und die netten und sehr aufschlußreichen Gespräche.

Bei meinen Arbeitskollegen, Herrn **Dr. Sascha Bossow** und Frau **Christine Baumann** möchte ich mich herzlich für die Einarbeitung, die Hilfe und die Unterstützung bedanken und für die sehr lehrreiche Zeit.

