

Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München
durchgeführt am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried)

**Die Entwicklung von replikationsdefizienten Vektoren mit geringer Zytotoxizität
auf Basis von Sendai Viren führt zur Aufdeckung einer essentiellen Funktion
des viralen N-Proteins während der viralen Transkription**

Marian A. Wiegand

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.rer.nat. Erwin Grill

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.rer.nat.habil. Dieter Langosch
2. apl.Prof. Dr.rer.nat. Dr.med.habil. Wolfgang J. Neubert
3. apl.Prof. Dr.rer.nat. Dr.rer.nat.habil. Franz Peter Fischer

Die Dissertation wurde am 21. Dezember 2006 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20. Februar 2007 angenommen.

ERKLÄRUNG

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

Die Entwicklung von replikationsdefizienten Vektoren mit geringer Zytotoxizität auf Basis von Sendai Viren führt zur Aufdeckung einer essentiellen Funktion des viralen N-Proteins während der viralen Transkription

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

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

München, den 20.03.2007

.....

(Unterschrift)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Wiegand, M., Bossow, S. & Neubert, W. J. (2005). Sendai virus trailer RNA simultaneously blocks two apoptosis-inducing mechanisms in a cell type-dependent manner. *J Gen Virol* **86**, 2305-14.

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1. Taxonomische Einordnung des Sendai Virus	5
2.2. Aufbau und Morphologie des Sendai Virus	6
2.3. Genomorganisation des Sendai Virus	7
2.4. Replikationszyklus des Sendai Virus	9
2.4.1. Viruseintritt in die Wirtszelle.....	9
2.4.2. Transkription des Genoms	9
2.4.3. Replikation des Genoms	10
2.4.4. Virusassembly und Virusausschleusung	11
2.5. Zytopathogenität des SeV	12
2.5.1. Apoptose-Induktion durch das Sendai Virus	12
2.5.2. Induktion einer CTL-Antwort durch das SeV N-Protein.....	13
2.6. Das Nukleokapsidprotein (N)	14
2.6.1. Funktionen und Struktur des N-Proteins.....	15
2.6.2. Das N-Protein während der Transkription	16
2.6.3. Das N-Protein während der Replikation	16
2.7. Herstellung eines replikationsdefizienten SeV-Vektors mit geringem zytopathischem Potenzial	19
2.8. Zielsetzung der Arbeit	22
3. Ergebnisse	24
3.1. Herstellung der Virusmutante SeV ΔN	25
3.1.1. Herstellung der cDNA pRS Δ N PE und pRS Δ N PE F _{mut}	25
3.1.2. Initiale Herstellung von SeV Δ N PE und SeV Δ N PE Fmut	27
3.1.2.1. <i>Virus rescue</i> mit MVA-T7-System	27
3.1.2.2. <i>Virus rescue</i> mit BSR-T7-System.....	29
3.1.2.3. Optimierung der <i>rescue</i> -Bedingungen	31
3.1.3. Überprüfung der SeV Δ N-Mutanten in Komplementationsversuchen	33
3.1.3.1. Verifizierung der Funktionalität der Transkriptionskassette von SeV Δ N.....	33
3.1.3.2. Nachweis der Replikationsdefizienz von SeV Δ N.....	34
3.2. Vermehrung von SeV ΔN	36
3.2.1. Nachweis der Vermehrbarkeit von SeV Δ N durch Koinfektion mit SeV-wt	36
3.2.2. Versuche zur Vermehrung von SeV Δ N über Helferzellen	37
3.2.2.1. Verwendung bereits existierender Helferzellen	38
3.2.2.1.1. Die Helferzellen LTK ⁻ -394 und LTK ⁻ -460	38

3.2.2.1.2.	Die Helferzelle H29	39
3.2.2.2.	Herstellung neuer Helferzellen	40
3.2.2.2.1.	Modifikation von Expressionsvektoren zur stabilen Transfektion von Zellen	41
3.2.2.2.2.	Auswahl geeigneter Zelllinien	46
3.2.2.2.3.	Auswahl des Transfektionsreagenzes	47
3.2.2.2.4.	Zusammenfassung der Auswahlkriterien.....	49
3.2.2.2.5.	Stabile Transfektion ausgewählter Zelllinien.....	50
3.2.2.2.6.	Identifizierung geeigneter Zellklone	53
3.2.2.2.7.	Charakterisierung der Helferzellklone VPN11, VPN44 und VPN285	54
3.2.3.	Vermehrung von SeV Δ N über transiente Transfektion	60
3.2.3.1.	Überlegungen zur transienten Transfektion als SeV Δ N-Vermehrungssystem ..	61
3.2.3.2.	Verifizierung des Systems zur Vermehrung replikationsdefizienter SeV	62
3.2.3.3.	Vermehrungsversuch von SeV Δ N	63
3.2.3.4.	Optimierung der Vermehrung von SeV Δ N PE F _{mut}	64
3.2.3.4.1.	Test verschiedener Zelllinien	64
3.2.3.4.2.	Optimierung der Plasmidmengen.....	66
3.2.4.	Zusammenfassung der Vermehrung von SeV Δ N	70
3.3.	Genexpression von SeV-Mutanten mit Deletionen im N-Gen.....	71
3.3.1.	Genexpression von SeV Δ N in Zielzellen und Helferzellen.....	71
3.3.1.1.	EGFP-Transgenexpression.....	71
3.3.1.2.	Nachweis der Genexpression über virales Protein.....	74
3.3.2.	Modifikation von SeV Δ N zur Steigerung der Genexpression.....	76
3.3.2.1.	Herstellung der Mutanten SeV N Δ 472-91 PE F _{mut} und SeV N Δ 472-524 PE F _{mut}	77
3.3.2.2.	Detektion der eGFP-Transgenexpression	79
3.3.2.3.	Test auf Unterstützung der SeV Δ N-Transkription durch verkürzte N-Proteine	80
3.3.3.	Neusynthese von SeV N-Protein essentiell für effiziente SeV-Transkription	82
3.3.3.1.	Herstellung von SeV Δ N P Δ 2-77E F _{mut}	82
3.3.3.2.	Effiziente SeV-Transkription durch Neusynthese von SeV N-Protein.....	84
3.3.4.	Zusammenfassung der Genexpression von SeV Δ N.....	85
3.4.	Reduzierung der Zytotoxizität von SeV-Vektoren.....	86
3.4.1.	Zelltyp-abhängiger reduzierter CPE bei Humanzelllinien.....	87
3.4.2.	Vergleich der Zytopathogenität von SeV-Stamm F und Z	89
3.4.3.	Induktion von Apoptose durch SeV-Stamm F über verschiedene Mechanismen.....	92
4.	Diskussion	95
4.1.	Induktion von Apoptose durch SeV-Mutante Fctr48z	97

4.2.	Bedingungen für eine Vermehrung von SeV ΔN	102
4.3.	Essentielle Komponenten der SeV-Transkription	107
4.4.	Neue Modellvorstellungen zum Polymerasekomplex	111
5.	Material und Methoden	119
5.1.	Material und Bezugsquellen	119
5.1.1.	Chemikalien & Lösungsmittel	119
5.1.2.	Enzyme	120
5.1.3.	Nukleinsäuren und Plasmide	120
5.1.4.	Kompetente Bakterienstämme	121
5.1.5.	Medien und Zusätze für Prokaryonten	121
5.1.6.	Zelllinien	121
5.1.7.	Medien und Zusätze für Eukaryonten	122
5.1.8.	Antikörper	122
5.1.9.	Transfektionsreagenzien	122
5.1.10.	Präparations- und Nachweissysteme	122
5.1.11.	Viren	123
5.1.12.	Verwendete Geräte	123
5.1.13.	Sonstiges	123
5.2.	Methoden	124
5.2.1.	Zellbiologische Methoden	124
5.2.1.1.	Allgemeine Zellkulturmethoden	124
5.2.1.2.	Bestimmung der Zellzahl in Suspension	124
5.2.1.3.	Transfektion von eukaryontischen Zellen	124
5.2.1.4.	Transfektion mit LipofectACE	125
5.2.1.5.	Isolierung von stabil transfizierten, eukaryontischen Zellklonen	125
5.2.1.6.	Monoklonalisierung von transfizierten Zellen	125
5.2.1.7.	Synchronisation des Zellzyklus mit Nocodazole	126
5.2.1.8.	MTT-Assay	126
5.2.1.9.	<i>In situ</i> -Immunfluoreszenz	126
5.2.1.10.	FACS-Analyse	127
5.2.1.11.	RNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellen	127
5.2.2.	Virologische Methoden	127
5.2.2.1.	Herstellung rekombinanter Sendai Viren im <i>virus rescue</i>	127
5.2.2.1.1.	<i>Virus rescue</i> mit MVA-T7-System	127
5.2.2.1.2.	<i>Virus rescue</i> mit BSR-T7-System	128

5.2.2.2.	Infektion von Zellen.....	128
5.2.2.3.	Hämadsorptionstest (HAD).....	129
5.2.2.4.	Hämagglutinationstest (HA)	129
5.2.2.5.	Kulturinfektionsdosistest (KID).....	129
5.2.2.6.	Zellinfektionsdosistest (ZID)	130
5.2.3.	Molekularbiologische Methoden	130
5.2.3.1.	Transformation von <i>E.coli</i> XL2-Blue MRF` und XL10-Gold.....	130
5.2.3.2.	Transformation von <i>E.coli</i> NEB 5 α C2991H.....	131
5.2.3.3.	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	132
5.2.3.4.	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	132
5.2.3.5.	Isopropanol/Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren	132
5.2.3.6.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	132
5.2.3.7.	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	133
5.2.3.8.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	133
5.2.3.9.	Ligation von DNA-Fragmenten	133
5.2.3.10.	Agarose-Gelelektrophorese.....	133
5.2.3.11.	Nachweis von Nukleinsäuren im Agarosegel	134
5.2.3.12.	Isolierung von DNA-Fragmenten < 10 kb aus Agarosegelen.....	134
5.2.3.13.	Isolierung von DNA-Fragmenten \geq 10 kb aus Agarosegelen.....	134
5.2.3.14.	Reverse Transkription (RT)	134
5.2.3.15.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	134
5.2.3.16.	Verwendete DNA-Oligonukleotide/ <i>primer</i>	135
5.2.3.17.	Reinigung von PCR-Produkten.....	137
5.2.3.18.	Sequenzierung.....	137
5.2.4.	Proteinchemische Methoden	137
5.2.4.1.	Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen	137
5.2.4.2.	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	137
5.2.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	138
5.2.4.4.	Western Blot.....	139
5.2.4.5.	Immunologischer Nachweis von Proteinen	139
5.2.5.	Computerprogramme	140
5.2.6.	Sicherheitsbestimmungen	140
6.	Literaturverzeichnis.....	141

Abkürzungsverzeichnis

Danksagung

1. Zusammenfassung

Das Sendai Virus (SeV) gehört als Vertreter der Paramyxoviren zu den einzelsträngigen RNA-Viren mit negativ-orientiertem Genom. Mit Hilfe von rekombinanten Techniken ist es möglich SeV mit zielgerichtet modifizierten Genomen und Transgeninsertionen herzustellen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Basis für replikationsdefiziente und damit anwendungssichere virale SeV-Vektoren, mit geringerem zytopathischen Potenzial, für medizinische Applikationen im Vakzine- und Gentherapie-Bereich entwickelt werden. Durch eine Replikationsdefizienz kann eine Vermehrung und unkontrollierte Ausbreitung der Viruspartikel (VP) im Zielorganismus ausgeschlossen werden. Zunächst wurde die Replikationsdefizienz im viralen Genom auf der Ebene von cDNA manifestiert, indem das SeV N-Gen deletiert wurde (ΔN), dessen Genprodukt eine essentielle Komponente des viralen Nukleokapsids darstellt. Bei der Herstellung dieser Deletion wurde das SeV N-Gen so modifiziert, dass der kodierende N-ORF entfernt wurde und nur die an den 3'- und 5'-Enden des Gens vorhandenen Regulationsbereiche erhalten blieben. Auf diese Weise wurde eine leere Transkriptionskassette (TRKA) erzeugt, in die ein beliebiges Transgen inseriert werden kann. Anschließend wurde diese leere TRKA in das SeV-Genom SeV PE anstelle des N-Gens eingesetzt. Das daraus entstandene SeV ΔN PE besitzt neben der leeren TRKA ein eGFP-Transgen hinter dem P-Gen (PE). Dieses diente als Reporter gen, um die Vektorentwicklung in Zellkultur verfolgen und das Replikations- und Transkriptionsverhalten beurteilen zu können. Für die initiale Herstellung von Viruspartikeln (VP) in Zellkultur wurden zwei für die Herstellung von SeV-wt etablierte *rescue*-Verfahren verglichen. Nach Optimierung der Bedingungen für das effizientere *rescue*-System, das auf stabil transfizierten BSR-T7-Zellen basiert die die T7-Polymerase synthetisieren, konnte eine initiale Menge von 15 000 *ciu/ml* von SeV ΔN erzielt werden. Während Infektionen von Vero-Zellen konnte die Vermehrungsinkompetenz von SeV ΔN nachgewiesen werden. Die Funktionalität der TRKA für die Insertion eines Transgens wurde über die Reinsertion des SeV N-ORF zu vermehrungsfähigen SeV verifiziert. Damit war die initiale Herstellung von SeV ΔN abgeschlossen. Als nächstes sollte ein System zur Vermehrung der initial hergestellten SeV ΔN -Partikel etabliert werden. Nachdem über Koinfektionen von SeV ΔN und SeV-wt die prinzipielle Vermehrbarkeit von SeV ΔN gezeigt werden konnte, wurden für die Amplifikation von SeV ΔN zunächst Helferzellen getestet, die in dieser Arbeitsgruppe bereits existierten. Es stellte sich jedoch heraus, dass sowohl LTK-Helferzellen, die entweder nur das SeV-N- oder das SeV-N- und -P-Protein synthetisieren, als auch H29-Zellen, die neben N- und P- auch das SeV L-Protein produzieren und bereits erfolgreich für die Vermehrung anderer SeV-Deletionsmutanten (SeV ΔP und P Δ 2-77) eingesetzt worden waren, die Vermehrung von SeV ΔN nicht ausreichend unterstützten. Da die maximal von diesen Helferzellen produzierte Menge an SeV N-Protein ca. 5% im Vergleich zu SeV-wt-Infektionen entsprach, sollten neue Helferzellen entwickelt werden, die eine größere Menge an N-Protein

synthetisieren konnten. Werden SeV N-Proteine in Abwesenheit von SeV P-Proteinen in Zellen synthetisiert, komplexieren sie unspezifisch RNA-Moleküle. Deshalb sollten in neuen Helferzellen sowohl SeV N- als auch P-Gene exprimiert werden. Damit von den Helferzellen eine möglichst große Proteinmenge hergestellt werden kann, wurden die N- und P-Gene in optimierte Expressionsplasmide inseriert (pPRECISE-N und -P), die anschließend für die stabile Transfektion eingesetzt wurden. Nach Auswahl von geeigneten Zelllinien und entsprechenden Transfektionsreagenzien, wurden Vero- und LLC-MK₂-Zellen mit pPRECISE-N und -P transfiziert und Zellklone selektioniert, die stabil die SeV-Gene exprimierten. Aus rund 500 Zellklonen wurden diejenigen identifiziert, die eine SeV Δ N-Vermehrung am effizientesten unterstützen. Trotz einer im Vergleich zu H29-Zellen leicht höheren Menge an synthetisiertem N-Protein in Kombination mit verschiedenen großen Mengen an P-Protein, konnte keiner der Zellklone eine SeV Δ N-Vermehrung effizient fördern. Daher musste doch auf das Verfahren der transienten Transfektion zur Transkomplementierung von SeV Δ N zurückgegriffen werden, das wegen schwankender Prozentsätze an Transgen-exprimierenden Zellen zunächst nicht in die Versuchsplanung aufgenommen worden war. Nach Auswahl einer geeigneten Zelllinie und Optimierung aller Versuchsbedingungen konnte unerwartet eine Vermehrung von SeV Δ N-Partikeln in transfizierten BSR-T7-Zellen bis zu einem Titer von $0,5 \times 10^6$ *ciu/ml* erzielt werden. Diese Menge an SeV Δ N reichte aus um die Transkriptionsleistung des viralen Vektors in Zielzellen zu analysieren.

Während Infektionen von Vero-Zellen mit SeV Δ N ergab sich das Phänomen, dass keine eGFP-Transgenexpression über Fluoreszenzmikroskopie oder FACS-Analyse detektiert werden konnte. Wurde hingegen N-Protein zusätzlich zur SeV Δ N-Infektion bereitgestellt, trat eine deutliche eGFP-Expression auf. Das war nicht zu erwarten gewesen, denn es widersprach der aktuell gültigen Vorstellung zur SeV-Transkription, dass das N-Protein keine wesentliche Funktion bei der Transkription besitzt. Durch die Konstruktion einer weiteren Vektormutante, die für ein nur partiell deletiertes N-Protein ohne die As 472-524 kodiert (SeV N Δ 472-524 PE F_{mut}) aber trotzdem replikationsdefizient ist, wurde versucht eine Transkription in Zielzellen zu erreichen. Doch weder durch SeV N Δ 472-524-Infektionen alleine, noch durch die zusätzliche Bereitstellung von verkürzten N Δ 472-524-Proteinen über transiente Transfektion eines für das N Δ 472-524-Protein kodierenden Expressionsplasmids konnte eine Transkription in Zielzellen erreicht werden. Um den für die Entwicklung viraler Vektoren und die Grundlagenforschung sehr bedeutenden Ablauf der SeV-Transkription mit Beteiligung des N-Proteins weiter zu untersuchen wurde die Mutante SeV Δ N PA2-77E F_{mut} entwickelt. Durch die zusätzlich zur N-Gendeletion vorhandenen partiellen Deletion des P-Gens – ohne As 2-77 – konnte bei Bereitstellung von N-Protein während SeV Δ N PA2-77-Infektionen weiterhin eine Genomvermehrung ausgeschlossen werden. Auf diese Weise konnte eine potenzielle transkriptions-unterstützende Funktion des N-Proteins bei unveränderter *template-*

Anzahl während Infektionen untersucht werden. Da SeV Δ N P Δ 2-77-infizierte Zellen nur in Anwesenheit von SeV N-Protein eine eGFP-Transgenexpression aufwiesen, konnte die Notwendigkeit einer Synthese von N-Protein für eine effiziente SeV-Transkription erstmals eindeutig nachgewiesen werden. Hieraus ergab sich die Aufteilung der Transkription in einen Zwei-Stufen-Prozess, wobei die nach der Primärtranskription und beginnender Synthese viraler Proteine einsetzende Sekundärtranskription erst zu einer effizienten viralen Genexpression führt.

Für die Untersuchung einer Reduktion des zytopathogenen Potenzials eines SeV-Vektors wurde die bereits zuvor hergestellte SeV-Mutante Fctr48z verwendet, die einen Austausch der ersten 48 Nt des SeV F-Stamm-Genoms gegen die äquivalente Sequenz des Z-Stamm-Antigenoms besitzt. Während Fctr48z-Infektionen von humanen 293-, A549- und HepG2-Zellen konnte eine Zelltyp-abhängig variable Reduktion des zytopathischen Effekts (CPE) gegenüber SeV-wt-Infektionen (Stamm F) festgestellt werden. Das über vergleichende Infektionsstudien nachgewiesene größere zytopathische Potenzial des SeV F-Stamms gegenüber dem Z-Stamm konnte auf das gleichzeitige Vorhandensein verschiedener CPE-auslösender Mechanismen während SeV F-Infektionen zurückgeführt werden. Um das zytopathische Potenzial eines SeV-Vektors zu reduzieren könnten demnach, neben dem Austausch der ersten 48 Nt des SeV F-Stamm-Genoms gegen die äquivalente Sequenz des SeV Z-Stamm-Antigenoms, auch weitere F-Stamm- gegen Z-Stamm-Sequenzen erwogen werden.

Insgesamt sind sowohl die weitere Erforschung der viralen Transkription als auch das Ergebnis zur Reduzierung des zytopathogenen Potenzials von SeV für die Weiterentwicklung von viralen Vektoren auf Basis von SeV von grundlegender Bedeutung.

2. Einleitung

Das Sendai Virus (SeV) gehört zur Familie der Paramyxoviridae und besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Orientierung. SeV können mit Hilfe eines *rescue*-Systems in Zellkultur rekombinant hergestellt werden. Dabei wird eine cDNA mit der genomischen Sequenz des SeV eingesetzt, an der vorher gezielte Mutationen vorgenommen werden können. Auf diese Weise können maßgeschneiderte SeV produziert werden, die im medizinisch-therapeutischen Bereich Anwendung finden oder für verschiedene grundlegende Fragestellungen zur Biologie des Virus eingesetzt werden könnten.

Ein zukunftsweisendes und vielversprechendes Forschungsgebiet stellen die Gentherapie und die Entwicklung von Vakzinen dar, in denen Vektoren auf viraler Basis bereits erste Anwendungen gefunden haben. Ziel der Gentherapie ist es einen Gendefekt in Zellen durch das gezielte Einbringen von korrekter, genetischer Information auszugleichen oder zu ersetzen. Verschiedene virale Systeme werden bereits erforscht, um für einen *in vivo*-Gentransfer effizient eingesetzt werden zu können. Eine Grundvoraussetzung für die Verwendung eines Virus als Gentransfervektor stellt die Insertion eines Fremdgens in das virale Genom mit seiner anschließender Expression dar. Bei manchen Viren lässt sich die Kodierungskapazität des Genoms um einige Kilobasen problemlos erweitern, bei anderen funktioniert die Insertion eines Gens nur im Austausch gegen eine virale Sequenz. Ein weiterer Faktor, der eine Anwendung bestimmter Viruskonstrukte als Vektor einschränkt, kann das Wirkspektrum eines Virus sein. Viele Viren infizieren nur sich teilende Zellen, wodurch Muskel-, Leber- oder Nervenzellen durch einen solchen Vektor nicht erreicht würden. Von besonderer Bedeutung für eine medizinische Anwendung im Bereich der Gentherapie ist die immunologische Reaktion eines Organismus auf die Gabe eines Gentransfer-Arzneimittels. Da Viren meist als körperfremd erkannt werden, kann, z.T. abhängig vom Applikationsweg, eine starke zelluläre Immunantwort ausgelöst werden. Diese kann dazu führen, dass die transduzierten Zellen und damit der Vektor zu schnell eliminiert werden, bevor eine Wirkung entfaltet werden kann. Bei Einsatz sehr großer Mengen an Vektorpartikeln kann allerdings auch eine Immunreaktion von lebensbedrohlichen Ausmaßen eintreten. Daher ist es von Vorteil, wenn ein Vektor kein zu starkes Immunogen darstellt oder diese Wirkung reduziert werden kann. Eine weitere Gefahr kann der Einsatz von Viren, z.B. Retroviren, bergen, deren cDNA in das Genom von Zielzellen integrieren kann. Solche Integrationen verlaufen unkontrolliert, und können durch Insertionsmutagenese eine Entartung der Zelle zur Folge haben.

Bei Einsatz von viralen Vektoren in der Entwicklung neuer Vakzine-Typen spielt vor allem der Sicherheitsaspekt, d.h. der Schutz des Impflings vor Nebenreaktionen durch zu starke Vermehrung von Lebendvakzinen eine entscheidende Rolle. Replikationsdefiziente Vektoren könnten hier den Sicherheitsstandard bedeutend verbessern.

Verschiedene Viren, wie Adenoviren, Adenoassoziierte Viren, Herpes- oder Retroviren, wurden bereits in ersten klinischen Studien eingesetzt, wobei nach erfolgreichen vorklinischen Studien immer wieder Probleme auftraten, die mit den oben genannten Punkten in Verbindung standen. Als bisher noch kaum getesteter Kandidat für die Entwicklung eines viralen Vektors auf Basis eines RNA-Virus, verfügt das Sendai Virus über einige vorteilhafte Eigenschaften mit Bezug zu Wirksamkeit und Sicherheit eines Vektors:

- kein humanpathogenes Potential
- Schutz vor Insertionsmutagenese durch RNA-Genom und intrazellulärer Lokalisation der viralen Genome im Zytoplasma
- große Erweiterungskapazität des Genoms (mind. 5 kb)
- vergleichsweise kleines, virales Genom und damit verbundene geringe Komplexität der viralen Biologie
- breites Wirkungsspektrum durch geringen Zelltropismus
- Infizierbarkeit von sich nicht teilenden Zellen

Bevor mögliche Entwicklungsschritte für ein Vektorkonstrukt detaillierter beschrieben werden, soll nachfolgend zunächst auf die allgemeine Biologie des SeV eingegangen werden, wobei mit der Klassifizierung begonnen wird.

2.1. Taxonomische Einordnung des Sendai Virus

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

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

<u>Unterfamilie</u>	<u>Genus</u>	<u>Art</u>	
Paramyxovirinae	Avulavirus	Newcastle Disease Virus	
		Avianes Paramyxovirus Typ 2 – 9	
	Henipavirus	Hendra Virus	
		Nipah Virus	
		Sendai Virus	
	Respirovirus	Humanes Parainfluenza Virus Typ 1 und 3	
		Rubulavirus	Mumps Virus
			Humanes Parainfluenza Virus Typ 2, 4a und 4b
			Mapuera Virus
	Morbillivirus		Simian Virus 5
		Masernvirus	
		Rinderpestvirus	
		Hundestaupavirus	
Pneumovirinae	Pneumovirus	Humanes Respiratorisches Syncytial Virus	
		Bovines Respiratorisches Syncytial Virus	
	Metapneumovirus	Avianes Pneumovirus	

(ICTVdB - The Universal Virus Database, 2006)

2.2. Aufbau und Morphologie des Sendai Virus

Das Sendai Virus ist ein behülltes Virus mit helikalem Nukleokapsid (Abb. 1). Seine durchschnittliche Größe beträgt 150 nm. Die Hülle besteht aus einer Lipidmembran, die von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle stammt, aus der das Virus freigesetzt wurde. In der viralen Hülle sind zwei transmembrane Glykoproteine verankert. Das Fusionsprotein (F) vermittelt in seiner aktivierten Form die Fusion der Wirtszell- und der Virusmembran. Das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN) bindet über seine hämagglutinierende Domäne an den zellulären Rezeptor und fördert durch seine Neuraminidase-Aktivität die Virusfreisetzung aus der Zelle. Das Matrixprotein (M) kleidet die Innenseite der Membran aus und verbindet das Nukleokapsid mit den Oberflächenproteinen und der Membran. Die einzelsträngige RNA liegt im Komplex mit 2 564 Nukleokapsidproteinen (N) als linksorientierte Helix vor, wobei je sechs Nukleotide von einem N-Protein bedeckt werden (*rule of six*). Jede Windung der Helix besteht aus 13 N-Proteinen bzw. 78 Nukleotiden. Zusammen mit etwa 300 Phosphoproteinen (P) und 20 – 30 *Large*-Proteinen (L) bildet der RNA-Nukleoprotein-Komplex das Nukleokapsid (Lamb & Kolakofsky, 2001) und erst durch diese Einheit ist eine virale Transkription und Replikation möglich (Buchholz et al., 1994).

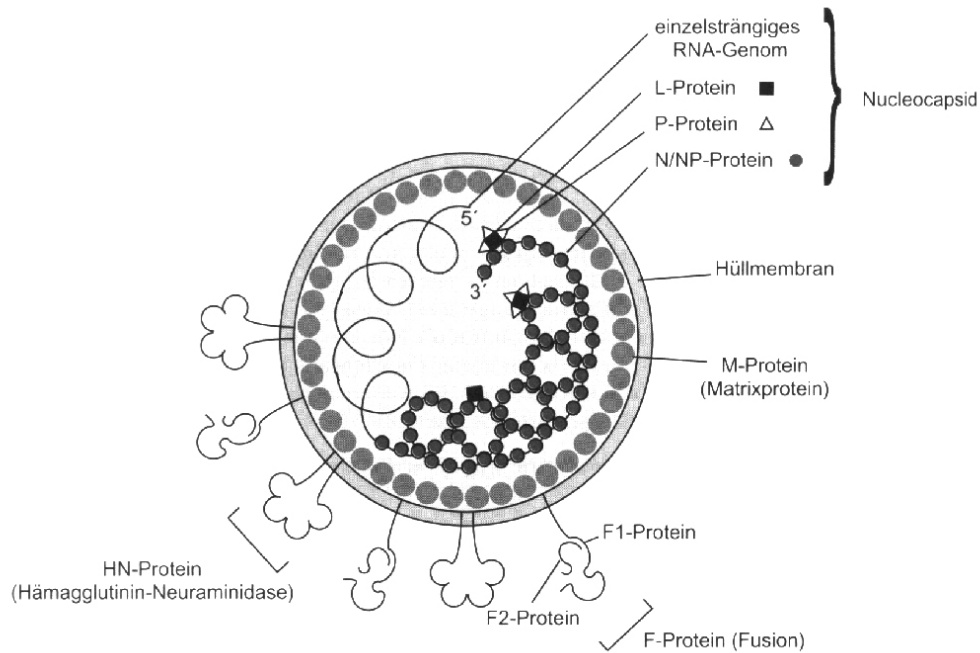


Abbildung 1: Morphologie des Sendai-Virus. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA, die mit den N-, P- und L-Proteinen zu einem helikalen Nucleocapsid interagiert. Das Nucleocapsid ist von einer Membranhülle umgeben, in die HN- und F-Proteine (aus je einer F₁- und F₂- Untereinheit) eingelagert sind. Das M-Protein assoziiert mit den cytoplasmatischen Domänen der Transmembranproteine und den Nucleocapsidkomponenten (Modrow et al., 2003).

2.3. Genomorganisation des Sendai Virus

Das einzelsträngige, negativorientierte RNA-Genom des SeV Wildtyp (wt) besteht aus 15 384 Nt. Die Gene der sechs Strukturproteine liegen darauf in der Reihenfolge 3'-N-P-M-F-HN-L-5' vor (Abb. 2). Zwischen den Genen liegen Übergänge aus 50 – 80 Nukleotiden, die jeweils eine stark konservierte Region von 22 Nukleotiden beinhalten. Diese Sequenz lässt sich wiederum in drei Abschnitte unterteilen. Die ersten neun Nukleotide stellen das Terminationssignal des vorangegangenen Gens dar. Die nachfolgenden drei Nukleotide, entweder 3'-GAA oder 3'-GGG, bilden die so genannte intergenische Sequenz (IR) und werden nicht transkribiert. Die letzten 10 Nukleotide fungieren als Startsignal für das folgende Gen (Gupta & Kingsbury, 1984). Jedes Gen enthält also flankierende Konsensussequenzen, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Eine Einheit aus Startsignal, *Open Reading Frame* (ORF) und Terminationssignal wird als Transkriptionskassette bezeichnet.

Vor dem N-Gen befindet sich eine 55 Nukleotide lange *leader*-Sequenz, die zwar transkribiert aber nicht translatiert wird. Von der 54 Nukleotide langen *trailer*-Sequenz wird angenommen, dass sie ebenfalls transkribiert wird (Lamb & Kolakofsky, 2001). Die *leader*- und *trailer*- Region fungieren als genomische und antigenomische Promotoren für die Replikation von Genom bzw. Antigenom

(Vulliemoz & Roux, 2002). Gleichzeitig befinden sich auch essentielle Promotorbereiche für die Transkription in dieser Sequenz. Es wird angenommen, dass sich die Promotoren für Transkription

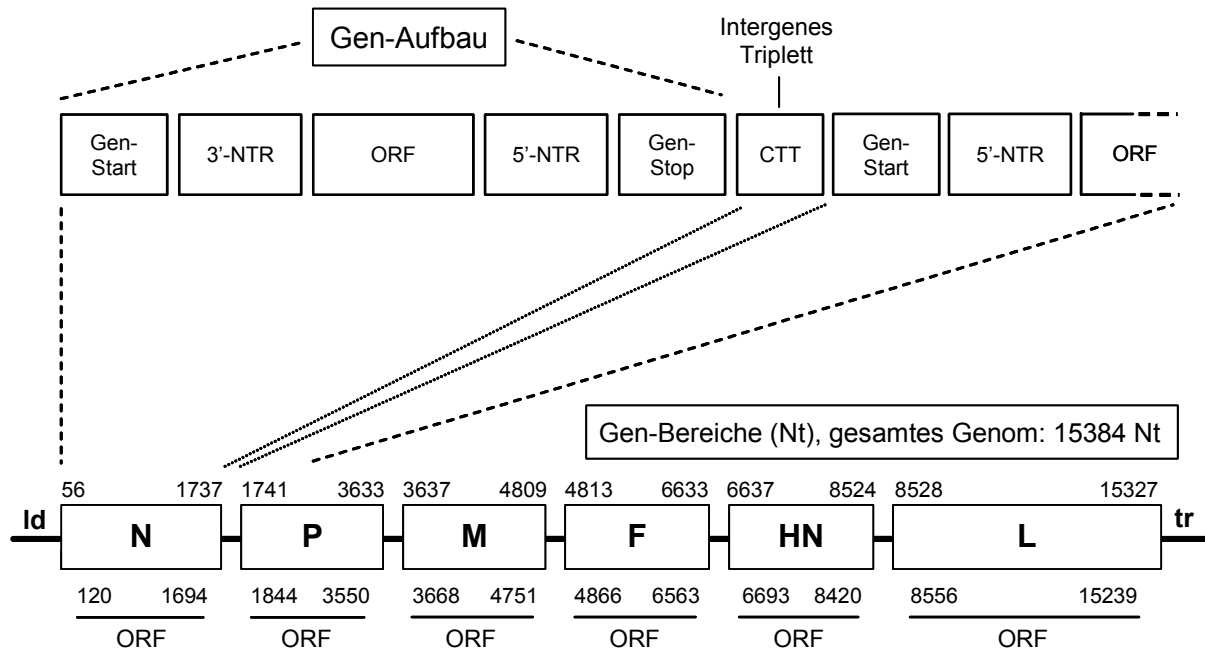


Abb. 2: Genomaufbau des Sendai Virus. Schematische Darstellung aller vorhandenen Abschnitte des Genoms. Angabe aller vorhandenen Open Reading Frames (ORFs) mit zugehörigen Positionen der Nukleotide. Darstellung des Gen-Aufbaus anhand eines Genomausschnitts.

und Replikation überschneiden, wobei die ersten ca. 30 Nt hauptsächlich für die Replikation benötigt werden (Lamb & Kolakofsky, 2001). Bevor die virale Antigenom- und Genom-Replikation startet, findet eine Transkription von *leader* und *trailer* statt, wobei kurze RNA-Stücke synthetisiert werden. Es wird angenommen, dass dieser Prozeß an dem Kontrollmechanismus, der über den Beginn der Replikation entscheidet, beteiligt ist. Darüber hinaus wird *trailer*-Transkripten eine Rolle bei der Unterdrückung einer zellulären Apoptoseantwort während SeV-Infektionen zugeschrieben (Garcin et al., 1998).

Die mRNA-Transkripte der sechs Gene sind mit Ausnahme der P/C-RNA monocistronisch.

Das P/C-Gen kodiert für insgesamt acht Proteine (P, C, C', Y1, Y2, V, W, X). Dabei handelt es sich um das strukturelle Phosphoprotein (P) und alle bisher bekannten Nichtstrukturproteine. Die Proteine C, C', Y1 und Y2 kommen durch die Verwendung verschiedener Start-Codons und der dadurch entstehenden unterschiedlichen Leserahmen zustande (Curran & Kolakofsky, 1988, Curran & Kolakofsky, 1989). Die mRNAs der Proteine V und W entstehen durch RNA-Editing, wodurch ein bzw. zwei zusätzliche Guanylat-Reste in die mRNA eingebaut werden und eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge haben (Vidal et al., 1990).

2.4. Replikationszyklus des Sendai Virus

Der Replikationszyklus des Sendai Virus kann in verschiedene Stadien untergliedert werden, die nachfolgend vorgestellt werden.

2.4.1. Viruseintritt in die Wirtszelle

Das virale Nukleokapsid wird nach Adsorption des infektiösen Virus an die Wirtszelle und nach Fusion der Zell- und Virusmembran ins Zytoplasma eingeschleust (Penetration). Voraussetzung für die Adsorption ist ein Sialinsäure-haltiger Rezeptor (Sialorezeptor) an der Zelloberfläche, an den das Virus über das HN-Protein bindet. Für die Fusion mit der Zellmembran muss das F_0 -Protein durch extrazelluläre Proteasen des Trypsin-Typs in die Untereinheiten F_1 und F_2 gespalten worden sein (Ohuchi & Homma, 1976). Erst dann kann der hydrophobe Teil der F_1 -Untereinheit mit der Zellmembran interagieren und die Fusion einleiten. Eine so genannte F_{mut} -Variante des F-Proteins verfügt über ein verändertes Spaltstellenmotiv, das von Furin, einer Subtilisin-ähnlichen Protease, die im Golgi-Apparat vieler Zellen vorkommt, erkannt wird (Heminaway et al., 1995, Klenk & Garten, 1994). Daher kann das F_{mut} -Protein ohne die Anwesenheit von Acetyl-Trypsin aktiviert werden.

2.4.2. Transkription des Genoms

Die Synthese der viralen Komponenten findet im Zytoplasma der infizierten Zellen statt. Da das Genom in Negativorientierung vorliegt, werden die Gene zunächst von der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) in mRNA umgeschrieben. Die RdRp besteht aus dem L-Protein, das mit einem P-Homotetramer verbunden ist und gelangt zu Beginn der Infektion als Bestandteil des Nukleokapsids in die Zelle (Abb. 3).

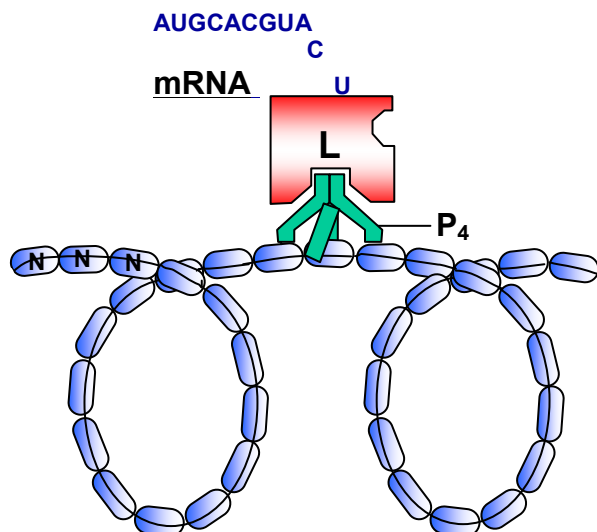


Abb. 3: Transkriptions-Modell. Der Polymerase-Komplex, bestehend aus L- und P-Protein, läuft entlang der mit N-Proteinen verpackten RNA und synthetisiert mRNA.

Die Transkription beginnt am 3'-Ende des Genoms, dem *leader*. Nachfolgend werden die Gene einzeln transkribiert, wobei jede mRNA mit einer 5'-Cap-Struktur versehen und am 3'-Ende polyadenyliert wird. Die zwischen den Genen liegenden intergenen Tripletts werden von der RdRp übersprungen. Dabei bleibt die RdRp aber mit dem Nukleokapsid verbunden und beginnt bei der nachfolgenden Genstart-Sequenz erneut mit der Transkription. Da es bei diesem Ablauf auch zu einer Dissoziation der Polymerase vom Nukleokapsidcore kommen kann werden die Gene Richtung 5'-Ende des Genoms zunehmend seltener transkribiert wodurch ein Transkriptionsgradient entsteht (Abb. 4) (Homann et al., 1990). Weitere Mechanismen die zu diesem Transkriptionsgradienten beitragen sind Abweichungen von bestimmten Konsensussequenzen und das so genannte *Phasing*. Für die intergenen Tripletts und die Genstart- & Genstop-Sequenzen existieren hochkonservierte Konsensussequenzen. Abweichungen von diesen, wie sie im Genstart des F-Gens und sowohl im intergenen Tripletts vor dem als auch im Genstart des L-Gens vorkommen, führen zu einer verringerten Transkriptionsrate (He & Lamb, 1999, Kato et al., 1999). Für das *Phasing* muss das Genom, gemäß der Besetzung mit N-Proteinen, in Blöcken von je sechs Nt betrachtet werden (2.2). Mit Ausnahme des L-Gens beginnt die Transkription jedes Gens mit der ersten Base eines Sechserblocks. Die Dissoziationsrate der RdRp vom *template* scheint im Falle der F- und L-Gene durch diesen „verschobenen“ Genstart nach unten reguliert zu sein (Glazier et al., 1977).

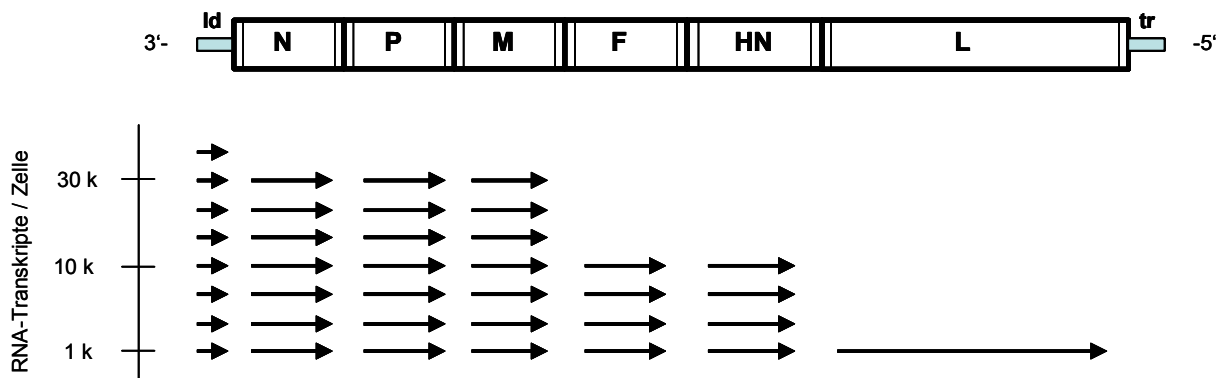


Abbildung 4: Anzahl an leader- und mRNA-Transkripten der SeV Gene. Schematisches wt-Genom mit allen sechs Genen und dem *leader* (ld) und dem *trailer* (tr). Die jeweilige Menge an Transkripten (Pfeile) ist in Tausenden (k) pro infizierter Zelle angegeben.

2.4.3. Replikation des Genoms

Um neue Virusgenome mit negativer Polarität herzustellen, werden zunächst Antigenome (AG) gebildet, die dann als Matrizen für die Bildung neuer Genome dienen. Für den Prozess der Replikation sind wie für die Transkription die Proteine N, P und L verantwortlich. Die RNA-

Synthese startet am 3'-Ende des Genoms wobei der wachsende RNA-Strang direkt mit N-Proteinen „verpackt“ wird (Abb. 5). Der Wechsel der Polymeraseaktivität von Transkription zu Replikation wird mit der Menge an freien N-Proteinen, in Form von N⁰-P-Komplexen, in Verbindung gebracht. Erst wenn ausreichend N-Proteine synthetisiert worden sind, können diese mit dem Transkript des *leaders* interagieren und verhindern so einen Abbruch der Transkription an den Regulationssequenzen (Vidal & Kolakofsky, 1989). Nachdem ein AG, über seine ganze Länge mit N-Protein komplexiert, vorliegt, kann dieses als Matrize zur Herstellung von Genomäquivalenten dienen. Diese werden ebenfalls direkt mit N-Proteinen verpackt.

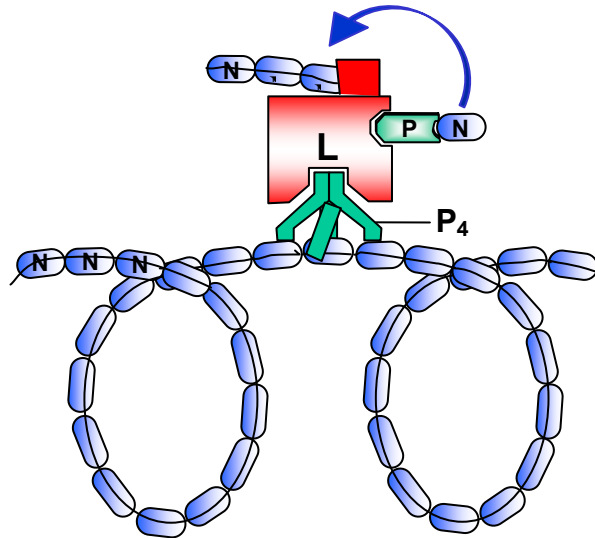


Abb. 5: Replikations-Modell. Der Polymerase-Komplex, bestehend aus L- und P-Proteinen synthetisiert neue genomische RNA, die mit N-Proteinen assoziiert wird.

2.4.4. Virusassembly und Virusausschleusung

Durch die Genom-Replikation werden durch die steigende Anzahl an mRNAs zunehmend virale Proteine synthetisiert. Die Bindung von Nukleokapsiden an virale Oberflächenproteine erfolgt wohl bereits an der intrazellulären Membran des Golgi-Apparates (Sanderson et al., 1993). Die viralen Transmembranproteine HN und F, die während ihrer Glykosylierung über das Endoplasmatische Retikulum zum Golgi-Apparat gelangen, interagieren über die zytoplasmatische Domäne mit dem M-Protein. Das M-Protein wiederum bindet Nukleokapside über das N-Protein und fungiert so als Mediator zwischen den viralen Glykoproteinen und dem Nukleokapsid (Stricker et al., 1994). Man nimmt an, dass das M-Protein einen entscheidenden Einfluss auf die gleichmäßige Verteilung der gesamten viralen Proteinkomplexe in der Membran hat und dass der Komplex aus Nukleokapsid und viralen Proteinen, in Form eines sekretorischen Vesikels dem exocytotischen Weg folgend, zur Membran transportiert wird (Doms et al., 1993). Dort kommt es zur Ausstülpung der Zellmembran und zur Knospung der Viren. Allerdings ist der Vorgang der Virusfreisetzung im Detail noch weitgehend ungeklärt. Auf der Zelloberfläche sind Sialinsäuren durch die Neuraminidase-Aktivität

des HN-Proteins von den Rezeptoren abgespalten, wodurch eine Reinfektion der Zelle durch das Sendai Virus verhindert wird. Somit kann sich das Virus, ohne von Sialorezeptoren gebunden zu werden, von der Zelle ablösen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein viraler Vektor auf Basis des Sendai Virus (SeV) konstruiert werden, der durch Deletion des N-Gens replikationsinkompetent wird. Zur Vermehrung dieses Konstrukts sollten transkomplementierende Helferzellen eingesetzt werden. Darüber hinaus sollte eine normalerweise durch das SeV ausgelöste Apoptoseantwort in infizierten Zellen unterdrückt werden.

Nachfolgend soll zunächst ausführlich auf das N-Protein mit seinen Funktionen und Interaktionspartnern sowie auf das zytopathogene Potenzial des SeV eingegangen werden.

2.5. Zytopathogenität des SeV

Ein geringes zellschädigendes Potenzial stellt eine wichtige Voraussetzung für den späteren Einsatz eines viralen Vektors dar. Da viele Virusinfektionen den Tod ihrer Wirtszellen nach sich ziehen, muss bei der Entwicklung eines viralen Vektors dessen Zytopathogenität zunächst beurteilt und gegebenenfalls versucht werden diese zu reduzieren. Die zellschädigende Wirkung eines Virus kann sich über verschiedene Wege manifestieren. Im Falle des SeV ist der dominierende Effekt ein Absterben der infizierten Zelle.

2.5.1. Apoptose-Induktion durch das Sendai Virus

Obwohl das Sendai Virus als ein nicht-humanpathogener Vertreter der Paramyxoviren gilt, ist es in der Lage eine Vielzahl von menschlichen Zellen in Kultur zu infizieren und nachfolgend zu schädigen. Wie viele andere Vertreter dieser Virusfamilie, z.B. das Respiratorische Syncytialvirus (O'Donnell D et al., 1999), das Masernvirus (Servet-Delprat et al., 2000) oder das Newcastle Disease Virus (Lam, 1996), kann das SeV eine Apoptoseantwort in Zellen induzieren (Bitzer et al., 1999, Tropea et al., 1995).

Im Rahmen der Vektorentwicklung wurde bereits in einer früheren Arbeit eine Mutante (Fctr48z) entwickelt, die einen reduzierten zytopathischen Effekt (CPE) auslöst und infizierte Zellen, abhängig vom Zelltyp, deutlich weniger belastet (Wiegand et al., 2005). Die Mutante Fctr48z besitzt einen Austausch der ersten 48 Nukleotide des Genoms des SeV Stammes Fushimi (F) gegen die äquivalente, antigenomische Sequenz des SeV Z Stammes. In diesem Bereich befinden sich wichtige Promoterkomponenten für Replikation und Transkription. Während Infektionen mit einer ähnlichen Mutante, auf Basis des Stammes Z, konnte bereits eine vollständige Aufhebung von Apoptose erreicht werden (Garcin et al., 1998). Das Zustandekommen dieser Unterdrückung von Apoptose

wurde mit einer Wechselwirkung zwischen der exprimierten, mutierten viralen *leader*-RNA und dem zellulären TIAR-Protein (*T-cell activated intracellular antigen-related protein*) in Verbindung gebracht (Iseni et al., 2002). Dabei bindet die RNA an TIAR, wodurch dieses keine Apoptose-induzierende Aktivität mehr entfalten kann.

Während die Beteiligung von TIAR an der Auslösung von Apoptose während Infektionen mit dem SeV Z-Stamm beschrieben wurde, konnte in Infektionsstudien mit dem SeV F-Stamm die Aktivierung von Caspasen festgestellt werden (Bitzer et al., 2002, Bitzer et al., 1999). Die Funktionen verschiedener Caspasen innerhalb der Apoptose-Kaskade sind bereits gut erforscht. Inwieweit TIAR in eine Caspase-abhängige Aktivierung von Apoptose involviert ist und an welcher Stelle des Signalwegs es eventuell eingreift ist bislang unbekannt. Ob es sich bei diesen Beobachtungen also um SeV Stamm-spezifische Eigenschaften handelt oder ob die Reaktion auf eine Infektion unter verschiedenen Zelltypen variiert, kann gegenwärtig nicht beantwortet werden. Denkbar wäre auch ein gleichzeitiges Vorhandensein von zwei verschiedenen Apoptose-auslösenden Mechanismen, die möglicherweise miteinander in Verbindung stehen.

Im Hinblick auf eine vielseitige, medizinische Anwendbarkeit eines viralen Vektors mit geringem zytopathischem Potenzial erschien eine genauere Untersuchung dieser Fragestellungen von großer Bedeutung.

2.5.2. Induktion einer CTL-Antwort durch das SeV N-Protein

Neben den Funktionen bei Replikation und Transkription, kommt dem N-Protein während SeV-Infektionen eine besondere Bedeutung bei der Interaktion mit dem Immunsystem zu. Nachfolgend soll diese im Kontext einer Vektorentwicklung beschrieben werden.

Zytotoxische T-Zellen (CTL) erkennen auf der Zelloberfläche an MHC-I-Molekülen (*major histocompatibility complex class I*) gebundene Peptide, die von intrazellulär degradierten Proteinen stammen (Townsend et al., 1986). Im Falle einer Virusinfektion werden über diesen Weg Peptide viraler Proteine auf der Zelloberfläche präsentiert, worauf die Zelle von den Komponenten des Immunsystems als infiziert erkannt und bekämpft werden kann. Virusspezifische CTLs stellen eine Hauptkomponente bei der Bekämpfung vieler Virusinfektionen dar (Byrne & Oldstone, 1984, Kast et al., 1986, Lin & Askonas, 1981, Sethi et al., 1983). Obwohl ein Virus aus mehreren Proteinen besteht, die jeweils in viele Peptide zerlegt werden können, sind normalerweise nur sehr wenige Epitope in eine CTL-Antwort involviert. Dieses als Immundominanz bezeichnete Phänomen hängt u.a. mit der Menge eines Proteins innerhalb der Zellen und der Effektivität seiner Degradierung zusammen (Bergmann et al., 1994, Eisenlohr et al., 1992, Yewdell & Bennink, 1992). Für SeV Infektionen konnte gezeigt werden, dass sich eine Immunantwort mit CD8-positiven CTLs

hauptsächlich gegen ein Epitop des N-Proteins richtet, das den As 324-332 entspricht (Cole et al., 1994, Kast et al., 1991).

Wie unter 2.5.1 bereits ausgeführt, sollte ein viraler Vektor möglichst geringen Schaden in transduzierten Zellen anrichten. Als weitere Voraussetzung für den medizinischen Einsatz eines Vektors muss dieser in seiner Zielzelle ausreichend lange im Organismus verbleiben, um seine Wirkung, z.B. die Expression eines therapeutischen Gens, entfalten zu können. Eine schnelle und starke Immunantwort, die die transduzierte Zelle zerstört, würde die Wirksamkeit eines Vektors deutlich einschränken. Daher wäre es sinnvoll, die kodierende Sequenz des immundominanten Peptids aus dem N-Protein, gegen das sich eine Immunantwort von SeV-spezifischen CTLs vorrangig richtet, zu entfernen.

Die Verringerung der Zytopathogenität und der Immunantwort eines viralen Vektors sollen seinen längeren Verbleib in Zellen und im Organismus zur Folge haben, damit er das kodierte therapeutische Gen ausreichend exprimieren kann. Allerdings soll dieser längere Verbleib des Vektors nicht dazu führen, dass sich das Virus unkontrolliert vermehrt und im Organismus ausbreitet. Daher müsste ein idealer Vektor als weiteren Sicherheitsfaktor, neben den hier aufgezählten, eine Replikationsdefizienz besitzen, so dass eine unkontrollierte Ausbreitung im Organismus unmöglich ist. Dass der Angriffspunkt für die Erzeugung einer Vermehrungsinkompetenz des SeV-Vektors das N-Gen sein sollte, wird im Folgenden detailliert durch die Beschreibung der Funktionen und der Bedeutung des N-Proteins erläutert.

2.6. Das Nukleokapsidprotein (N)

Das N-Gen sitzt an der ersten Position des SeV Genoms und wird gemäß dem Transkriptionsgradienten am stärksten exprimiert. Da dem N-Protein als Bestandteil des Replikationskomplexes bei der Vermehrung von SeV eine zentrale Bedeutung zukommt, es zugleich aber unbedeutend für die virale Transkription ist (Lamb & Kolakofsky, 2001), stellt es ein geeignetes Ziel dar, um durch vollständige oder partielle Deletion dieses Gens einen replikationsdefizienten Vektor zu erschaffen. Um eine solchen, vermehrungsinkompetenten viralen Vektor dennoch in ausreichender Menge für eine medizinische Anwendung herstellen zu können, muss ein geeignetes Helfersystem zu seiner Amplifikation verwendet werden. Ein hierzu geeigneter Ansatz könnte eine Transkomplementation des Gen-deletierten Vektors in speziellen Helferzellen, die stabil oder transient virale Komponenten synthetisieren, darstellen.

Nachfolgend soll die Tauglichkeit eines SeV-Vektors, dessen Replikationsdefizienz auf Deletionen im N-Gen beruht, anhand der verschiedenen Funktionen des N-Proteins erörtert werden. Dabei soll auch auf quantitative und qualitative Voraussetzungen für eine Vermehrung der Vektorkonstrukte mit Hilfe eines Helfersystems eingegangen werden.

2.6.1. Funktionen und Struktur des N-Proteins

Das N-Protein besteht aus 524 As mit einer Masse von ca. 60 kDa und erfüllt sowohl strukturelle als auch funktionelle Aufgaben. Als Proteinkomponente des Nukleokapsids (NC) verpackt das N-Protein die genomische RNA, wobei je sechs Nt von einem N-Protein besetzt werden (Calain & Roux, 1993, Kolakofsky et al., 1998). Die mit den N-Proteinen verpackte RNA nimmt eine linksgewundene, helikale Struktur an und stellt das *template* für Transkription und Replikation dar. Die aus einem L-Protein und einem Homotetramer des P-Proteins bestehende RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) interagiert mit dem *template* über eine N-P-Wechselwirkung – bezeichnet als N^{NC} -P. Während der viralen Genom-Replikation tritt das N-Protein im Komplex mit dem P-Protein (N^0 -P-Komplex) als frei im Zytoplasma vorhandenes Substrat auf (Homann et al., 1991), das von der RdRp verwendet wird, um neu synthetisierte genomische oder antigenomische RNA zu verpacken. Bei dem Zusammenbau neuer Viruspartikel wird eine Interaktion zwischen M-Proteinen und im NC vorliegenden N-Proteinen (N^{NC}) angenommen (Blumberg et al., 1984).

Strukturell scheint das N-Protein aus zwei großen Bereichen zu bestehen. Die ca. 400 N-terminalen As bilden einen globulären Körper mit vorrangig hydrophoben Bereichen, deren Sequenz einen hohen Konservierungsgrad unter N-Proteinen verwandter Arten aufweist. Im Gegensatz dazu besitzt der C-terminale restliche Anteil nur eine geringe Sequenzkonservierung und besteht aus vielen geladenen As-Resten. Werden Nukleokapside einem Trypsin-Verdau unterzogen kommt es zu einer Abspaltung des C-terminalen Anteils des N-Proteins wobei das restliche, ca. 48 kDa große, Proteinfragment die verpackte RNA noch ausreichend vor einer Nukleasezersetzung abschirmen kann (Kingsbury & Darlington, 1968). Dieser Hinweis, dass der N-terminale Anteil alle strukturellen Voraussetzungen für die Verpackung von RNA enthält, konnte in Studien mit N-Deletionsvarianten, die auf ihre Fähigkeit, in Zellen NC-ähnliche Strukturen ohne weitere virale Komponenten auszubilden, untersucht wurden, bestätigt werden. Dabei wurden die N- und die C-terminale Domänen des N-Proteins sukzessive mit ca. 20-40 As großen Deletionen versehen und auf ihre Fähigkeit zur Bildung von NC-ähnlichen Strukturen überprüft. Während alle Mutationen der ersten Domäne die NC-Bildung verhinderten, blieben die Mutationen in der C-terminalen Domäne ohne Auswirkung (Buchholz et al., 1993). Die N-terminale Domäne verfügt daher über Bereiche, die für eine Wechselwirkung zwischen N-Proteinen untereinander im NC (N^{NC} - N^{NC}) und N-Proteinen mit der RNA (N^{NC} -RNA) von essentieller Bedeutung sind.

Als nächstes sollen die funktionellen Bereiche des N-Proteins in Bezug zu der viralen Transkription und Replikation gesetzt werden.

2.6.2. Das N-Protein während der Transkription

Als strukturelle Proteinkomponente des Nukleokapsids (NC) nimmt das N-Protein (N^{NC}) während der viralen Transkription eine wichtige Rolle ein, da es zusammen mit der viralen RNA das *template* darstellt und über die Bindestelle für die virale Polymerase (RdRp) verfügt. Die Analyse von NC aus N-Deletionsmutanten in einem zellfreien *in vitro*-System zeigte, dass Deletionen mit einer Größe von ca. 50 Nt innerhalb der C-terminalen Domäne eine *template*-Funktion des NC außer Kraft setzen (Curran et al., 1993). In Kosedimentationsstudien wurde die Komplexbildung zwischen NC-ähnlichen Partikeln aus partiell deletierten N-Proteinen und P-Proteinen untersucht. Dabei ließ sich der Bereich für eine reine N^{NC} -P-Wechselwirkung auf die As 440-524 eingrenzen (Buchholz et al., 1994). In einer späteren genaueren Kartierungsstudie der C-terminalen 124 As konnten die As 462-471 des N^{NC} als Bindestelle für die RdRp bestimmt werden (Cevik et al., 2004). Dieser Bereich des N-Proteins ist also essentiell für eine Wechselwirkung mit der RdRp, die sowohl bei der Transkription, als auch bei der Replikation zustande kommen muss.

Weitere Untersuchungen zur viralen Transkription wurden auf Basis eines *in vitro*-Systems angestellt. Dabei wurden die SeV N-, P- oder L-Proteine, die aus Extrakten transfizierter Zellen gewonnen wurden, mit gereinigten Ribonukleoproteinen (RNP = mit N-Proteinen verpackte genomische RNA) inkubiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Kombination aus RNP und Polymerase, aus P- und L-Proteinen, ausreicht, damit Transkription stattfinden kann (Curran et al., 1992). Auf diesem Wissen baute die vorliegende Arbeit auf.

Ob das N-Protein während der viralen Transkription *in vivo*, d.h. im Kontext der infizierten Zelle, noch zusätzliche Funktionen erfüllen muss, ist mit den bisher zur Verfügung stehenden Testsystemen nicht abschließend zu beantworten. Da in dem *in vitro*-Testsystem Zellextrakte eingesetzt werden, die die viralen Proteine N, P oder L enthalten, sollten zumindest die löslichen zellulären Komponenten enthalten sein. Trotzdem muss die Frage nach zusätzlichen Funktionen des N-Proteins bei der viralen Transkription sorgfältig untersucht werden. Mit Hilfe der geplanten Virusmutanten können die Modellvorstellungen zur Funktion des Polymerasekomplexes von Paramyxoviren erstmals unter natürlichen Bedingungen überprüft werden. Die zu erwartenden Antworten sind für die Entwicklung eines entsprechenden Vektors essentiell und für die Grundlagenforschung von höchstem Interesse.

2.6.3. Das N-Protein während der Replikation

Das N-Protein übernimmt bei der Replikation einige Funktionen, wovon manche identisch zur Transkription sind. So liegt die, bereits bei der Transkription beschriebene, Bindestelle für die Polymerase an das RNP bei der Replikation an der gleichen Stelle (Cevik et al., 2004). Grundvoraussetzung für die Replikation ist jedoch eine Verpackung des neu entstehenden Genoms

mit N-Proteinen zu einem funktionellen RNP, wobei das N-Protein innerhalb des RNP mit benachbarten N-Proteinen interagiert (Buchholz et al., 1993). Für die Verpackung von neu synthetisierter genomischer und antigenomischer RNA verwendet die RdRp das N-Protein in Form des frei im Zytoplasma vorhandenen N⁰-P-Komplexes als Substrat (Horikami et al., 1992). Der für die P-Bindung verantwortliche Bereich des N-Proteins konnte auf die in der C-terminalen Domäne befindlichen As 472-491 eingegrenzt werden (Cevik et al., 2004).

Ein für die Replikation funktionierendes RNP beruht nicht ausschließlich auf einer Verpackung der RNA mit N-Proteinen, sondern auch auf der Funktionalität dieser N-Proteine. *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zur Ausbildung und zur Funktionalität von NC konnten dazu einige essentielle Bereiche aufdecken. Die Region von As 114-129 des N-Proteins verfügt über geladene As, die in verschiedenen Ansätzen gegen Alanin ausgetauscht wurden. Alle Mutanten unterstützten *in vitro*, in einem Zell-freien System, eine Verpackung von RNA zu RNP. Dagegen fehlt diesen Proteinen die Funktionalität bei der Replikation. In einem Zell-basierten *in vivo*-System fand jedoch trotz Bindung der Polymerase an diese Nukleokapside keine Amplifikation statt. Der vorliegende Defekt könnte demnach mit einer geänderten Konformation der N-Proteine zusammenhängen, die sich auf die Stabilität der N^{NC}-RNA oder der N^{NC}-N^{NC}-Interaktion negativ auswirkt (Myers & Moyer, 1997).

Ein weiterer, hoch konservierter Bereich von As 362-371 des N-Proteins wurde mittels As-Austausch-Mutationen auf eine Zell-freie *in vitro*-Replikation und auf Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht. Verschiedene N-Mutanten wiesen unterschiedliche Phänotypen auf, die alle mit einer gestörten N^{NC}-RNA-Bindung oder N^{NC}-N^{NC}-Wechselwirkung zusammenhingen, wodurch die Funktion des NC als *template* unterdrückt wurde (Myers et al., 1999).

Weitere für die Replikation essentielle funktionelle Regionen des N-Proteins konnten innerhalb der C-terminalen Domäne gefunden werden. In *in vitro*- und *in vivo*-Replikationsstudien wurden verschiedene C-terminal trunke N-Proteine auf ihre Fähigkeit eine Amplifikation von SeV-DIP-Genomen zu unterstützen getestet. DIP-Genome verfügen im Gegensatz zu vollständigen SeV-Genomen über keine SeV-Strukturgene und kodieren daher selbst für kein Protein. Aus diesem Grund basiert eine Genom-Replikation in diesem System ausschließlich auf den „von außen“ zugeführten viralen Proteinkomponenten. Für die *in vitro*-Versuche wurden Extrakte transfizierter Zellen, die P-, L- und wt-N- bzw. mutierte N-Proteine enthielten, mit DIP-RNPs inkubiert. Bei den *in vivo*-Untersuchungen wurden Zellen mit Plasmid-DNA für die P-, L- und wt-N- bzw. mutierten N-Proteine zusammen mit der cDNA der DIP-Genome transfiziert. Beide Ansätze wurden anschließend auf die Bildung neuer DIP-RNPs untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich die Deletion der C-terminalen 33 As eine DIP-Genomvermehrung zuließ. Während *in vivo* alle weiteren C-terminalen Deletionen von As 491-439 zu keiner Replikation führten, konnten *in vitro* Mutanten mit Deletionen bis As 481 und 471 noch eine reduzierte Aktivität aufweisen (Cevik et al.,

2004). Als Voraussetzungen für eine funktionierende Replikation wurden diese N-Proteinmutanten in weiteren Studien auf ihre Fähigkeit zu einem *self-assembly* zu NC-ähnlichen Strukturen und einer anschließenden Bindung der RdRp untersucht. In einer Zusammenfassung aller Ergebnisse können die funktionellen Bereiche für die N⁰-P, die N^{NC}-RdRp und die N^{NC}-N^{NC}-Interaktionen des N-Proteins den in Abb. 6 aufgeführten Bereichen der C-terminalen Domäne des N-Proteins zugewiesen werden. Da eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus den *in vitro*-Studien und den der *in vivo*-Studien auftrat, letztere jedoch das weniger artifizielle System darstellen, basieren die angegebenen Bereiche hauptsächlich auf den *in vivo*-Ergebnissen.

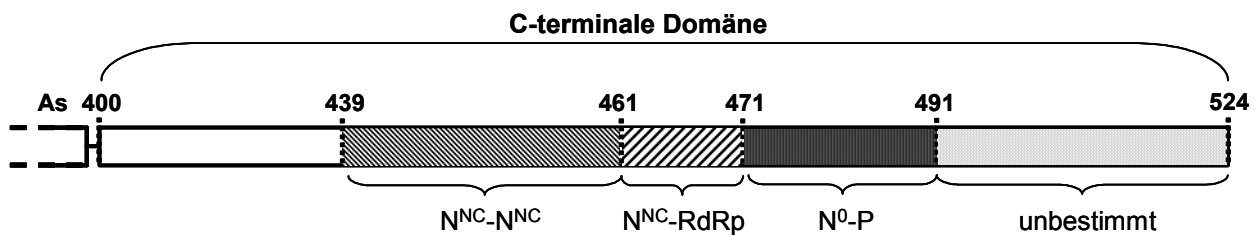


Abb. 6: Funktionelle Bereiche der C-terminalen Domäne des N-Proteins. Angabe der Interaktionspartner als N^{NC} (= N-Protein im Nukleokapsid), N⁰ (= freies N-Protein im Zytoplasma), P (= P-Protein) und RdRp (= Polymerasekomplex aus P- und L-Proteinen).

Obwohl das N-Protein und viele seiner Funktionen bereits gut erforscht sind, erfüllt es möglicherweise noch weitere Aufgaben während der viralen Transkription und/oder Replikation. Für das P-Protein konnte z.B. gezeigt werden, dass *in vitro* N-P- und P-L-Komplexe aus Zellextrakten für eine Replikation ausreichen (Horikami et al., 1992). Ein großer Überschuss an P-Protein förderte jedoch eine ergänzende Rolle des P-Proteins ans Tageslicht; es konnte eine Steigerung der Transkriptionsleistung um das Zweifache erreicht werden (Curran, 1996). Nach erstmaliger Verwendung von replikationsdefizienten SeV-Mutanten mit P-Gendeletionen – aber ansonsten vollständigem SeV-Genom – für die Infektion von Zellen ergab sich jedoch ein modifiziertes Bild für die SeV-Transkription, verglichen mit den *in vitro*-Ergebnissen. Während eine SeV-Mutante mit vollständiger Deletion des P-Gens (SeV Δ P) zu keiner detektierbaren Transkription mehr in der Lage ist, ermöglicht eine nur partielle Deletion der As 2-77 des P-Proteins (SeV P Δ 2-77), in einer weiteren Mutante, eine starke Transkriptionsaktivität (Schlecht, 2004). Dadurch wird deutlich, dass für eine SeV-Transkription *in vivo* eine Neusynthese von P-Protein oder zumindest des Rumpf-P-Proteins P Δ 2-77 für eine Transkription notwendig ist.

Aufgrund der beschriebenen zentralen Aufgaben des N-Proteins bei der viralen Replikation eignet sich dieses Protein sehr gut als Ziel, um durch Mutation eine sichere Replikationsdefizienz von Vektorkonstrukten zu erzielen. Da bereits viele funktionelle Bereiche hinreichend genau kartiert sind, wären neben einer Deletion des vollständigen Gens möglicherweise auch partielle Deletionen

ausreichend, um eine Replikation des Vektors zu verhindern. Dadurch könnten möglicherweise andere Funktionen des N-Proteins, die nicht essentiell für die Replikation sind, weiter ausgeführt werden und so die Funktionalität des Vektors verbessert werden. Zu beachten ist dabei jedoch immer, dass alle bisherigen Kartierungen auf Untersuchungen in mehr oder weniger artifiziellen Systemen beruhen. Wie gerade am Beispiel der Replikation beschrieben, können deutliche Abweichungen zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen auftreten. Darüber hinaus können sich *in vivo*-Systeme auch deutlich voneinander unterscheiden, je nachdem ob DIP-Genome, die keine viralen Gene kodieren, oder vollständige bzw. nur partiell deletierte SeV-Genome (z.B. SeV Δ P) eingesetzt werden, die zumindest für einige virale Proteine kodieren und dadurch selbst Proteine zum System beisteuern können. Alle bisherigen Untersuchungen zur Transkription von SeV basieren ausschließlich auf dem *in vitro*-System.

2.7. Herstellung eines replikationsdefizienten SeV-Vektors mit geringem zytopathischem Potenzial

Die Replikationsdefizienz des SeV-Vektors sollte durch eine Deletion des viralen N-Gens erreicht werden. Auf diese Weise könnte ein N-Gen-defizientes Virus (Δ N) nach Infektion der Zielzelle keine RNA-Genome mit N-Proteinen zu Nukleokapsiden mehr verpacken. Manifestiert werden sollte die entsprechende Genommutation auf der Ebene einer cDNA, die die virale Genomsequenz kodiert und in einem Zellkultursystem eingesetzt werden kann, um Viruspartikel initial herzustellen. Da eine Neusynthese des N-Proteins für die virale Transkription nicht von Bedeutung ist und die für die virale Polymerase kodierenden P- und L-Gene in einem SeV Δ N-Konstrukt noch vorhanden sind, kann eine gut funktionierende Expression der im Virusgenom befindlichen Gene erwartet werden. Neben der Replikationsdefizienz sollte der virale Vektor die Möglichkeit zur Insertion eines beliebigen Transgens in sein Genom bieten, das später in Zielzellen effizient exprimiert und seine Wirkung entfalten können soll. Für eine Transgeninsertion sollte eine zusätzliche zunächst leere virale Transkriptionskassette (TRKA) mit allen notwendigen Regulationsbereichen für die virale Transkription eingefügt werden. Über in die TRKA eingebaute Restriktionsschnittstellen sollte eine unkomplizierte Transgeninsertion ermöglicht werden. Um später gemäß dem Transkriptionsgradienten eine starke Transgenexpression zu erzielen, sollte diese TRKA an der ersten Position im Genom, anstelle des N-Gens, eingesetzt werden.

Für die rekombinante Herstellung von SeV in Zellkultur konnte vor ca. zehn Jahren ein System etabliert und in der Folgezeit optimiert werden (Garcin et al., 1995, Leyrer et al., 1998). Das Prinzip des Systems beruht auf der Transkription einer cDNA mit der Sequenz des viralen Genoms und der zeitgleichen Expression der Gene der Proteine des Polymerasekomplexes und des NC. Da die SeV-Replikation im Zytoplasma stattfindet, sind die zu exprimierenden Sequenzen auf den Plasmiden

von T7-Kontrollsequenzen für eine Transkription durch die T7-Polymerase flankiert. In dem herkömmlichen System werden HeLa-Zellen mit der Plasmid-DNA transfiziert und mit einem Vaccinia-Helfervirus (MVA-T7) infiziert, das für die T7-Polymerase kodiert. Auf diese Weise werden in der Zelle zunächst antigenomische virale RNA und die SeV-Proteine N, P und L hergestellt. Das korrekte 5'-Ende des Antigenoms wird durch einen exakten Beginn der Polymerase am ersten Nt sichergestellt. Das korrekte 3'-Ende wird durch eine genau am Ende des viralen Genoms in die cDNA eingefügte Ribozymsequenz (aus Hepatitis-Delta-Virus), die sich autokatalytisch aus der RNA herausschneidet, erzeugt. Der Antigenomstrang kann nun durch die N-Proteine zu einem RNP verpackt werden und anschließend mit den P- und L-Proteinen zu einem funktionellen Replikationskomplex assoziieren. Dieses *template* wird in ein genomisches Nukleokapsid repliziert von dem dann sowohl die viralen Gene transkribiert als auch neue Antigenome abgelesen werden. Da auf dem viralen Genom auch alle anderen viralen Gene kodiert sind, kann der normale Replikationszyklus des SeV mit *assembly* und Ausschleusung von VP ablaufen.

Eine erst kürzlich in dieser Arbeitsgruppe eingeführte Modifikation des *virus rescue* basiert auf BSR-T7-Zellen, die das stabil in ihr Genom integrierte Gen der T7-Polymerase exprimieren (Schurig, 2005). Auf diese Weise kann auf die Verwendung der stark zytotoxischen Vaccinia-Viren verzichtet werden. Wie in Abb. 7 angegeben, werden analog zu dem oben beschriebenen System Plasmide mit der cDNA des Genoms und den Genen der N-, P- und L-Proteine transfiziert. Für die initiale Herstellung von SeV-wt-Partikeln konnte mit Hilfe dieses neuen Systems eine um Faktor 10000 gesteigerte Virusmenge erzielt werden.

Für die initiale Herstellung des in der vorliegenden Arbeit zu entwickelnden replikationsdefizienten SeV-Vektors (SeV Δ N) sollten beide Systeme verglichen und das effizientere im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet werden. Da von der SeV Δ N-Mutante keine N-Proteine synthetisiert werden können, müssen die Bedingungen für einen erfolgreichen *rescue* im Vergleich zu einem SeV-wt-*rescue* sicherlich geändert und optimiert werden. Dabei wäre ein zusätzlicher Bedarf an N-Proteinen zu erwarten, der durch eine erhöhte Bereitstellung von Plasmid-DNA mit SeV N-Genen gedeckt werden könnte.

Könnten SeV Δ N-Partikel mit der zunächst leeren TRKA im *rescue* hergestellt werden, sollte als nächstes ihre biologische Funktionalität überprüft werden. Elementar ist dabei die Überprüfung einer tatsächlich vorhandenen Replikationsdefizienz. Während Infektionen von SeV-permissiven Zellen darf keine Ausbreitung der Viren über die Kultur und keine Freisetzung von infektiösen VP festzustellen sein. Darüber hinaus muss die Funktion der leeren TRKA getestet werden, indem ein Transgen inseriert wird und dessen Expression verifiziert wird.

Im Anschluss müssten die initialen SeV Δ N-Partikel amplifiziert werden, um ausreichend Vektor-Partikel für die Durchführung verschiedener vorklinischer Studien zu erhalten. Dazu bedarf es eines Systems, das die im Virusgenom fehlende Komponente, das N-Gen, *in trans* anbietet. Da in dieser Arbeitsgruppe bereits stabil transfizierte Zelllinien existieren, die das N- und das P-Protein (LTK-460) oder das N-, das P- und das L-Protein (H29) synthetisieren, könnten zunächst diese Zellen für eine Vermehrung getestet werden. Da allerdings zu erwarten ist, dass eine große Menge an N-Protein während der SeV-Replikation benötigt wird, die H29-Zellen z.B. aber nur 5% der Menge an N-Protein verglichen mit einer SeV-wt-Infektion produzieren, ist nicht auszuschließen, dass diese Menge für eine SeV Δ N-Amplifikation zu gering ist. In diesem Fall müsste die Herstellung einer neuen, effektiveren Helferzelllinie, die eine größere Menge an SeV N-Protein stabil produzieren kann, erwogen werden. Würde sich herausstellen, dass das maximale biologische Expressionslimit von SeV N-Protein in stabil transfizierten Helferzellen nicht über die in H29-Zellen produzierte Menge gesteigert werden kann, müsste ein alternativer Weg zur Vermehrung von SeV Δ N gefunden werden.

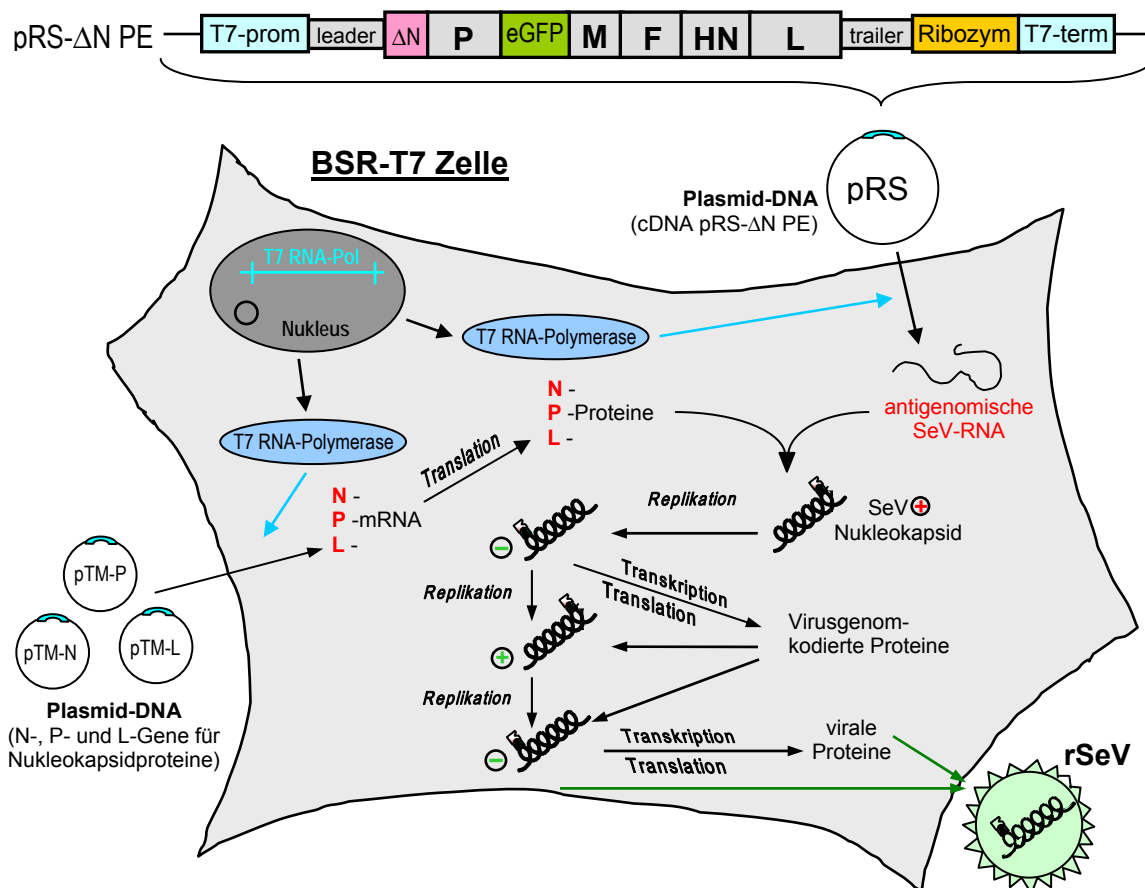


Abb. 7: BSR-T7-System zur Herstellung rekombinanter SeV am Beispiel des SeV Δ N PE.

Neben der Herstellung und der Vermehrung eines replikationsdefizienten SeV Δ N-Vektors, sollte seine Fähigkeit in möglichen Zielzellen ein gewünschtes Gen zu exprimieren überprüft und evaluiert werden. Da aufgrund des bisherigen Kenntnisstandes für eine Transkription von SeV nur die mit N-Proteinen verpackte genomische RNA und die Polymerasekomplexe aus P- und L-Proteinen nötig sind, sollten Gene von einem SeV Δ N-Vektor gut transkribiert werden. Würde sich das Fehlen von neu-synthetisiertem N-Protein jedoch wider Erwarten negativ auf die Transkriptionseffizienz auswirken, könnte versucht werden durch eine partielle Deletion des N-Gens eine N-Proteinvariante erzeugen, die eine Transkription zwar unterstützt, aber nach wie vor keine Replikation des Virus zulässt. Eine vergleichbare Situation wurde für SeV-Mutanten mit Deletionen im P-Gen beschrieben, wobei eine vollständige P-Deletion zu keiner detektierbaren Transkription führte während die Mutante SeV P Δ 2-77, die das P-Protein ohne die As 2-77 synthetisierte, eine starke Transkriptionsleistung aufwies (Schlecht, 2004).

Im Hinblick auf medizinische Applikationen ist ein geringes zytopathogenes Potential eines SeV-Vektors erstrebenswert. Daher sollte eine Charakterisierung und Bewertung der Zelltoxizität von SeV untersucht werden, um diese danach möglicherweise gezielt reduzieren zu können. Dazu sollte die bereits zuvor entwickelte Mutante Fctr48z, die Zelltyp-spezifisch einen reduzierten zytopathischen Effekt (CPE) auslöst (Wiegand et al., 2005), eingesetzt werden. Nachdem in den vorangegangenen Studien v.a. nicht-menschliche Zellen getestet worden waren, sollte nun zunächst eine mögliche CPE-Reduktion durch Fctr48z für ein größeres Spektrum von Humanzelllinien evaluiert werden. Studien mit SeV und SeV-Mutanten des Stamms Z deuteten auf ein möglicherweise geringeres zytopathisches Potenzial dieses Stamms hin (Garcin et al., 1998, Iseni et al., 2002). Da in dieser Arbeitsgruppe Stamms F verwendet wird, sollte untersucht werden, ob die zellschädigende Wirkung von SeV Stamm-spezifisch verschieden ist und auf welchen Mechanismen ein möglicher Unterschied beruht.

2.8. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung SeV-Mutanten ohne Replikationsfähigkeit bzw. mit geringem zytopathischem Potenzial, um diese als Gentransfer-Vektor im Bereich von Vakzinen oder Gentherapeutika einsetzen zu können.

Die Replikationsdefizienz sollte durch die Deletion des N-Gens, dessen Genprodukt die essentielle Proteinkomponente von SeV-Nukleokapsiden bei der Genomreplikation darstellt, erreicht werden. Um ein Transgen mit Hilfe des viralen Vektors in Zielzellen befördern und dort seine Expression ermöglichen zu können, sollte eine leere virale Transkriptionseinheit in das Genom des Vektors eingebaut werden, in die ein beliebiges Gen inseriert werden könnte. Nach initialer Herstellung von SeV-Vektorpartikeln müssten diese in einem geeigneten Vermehrungssystem, das eine

Transkomplementation der fehlenden viralen Komponente ermöglicht, amplifiziert werden. Dazu könnten bereits existierende stabil transfizierte Helferzellen eingesetzt werden, oder, falls diese eine Vermehrung nur unzureichend unterstützen, müssten neue Helferzellen oder ein System, das auf einer transienten Genexpression basiert, entwickelt werden. Anschließend sollte mit Hilfe eines in das virale Genom inserierten Reportergens die Effizienz einer Transgenexpression in Zielzellen überprüft und bewertet werden. Um das zytopathische Potenzial eines SeV-Vektors gezielt senken zu können, sollten mit Hilfe einer bereits bestehenden Mutante (Fctr48z) SeV-spezifische Mechanismen und Wege eine Zellschädigung auszulösen untersucht werden.

Um diese Ziele zu erreichen waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

- Herstellung des Genoms des replikationsdefizienten Vektors SeV Δ N PE mit einem eGFP-Transgen hinter dem P-Gen und einer leeren Transkriptionskassette, anstelle des N-Gens an Position 1 des Genoms, in Form einer cDNA
- Einsatz der SeV Δ N PE-cDNA in einem *virus rescue*-System zur rekombinanten Herstellung initialer SeV Δ N PE-Partikel und anschließende Optimierung der *rescue*-Bedingungen
- Verifizierung der Funktionalität der Transkriptionskassette und Nachweis der Vermehrbarkeit von SeV Δ N PE durch Koinfektion mit dem SeV-wt
- Nachweis der Replikationsinkompetenz von SeV Δ N PE in Zielzellen
- Test auf Vermehrbarkeit des SeV-Vektors mit Hilfe bereits existierender Helferzellen und gegebenenfalls Herstellung neuer, effizienterer Helferzellen oder Etablierung eines transienten Transkomplementationssystems zur Amplifikation des SeV-Vektors
- Charakterisierung der Transgenexpression in SeV Δ N PE-infizierten Zielzellen und gegebenenfalls Modifikation der N-Gendeletion zur Optimierung der Transgenexpression in Zielzellen
- Untersuchung und Charakterisierung des zytopathogenen Potenzials des SeV mit Fokus auf SeV-stammspezifische Eigenschaften und Induktion von Apoptose durch SeV

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines viralen Vektors auf Basis eines replikationsdefizienten Sendai Virus (SeV). Der Vektor sollte nach Infektion von Zellen eine effiziente Expression von Transgenen ermöglichen. Gleichzeitig sollte der Vektor selbst eine möglichst geringe zytopathische Wirkung auf die Zellen ausüben.

Im Gegensatz zu anderen Vektorkonstrukten, die Deletionen im P-Gen aufweisen (Schlecht, 2004), sollten in der vorliegenden Arbeit Abschnitte des N-Gens deletiert werden. Einerseits sollte der Vektor auf diese Weise seine Fähigkeit verlieren sich zu vermehren, andererseits sollte dadurch eine für einen Vektor mit medizinisch-therapeutischem Wirkungsspektrum kontraproduktive Eigenschaft entfernt werden. Für das N-Protein konnte nämlich gezeigt werden, dass der Bereich von As 324 – 332 sowohl Effektor- als auch Gedächtnis-T-Zellen in der Maus aktiviert (Cole et al., 1994).

Um diese Vektorkonstrukte rekombinant herstellen zu können mussten ihre Genome zunächst in Form von cDNA konstruiert werden. Diese soll anschließend in einem Zellkultursystem eingesetzt werden, um initiale Viruspartikel zu generieren.

Die nach initialer Herstellung meist in geringer Anzahl vorliegenden replikationsdefizienten Viruspartikel (VP) sollten über ein Helfersystem vermehrt werden, wofür verschiedene Ansätze in Frage kommen. Eine Transkomplementierung von N-Deletionsmutanten könnte durch eine transiente Transfektion erzielt werden, bei der aber nur ein Teil der Zellen das virale Gen exprimieren. Alternativ könnten Helferzellen eingesetzt werden, die die fehlende Komponente des Virus über ein stabil in ihr Genom integriertes Gen bereitstellen. Dafür könnten bereits früher in dieser Arbeitsgruppe hergestellte Helferzellen zum Einsatz kommen. Die Helferzelle H29, die N-, P- und L-Proteine stabil exprimiert, wurden bisher erfolgreich für die Vermehrung von SeV P-Deletionsmutanten eingesetzt. Da allerdings von unterschiedlichen Anforderungen für eine Transkomplementierung von N- im Vergleich zu P-Deletionsmutanten auszugehen ist, könnte auch die Herstellung einer neuen Helferzelllinie notwendig sein.

Ob das Vektorkonstrukt eine ausreichend hohe Transgenexpression gewährleistet, sollte anhand der Expression eines, in das Genom inserierten, eGFP-Gens analysiert werden. Im Falle einer als nicht ausreichend erachteten Expression sollte über Modifikationen der N-Deletion eine gesteigerte Expression erreicht werden.

Neben den Eigenschaften der Replikationsdefizienz und einer Transgenexpression, sollte ein viraler Vektor auch über ein höchstens geringes zytopathisches Potenzial verfügen. Für die Untersuchung der zellschädigenden Wirkung von SeV und möglicher Wege zu einer Reduktion sollte eine bereits in dieser Arbeitsgruppe hergestellte Mutante (SeV Fctr48z), die einen Zelltyp-spezifische Reduktion des zytopathischen Effekts (CPE) erzielen konnte (Wiegand, 2003), eingesetzt werden.

Begonnen werden sollte im Folgenden mit der Herstellung SeV-Konstrukts mit deletiertem N-Gen.

3.1. Herstellung der Virusmutante SeV Δ N

Ausgangspunkt für die Herstellung von SeV Δ N PE war die Klonierung der genomischen cDNA. Diese sollte dann im *virus rescue* eingesetzt werden um initiale VP zu generieren. Diese VP sollten anschließend auf ihre Funktionalität überprüft werden, d.h. dass das virale Konstrukt intakt ist und gleichzeitig inkompetent zu replizieren.

3.1.1. Herstellung der cDNA pRS Δ N PE und pRS Δ N PE F_{mut}

Für die Herstellung des cDNA-Konstrukts pRS Δ N PE sollte zunächst eine leere N-Transkriptionskassette (Δ N-TRKA) konstruiert werden, die dem N-Gen ohne den N-ORF entspricht. Diese Δ N-TRKA sollte anschließend in das Plasmid pRS P-EGFP anstelle des N-Gens gesetzt werden. Durch die Verwendung von pRS P-EGFP, das in dieser Arbeitsgruppe schon existierte, befand sich das eGFP-Gen bereits an der gewünschten Position hinter dem P-Gen. Das Vorhandensein einer leeren TRKA in dem Konstrukt sollte die Möglichkeit bieten später ein beliebiges Transgen, wie z.B. ein therapeutisches Gen, an dieser Position einsetzen zu können.

Für die Herstellung der Δ N-TRKA wurden zuerst mittels PCR zwei Fragmente basierend auf der Wildtyp-Sequenz von pRS-3Gg generiert (Abb. 8). Durch spezielles *primer*-Design entstand am Ende vom PCR-I-Produkt und am Anfang von PCR-II-Produkt ein Sequenz-überlappenden Bereich. Das PCR-I-Produkt (258 bp) besteht aus der Sequenz des T7-Promotors (T7-Pr), der *leader*-Sequenz (ld), dem N-Genstart (N-Gstr) mit dem 5'-UTR. Über den *reverse primer* 5NTR-N_Notrv wurde dahinter noch eine artifizienle Sequenz von dreizehn Nt mit einer *NotI*-Restriktionsschnittstelle und zehn Nt des 3'UTR angehängt (s. rote Markierung).

Das PCR-II-Produkt (1 088 bp) stellt die genomische Sequenz vom 3'-UTR mit Genstoppbereich des N-Gens (N-Gstp) bis Nt 2745 innerhalb des P-ORF dar. Über den *forward primer* 3NTR-N_Notfw wurden am 5'-Ende zwölf Nt des 5'-UTR und ein artifizienle Bereich von dreizehn Nt mit einer *NotI*-Restriktionsschnittstelle angefügt (s. rote Markierung). Über den *reverse-Primer* P2745_Sph(+) wurde am 3'-Ende eine artifizienle *SphI*-Schnittstelle angehängt.

Durch die überlappenden Bereiche konnten die beiden Fragmente in einer weiteren PCR (PCR-III) zu einem 1 311 bp großen Produkt fusioniert werden.

Die so erhaltene Δ N-TRKA mit der *NotI*-Schnittstelle wurde nach einer Restriktionsspaltung mit *MluI* und *SphI* in das pUC29-Plasmid, das auf die gleiche Weise geschnitten worden war, eingesetzt. Aus den erhaltenen Klonen wurde die Plasmid-DNA mittels Plasmid-Mini-Präparation isoliert und durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf ihre korrekte Sequenz überprüft.

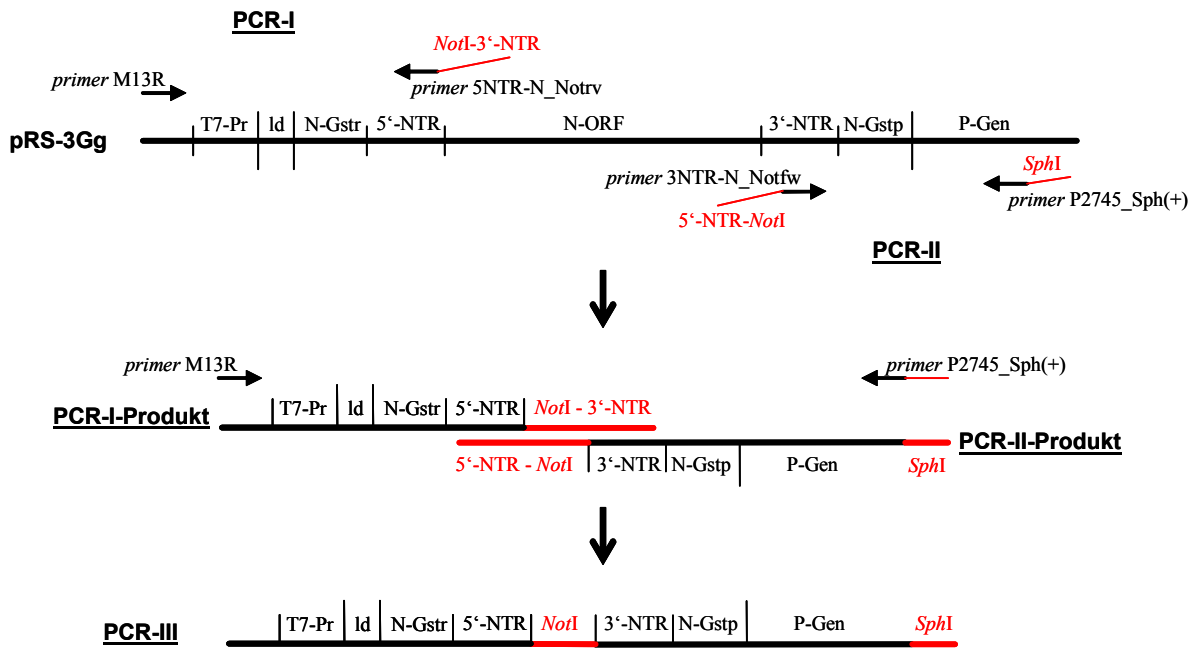


Abbildung 8: Herstellung der ΔN -TRKA über PCR.

Aus dem Plasmid pUC ΔN -TRKA wurde nun die ΔN -TRKA in die genomische cDNA eingesetzt. Da die ursprüngliche cDNA in Form des Plasmids pRS P-EGFP über zwei *SanDI*-Schnittstellen verfügte, musste zunächst vorübergehend das *SanDI*-Fragment aus pRS P-EGFP entfernt werden, um die ΔN -TRKA über *MluI/SanDI* einzusetzen. Das um das *SanDI*-Fragment verkürzte Empfängerplasmid pRS Bno-SanDI wurde ebenfalls mit *MluI* und *SanDI* geschnitten und das Ergebnis war das Konstrukt pRS Δ No-SanDI. Nach einer Verifizierung der korrekten Insertion der ΔN -TRKA über Restriktionsspaltung wurde das zuvor ausgeschnittene *SanDI*-Fragment in die genomische cDNA zum vollständigen Plasmid pRS ΔN PE reinsertiert. Zwei Testspaltungen ergaben, dass die *SanDI*-Schnittstellen wiederhergestellt worden waren und alle Fragmente eines *EcoRV*-Verdau die erwarteten Größen aufwiesen. Damit war die Klonierung der vollständigen cDNA pRS ΔN PE erfolgreich abgeschlossen.

Als nächstes sollte die monobasische Spaltstelle des F-Proteins gegen eine oligobasische (F_{mut}) ersetzt werden, um einen Vektor herstellen zu können, der ohne Zugabe von Acetyl-Trypsin leichter in Helferzellen vermehrt werden kann.

Die Sequenz, die für die F_{mut} -Stelle kodiert, wurde über ein Fragment aus dem Donorplasmid pRS IdE F_{mut} , das mit *BstXI* geschnitten wurde, in pRS ΔN PE überführt. Der *BstXI*-Verdau von pRS-IdE F_{mut} lieferte drei Fragmente, wovon das größte (11 kb) über die F_{mut} -Stelle verfügte. Der Verdau von pRS- ΔN PE mit *BstXI* ergab zwei Fragmente wovon das 7 kb-Stück weiter verwendet wurde. Nach Ligation, Transformation von *E. coli* und Plasmid-Mini-Präparation, wurden über Restriktionsspaltung mit *BstXI* und *EcoRV* die korrekten Fragmentgrößen und die wiederhergestellten *BstXI*-Schnittstellen im neuen Konstrukt pRS ΔN PE F_{mut} festgestellt.

Abschließend wurden die Bereiche der beiden *Bst*XI-Stellen und der F_{mut} -Bereich über eine Sequenzierung verifiziert.

Nachdem nun die zwei SeV ΔN -cDNA-Varianten, mit wt- und mit F_{mut} -Spaltstelle, konstruiert worden waren, sollten diese als nächstes im *virus rescue* zur Herstellung von Viruspartikel eingesetzt werden.

3.1.2. Initiale Herstellung von SeV ΔN PE und SeV ΔN PE F_{mut}

Damit später replikationsdefiziente Vektoren, basierend auf einer Deletion im N-Gen, hergestellt werden können, sollten nun erstmals beide cDNA-Konstrukte, pRS- ΔN PE und pRS- ΔN PE F_{mut} , in einem *virus rescue* (2.7) getestet werden, um rekombinante SeV zu generieren.

Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit war in dieser Arbeitsgruppe die Etablierung eines neuartigen *rescue*-Systems gerade abgeschlossen, das, anstatt auf Vaccinia-MVA-T7-Helferviren angewiesen zu sein, auf rekombinanten, die T7-Polymerase-exprimierenden Zellen (BSR-T7) basiert. Daher sollten sowohl das neue, als auch das alte *rescue*-Verfahren für die Herstellung von SeV ΔN PE und SeV ΔN PE F_{mut} getestet werden.

3.1.2.1. *Virus rescue* mit MVA-T7-System

Die initiale Herstellung von Viruspartikel im *rescue*-System beruht zunächst auf einer Zusammensetzung des Ribonukleoproteins (RNP) aus der in antigenomische RNA umgeschriebenen cDNA und N-Proteinen, die über eine Expression von pTM-N bereitgestellt werden. Anschließend muss dieses Antigenom durch die Polymerase, die aus P- und L-Proteinen besteht, die ebenfalls über eine Expression von pTM-Plasmiden zur Verfügung stehen, in genomische RNA umgeschrieben werden und gleichzeitig mit N-Proteinen zu einem RNP verpackt werden. Erst wenn diese Schritte erfolgreich absolviert wurden, kann der normale virale Replikationszyklus beginnen.

Die Herstellung von SeV ohne den N-ORF (ΔN) sollte im Vergleich zu vollständigen Genomen zu Beginn des *rescue* dadurch erleichtert sein, dass die RNA kürzer ist und somit mit weniger N-Proteinen verpackt werden muss – ein N-Protein deckt auf dem NC sechs Nt ab. Nachdem ein genomisches NC erstmals zusammengesetzt wurde, beginnt die virale Transkription, wodurch die, eingangs nur über pTM-Plasmide produzierten, viralen Proteine N, P und L nun, zusammen mit den restlichen Proteinen, gemäß dem viralen Expressionslevel, hergestellt werden. Diese Proteine unterstützen wiederum die Transkription und die Replikation, so dass immer mehr virale Polymerasekomplexe (RdRp) und *templates* in der Zelle vorhanden sind. Etwas zeitversetzt starten dann der finale Zusammenbau der neuen VP und deren Ausschleusung aus der Zelle.

Die zu Anfang erfolgreich verpackten ΔN -Genome könnten in späteren Phasen der initialen Partikelherstellung den Nachteil aufweisen selbst nicht für N-Proteine zu kodieren, wodurch für die virale Replikation weniger N-Proteine zur Verfügung stehen. Die Folge könnte eine geringere

Ausbeute an VP sein, es sei denn die von pTM-N exprimierten Proteine genügen einer effektiven Virusreplikation.

Die initiale Herstellung von SeV Δ N PE, SeV Δ N PE F_{mut} und SeV P-EGFP wurde zunächst in HeLa-Zellen nach dem Standardprotokoll (5.2.2.1.1) durchgeführt. Als Kontrolle und Vergleichsvirus sollte das Wildtyp-ähnliche Konstrukt pRS-P-EGFP dienen. Da sich in alle Genomen das eGFP-Gen befindet, sollte eine Quantifizierung von VP über grün fluoreszierende Zellen durchgeführt werden. Ließen sich aus beiden Δ N-cDNA-Konstrukten Viren generieren, sollte ein Vergleich zeigen welchen Einfluss die F_{mut} -Spaltstelle auf die Anzahl an hergestellten VP hat.

HeLa-Zellen, in einem zu 80% konfluenten Zellrasen (ZR), wurden mit dem Vaccinia Virus MVA-T7 mit *moi* 15 infiziert. Nach einer einstündigen Adsorptionsphase wurden die Zellen mit genomischer cDNA (pRS- Δ N PE, pRS- Δ N PE F_{mut} und pRS P-EGFP) sowie den standardisierten Mengen der pTM-Expressionsplasmide mit den N-, P- und L-Genen transfiziert. Für die Transfektion wurde das Reagenz LipofectACE verwendet. Nach Infektion und Transfektion wurden die Zellen für 15 h in 1,0 ml OptiMEM und dann in DMEM(-) bei 33 °C inkubiert. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Überstände (ÜS), in denen sich neu hergestellte VP befinden sollten, für eine Passage auf Vero-Zellen verwendet. Den Ansätzen von SeV Δ N PE und SeV P-EGFP musste zuvor noch Acetyl-Trypsin zugesetzt werden, um F-Proteine mit monobasischer Spaltstelle zu aktivieren. Nach einer einstündigen Adsorption erfolgte ein Mediumwechsel auf DMEM(-). Die Ansätze wurden bei 33 °C so lange inkubiert bis eine eindeutige Grünfärbung von Zellen, mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (FM), erkannt werden konnte. Während in den Ansätzen mit SeV P-EGFP (SeV PE) bereits nach zwei Tagen viele Zellen stark grün fluoreszierten, stellte sich für beide SeV Δ N-Ansätze heraus, dass erst ab Tag fünf nach der Infektion ein schwaches Grün bei einigen Zellen zu sehen war. Da diese Methode, initial hergestellte VP zu detektieren, sehr langwierig und unzuverlässig war, sollten anstatt der Vero-Zellen nun H29-Zellen verwendet werden, die durch eine Expression der SeV N-, P-, und L-Gene eine Transkription der SeV Δ N-Deletionsmutanten unterstützen. Nun konnten bereits nach zwei Tagen einzelne grün fluoreszierende Zellen beobachtet werden, wobei davon ausgegangen wurde, dass jede grüne Zelle mit einem VP infiziert worden war. Wie in Tab. 1 dargestellt wurden initiale SeV Δ N PE-Partikel sowohl mit als auch ohne F_{mut} hergestellt. Aus ca. $0,8 \times 10^6$ HeLa-Zellen wurden 100 SeV Δ N PE- und 110 SeV Δ N PE F_{mut} -Partikel pro ml freigesetzt. Die Menge an SeV P-EGFP betrug 1 200 *ciu/ml*.

Durch dieses Ergebnis konnte eindeutig bewiesen werden, dass sich aus beiden Δ N-cDNA-Konstrukten infektiöse SeV Δ N-Partikel herstellen lassen. Die im Vergleich zu SeV P-EGFP deutlich geringere Menge an hergestellten VP deutet jedoch auf einen erheblichen Nachteil der deletierten Genome während der initialen Partikelgenerierung hin. Möglicherweise wirkt sich das Fehlen des N-ORF negativ auf die Verpackung neu synthetisierter RNA-Genome aus, da nicht

genug N-Proteine in der Zelle zur Verfügung stehen. Oder die Herstellung von N-deletierten SeV-Partikel dauert länger als die des SeV-wt, da sich erst genügend N-Proteine für eine Verpackung der RNA angesammelt haben müssen und N-Proteine ausschließlich über die Expression von pTM-N bereitgestellt werden können. Eine längere Inkubation der HeLa-Zellen für eine Herstellung von SeV Δ N-Partikel ist allerdings aufgrund der MVA-Infektion nicht möglich, da die Zellen diese kaum länger als drei Tage überleben.

Tabelle 1: Titrierung der initial hergestellten SeV Δ N-Viruspartikel.

	Vero	H29
SeV Δ N PE	--	100 <i>ciu/ml</i>
SeV Δ N PE F _{mut}	--	110 <i>ciu/ml</i>
SeV P-EGFP	1 200 <i>ciu/ml</i>	--

Ein Vergleich der initial freigesetzten Mengen an SeV Δ N PE und SeV Δ N PE F_{mut} ließ auf keinen Vorteil für eines der beiden Konstrukte schließen, so dass im weiteren Verlauf die F_{mut}-Variante eingesetzt werden sollte, da diese nicht extra mit Acetyl-Trypsin aktiviert werden muss.

Um eine größere Anzahl an initialen SeV Δ N-Partikeln zu erhalten sollte als nächstes das, in dieser Gruppe neu etablierte, *rescue*-Verfahren mit BSR-T7-Zellen (Schurig, 2004) getestet werden, das ohne den Einsatz von Vaccinia-Viren auskommt und damit eine längere Inkubation der Zellen ermöglicht.

3.1.2.2. *Virus rescue* mit BSR-T7-System

BSR-T7-Zellen exprimieren konstitutiv die T7-Polymerase, wodurch ihr Einsatz im *virus rescue* einen Verzicht auf das Vaccinia-Virus MVA-T7 und damit eine längere Inkubationszeit der *rescue*-Ansätze ermöglicht. Für einen Test dieses neuen *rescue*-Systems zur Herstellung von SeV Δ N-Partikel wurde die cDNA pRS Δ N PE F_{mut} eingesetzt.

Der *rescue* wurde gemäß den Bedingungen des Standardprotokolls durchgeführt (5.2.2.1.2). Um eine zuverlässige Aussage über die Effizienz des *rescue* zu bekommen wurden nacheinander zweimal fünf Transfektionsansätze angelegt. Anschließend wurden die jeweiligen Titer durch Passage der *rescue*-ÜS auf Helferzellen, zunächst H29 und später VPN11 (3.2.2.2.7), und Auszählen der grün fluoreszierenden Zellen ausgewertet. Dabei wurde auch darauf geachtet in welchem Zeitraum nach der Transfektion die meisten VP produziert wurden.

BSR-T7-Zellen wurden 24 h vor Infektion zu $0,3 \times 10^6$ Zellen ausgesät und dann mit der cDNA pRS- Δ N PE F_{mut} und den Plasmiden pTM-N, pTM-P und pTM-L transfiziert. Als Kontrolle wurde das Plasmid pTM-DsRed kotransfiziert, wodurch nach einem Tag, anhand von roter Fluoreszenz,

die Transfektionseffizienz beurteilt werden konnte. Die Zellen wurden während und nach der Transfektion in DMEM^{2%FKS} inkubiert. Alle 24 h wurde das Medium erneuert. Ab Tag zwei wurden die ÜS auf VP untersucht. Dazu wurden H29-Zellen mit potenziell virushaltigem ÜS infiziert, um nach einer Inkubationsphase von ca. drei Tagen die Anzahl an grün fluoreszierenden Zellen bestimmen zu können. Wie in Abb. 9 verdeutlicht konnte mit diesem *rescue*-System eine deutlich höhere Ausbeute an VP erzielt werden als mit MVA-T7-infizierten HeLa-Zellen (3.1.2.1).

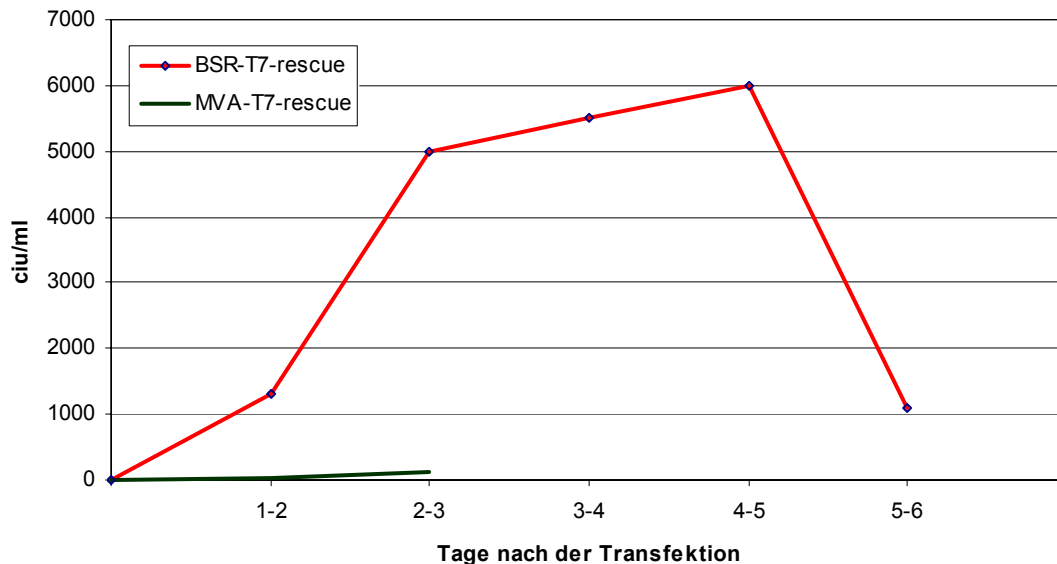


Abbildung 9: Kinetik der Freisetzung von SeV Δ N PE F_{mut}-Partikeln aus dem *virus rescue* mit dem MVA-T7- und BSR-T7-System. Alle 24 h wurden aus den Kulturüberständen die Anzahl infektiöser VP (*ciu*) bestimmt indem Helferzellen (H29 und VP11) infiziert und anschließend grün fluoreszierende Zellen ausgezählt wurden.

Bis Tag zwei nach der Transfektion lag die Anzahl an freigesetzten, infektiösen VP mit 1 300 pro ml im Vergleich zu späteren Zeitpunkten noch relativ niedrig. Aus dem ÜS von Tag zwei bis drei wurden allerdings schon 5 000 *ciu* bestimmt. Diese Menge stieg bis Tag fünf auf 6 000 *ciu* noch leicht an und fiel dann deutlich ab. Die maximale Virusproduktion findet also zwischen Tag zwei und fünf statt, wenn aus ca. $1,0 \times 10^6$ Zellen rund 16 500 infektiöse SeV Δ N PE F_{mut}-Partikel ausgeschleust werden. Zu beachten ist dabei, dass die Effizienz der *rescue*-Versuche stark von der Qualität der verwendeten Komponenten und mit ihrem Umgang abhängen. Das gilt insbesondere für die DNA, wobei nur Plasmid-Maxi-Präparationen ohne Verunreinigungen verwendet werden sollten, und die Zellen, die ein gewisses Alter, in vorliegendem Fall die ca. hundertste Passage, nicht überschritten haben sollten.

Im Vergleich der absoluten Mengen an hergestellten VP mit beiden *rescue*-Verfahren erwies sich das BSR-T7-System, mit ca. 18 000 *ciu* über einen Zeitraum von fünf Tagen, dem MVA-T7-System, mit rund 150 *ciu* über zwei Tage, als deutlich effektiver. In allen weiteren *rescue*-Versuchen sollte daher das BSR-T7-System zur Anwendung kommen. Diese Steigerung ist enorm,

war aber aufgrund von Versuchen mit dem replikationskompetenten SeV Id eGFP zu erwarten gewesen. Dabei konnte die Menge an freigesetzten VP gegenüber dem MVA-T7-System um den Faktor 10 000 auf fast 10^7 *ciu* gesteigert werden (Schurig, 2004). Der große Unterschied in den Steigerungsraten für SeV Δ N, Faktor 130, und SeV Id eGFP, Faktor 10 000, lässt sich einerseits sicherlich mit der Fähigkeit von SeV Id eGFP sich zu vermehren und auszubreiten begründen. Andererseits könnten sich optimale *rescue*-Bedingungen, wie z.B. die Mengen an zu transfizierender DNA, für SeV-Mutanten mit deletierten ORF von denen für wt-Viren unterscheiden. Nachfolgend sollte daher versucht werden die Ausbeute an SeV Δ N PE F_{mut} über Optimierung des *rescue* zu erhöhen.

3.1.2.3. Optimierung der *rescue*-Bedingungen

Nachdem sich der *rescue* von SeV Δ N-Partikel im BSR-T7-System als wesentlich ergiebiger als im MVA-T7-System herausgestellt hatte, sollte eine weitere Steigerung der Ausbeute durch eine Erhöhung der N-Proteinmenge in den BSR-T7-Zellen erreicht werden.

Wie oben gezeigt, reichen die zu Beginn, zusammen mit der cDNA, transfizierten Plasmide pTM-N, -P und -L für eine erste Herstellung von SeV Δ N-Partikel aus. Allerdings können die in den BSR-T7-Zellen hergestellten Δ N-Nukleokapside (NC) im Gegensatz zu wt-NC kein zusätzliches N-Protein selbst herstellen, das für die Verpackung weiterer Genome und Antigenome benötigt wird. D.h. die einzige Quelle für N-Protein stellen die zu Beginn des *rescue* in die Zelle gebrachten pTM-N-Plasmide dar. Wie der Anstieg von freigesetzten Δ N-Partikel bis Tag fünf nach der Transfektion zeigt (Abb. 9) werden immer mehr NC gebildet, die mit N-Proteinen verpackt sind. Je mehr NC in der Zelle existieren, desto mehr neue NC können durch diese gebildet werden, womit gleichzeitig der Bedarf an N-Protein steigt. Die Bereitstellung von N-Protein über pTM-N wird allerdings mit der Zeit absinken, da die Plasmid-DNA im Zytoplasma nur eine beschränkte Lebensdauer hat. Daher sollte nun überprüft werden, ob eine zusätzliche Transfektion von Expressionsplasmiden mit dem SeV N-Gen eine gesteigerte Freisetzung von Δ N-Partikel zur Folge hat.

Als erstes sollte festgestellt werden ob durch eine weitere zusätzliche Transfektion (Nachtransfektion, NT) von pTM-N die *rescue*-Ausbeute erhöht werden kann. Dazu wurde ein *rescue*-Ansatz zwei Tage nach der ersten Transfektion (2 d p.t.) mit 1 μ g pTM-N transfiziert. Ein weiterer Ansatz wurde parallel ohne NT kultiviert. Eine mikroskopische Beurteilung des *rescue*-Verlaufs anhand von grüner Fluoreszenz deutete ab Tag zwei nach der NT auf eine stärkere Vermehrung von SeV Δ N-Partikel hin. Zum einen zeigte der Ansatz mit NT deutlich mehr grüne Zellen. Zum anderen leuchtete das Grün heller, was auf eine stärkere Transkription der viralen Gene schließen lässt, wodurch wiederum die Replikation begünstigt wird. Eine vergleichende Titrierung der *rescue*-ÜS von Tag vier bis fünf ergab für den Ansatz mit NT eine Steigerung an freigesetzten VP um 18%. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch eine NT von pTM-N eine größere Menge an SeV

ΔN PE F_{mut} erreicht werden kann. Da diese Steigerung allerdings nicht besonders groß ist, sollte ein anderes Expressionsplasmid, das pRECISE-N-Plasmid (pRE-N), das eine Zellkern-lokalisierte Transkription auslöst (3.2.2.2.1), getestet werden. Dazu wurden parallel *rescue*-Ansätze 2 d p.t. mit pTM-N oder pRE-N nachtransfiziert. Der anschließend aus den ÜS von Tag 4-5 ermittelte Virustiter des pRE-N-Ansatzes übertraf dabei den des pTM-N-Ansatzes um 86%. Nachdem an Tag fünf noch eine sehr große Menge an freigesetzten VP bestimmt worden war, wurde auch der Titer des ÜS von Tag 5-6 ermittelt. Dabei stellte sich für den Ansatz mit nachtransfiziertem pRE-N lediglich ein leichtes Absinken der Partikelanzahl heraus während der pTM-N-Ansatz beinahe keine VP mehr freisetzte. Diese länger andauernde Virusproduktion durch NT von pRE-N konnte noch weiter optimiert werden, indem pRE-N 1 d p.t. und 3 d p.t., also zweimal, nachtransfiziert wurde. Die Menge von 1 μ g wurde dabei beibehalten. Der auf diese Weise optimierte *rescue* ermöglicht die Verwendung der ÜS von 2 bis 8 d p.t. Diese weisen durchgehend einen Titer von 10 – 15 000 *ciu/ml* auf. Eine Erhöhung der Menge an transfizierter DNA über die 1,0 μ g brachte keine nennenswerte Steigerung in der Virusausbeute, führte aber ab 2,0 μ g DNA zu einem erhöhtem CPE, wodurch die Zellen schneller abzusterben begannen.

Wie in Tabelle 2 zusammengefasst, konnte durch die Optimierung des SeV ΔN -*rescue* eine deutliche Steigerung der Ausbeute an infektiösen VP erreicht werden. Dazu wurden die *rescue*-Ansätze mit Genkopien des SeV N-Gens in Form des Expressionsplasmids pRE-N nachtransfiziert. Der maximale Titer konnte durch zweifache NT um den Faktor 2,5 auf 15 000 *ciu/ml* gesteigert werden. Darüber hinaus konnte durch die doppelte NT die Dauer der Freisetzung großer Mengen VP um drei Tage verlängert werden, wodurch die absolute Ausbeute an VP aus einem *rescue* deutlich erhöht wurde. Während ohne NT ca. 18 000 *ciu* bis 6 d p.t. freigesetzt werden, können durch die zweifache NT bis 8 d p.t. ca. 60 000 *ciu* produziert werden.

Tabelle 2: *Rescue*-Optimierung durch Nachtransfektionen.

	ohne NT	1 x NT		2 x NT
	--	mit pTM-N	mit pRE-N	mit pRE-N
ÜSd4-5 (<i>ciu/ml</i>)	6 000	7 100	13 200	15 000
[%]	100	118	220	250
absolute <i>rescue</i>-Ausbeute (<i>ciu</i>)	18 000	--	--	60 000

Nach der Optimierung des *virus rescue* von SeV ΔN PE F_{mut} , sollte zunächst die Funktionalität der initial hergestellten SeV ΔN -Viren überprüft werden, bevor eine System ihrer Vermehrung etabliert werden sollte.

3.1.3. Überprüfung der SeV Δ N-Mutanten in Komplementationsversuchen

Bei Einsatz des cDNA-Konstrukts pRS- Δ N PE F_{mut} im *virus rescue* können initiale VP generiert werden. Die so hergestellten SeV Δ N PE F_{mut} besitzen anstelle des N-Gens eine leere Transkriptionskassette (TRKA) an Position 1 des Genoms. Durch die N-Gendeletion sollte eine Replikationsdefizienz der Viren erreicht worden sein, damit eine unkontrollierte Vermehrung des viralen Vektors im Zielorganismus verhindert werden kann. Durch die leere TRKA soll die Voraussetzung für die Insertion eines beliebigen Gens in das virale Genom geschaffen worden sein. Nachfolgend soll für SeV Δ N PE F_{mut} verifiziert werden, ob diese beiden Eigenschaften, die für das angestrebte Vektorkonstrukt essentiell sind, sich auch darstellen lassen.

3.1.3.1. Verifizierung der Funktionalität der Transkriptionskassette von SeV Δ N

Die in den Genomen von SeV Δ N PE und SeV Δ N PE F_{mut} an Position 1 befindliche leere TRKA verfügt über eine *NotI*-Schnittstelle (3.1.2), über die ein Transgen in das virale Genom eingesetzt werden kann. Dieses sollte anschließend, gemäß dem viralen Expressionsgradienten, in großer Menge exprimiert werden. Um die Möglichkeit der Expression eines Transgens über diese TRKA zu überprüfen, sollte zunächst der virale N-ORF in die cDNA pRS- Δ N PE über die *NotI*-Schnittstelle inseriert werden. Die aus dem anschließenden *rescue* entstehenden Produkte (SeV Δ N+N PE) verfügen über alle viralen Gene und sollten daher, wie SeV P-EGFP, in großer Menge herstellbar und replikationskompetent sein. Für eine optimale Vergleichbarkeit mit SeV P-EGFP sollte der N-ORF in ein Konstrukt mit monobasischer F-Spaltstelle (pRS- Δ N PE F_{mut}) eingebaut werden.

Um den N-ORF in die cDNA pRS- Δ N PE über *NotI* einsetzen zu können, mussten seine Endsequenz mittels PCR modifiziert werden. Über die beiden speziell designten *primer* NotNfw und NotNrv wurden die *NotI*-Schnittstellen an den Enden des N-ORF eingebaut. Als *template* diente das Plasmid pTM-N. Nach Synthese des 1,7 kb-großen Fragments wurde dieses zunächst über *NotI* in ein pUC-Plasmid eingesetzt, um in diesem Konstrukt aufgrund seiner geringen Größe relativ unkompliziert die Korrektheit des N-ORF über Restriktionsspaltung und Sequenzierung zu überprüfen.

Im nächsten Schritt wurde der N-ORF in die Δ N-TRKA, die ebenfalls in einem pUC-Plasmid eingebaut vorlag, über *NotI* inseriert. Über einen *EcoRV*-Testverdau konnte dann sowohl der Einbau von nur einer N-ORF-Kopie in die TRKA als auch die richtige Orientierung des Inserts verifiziert werden. Analog zur Herstellung von pRS- Δ N PE (3.1.2) wurde nun die Δ N+N-TRKA als *MluI*-*SanDI*-Fragment aus dem pUC-Konstrukt in das Plasmid pRS Bno-*SanDI* übertragen. Danach wurde das vorher ausgeschnittene *SanDI*-Fragment zur Vervollständigung der cDNA pRS- Δ N+N PE zurückgesetzt. Nach erneuter Bestätigung der korrekten Fragmentgrößen im Restriktionsverdau wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation zur Verwendung im *virus rescue* angefertigt.

Die parallele Herstellung von SeV P-EGFP und SeV $\Delta N+N$ PE im *rescue* nach dem Standardprotokoll erwies sich als problemlos. Die durch den KID-Test ermittelten Titer lagen bei $12,8 \times 10^6$ *ciu/ml* für SeV P-EGFP und $25,6 \times 10^6$ *ciu/ml* für SeV $\Delta N+N$ PE.

Die nun folgenden Testinfektionen mit SeV $\Delta N+N$ PE bestätigten was bereits durch den im *rescue* erzielten hohen Titer erwartet werden konnte. Während der Infektion von Vero-Zellen mit *moi* 1 und *moi* 0,01 verhält sich SeV $\Delta N+N$ PE wie SeV P-EGFP. Bereits 1 d p.i. kann eine starke grüne Fluoreszenz beobachtet werden, die Zellen entwickeln ab 2 d p.i. einen sehr starken zytopathischen Effekt und bei der Infektion mit *moi* 0,01 kann, bei Anwesenheit von Acetyl-Trypsin im Medium, eine rasche Ausbreitung auf Nachbarzellen verfolgt werden, d.h. das Virus ist replikationskompetent (Daten nicht gezeigt).

Durch Reinsertion des N-ORF in pRS- ΔN PE und den daraus hergestellten Viren konnte die Funktionalität der ΔN -TRKA in SeV ΔN PE und SeV ΔN PE F_{mut} gezeigt werden. Die schnelle und zahlreiche Vermehrung von SeV $\Delta N+N$ PE lässt auf eine N-Genexpression vergleichbar mit dem wt schließen. Für die Insertion des ORF eines anderen Gens in die ΔN -TRKA kann daher ebenfalls von einer starken Expression ausgegangen werden.

Ob die gezeigte Fähigkeit von SeV $\Delta N+N$ PE sich zu vermehren ausschließlich auf den eingesetzten N-ORF zurückgeführt werden kann oder ob SeV ΔN PE F_{mut} selbst noch teilweise replikationskompetent ist, sollte als nächstes getestet werden.

3.1.3.2. Nachweis der Replikationsdefizienz von SeV ΔN

Die Deletion des N-ORF bei den Mutanten SeV ΔN PE und SeV ΔN PE F_{mut} sollte eine Neusynthese von N-Proteinen während Infektionen verhindern. Da das N-Protein für die Verpackung von neu synthetisierter genomischer RNA zur Ausbildung des Nukleokapsids essentiell ist, sollten ΔN -Viren alleine nicht fähig sein in Zellen zu replizieren und Nachkommenviren zu bilden.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Vero-Zellen mit SeV ΔN PE und SeV ΔN PE F_{mut} jeweils mit der niedrigen *moi* von 0,02 infiziert, um eine mögliche Ausbreitung einer Virusinfektion schnell zu entdecken. Dem Ansatz von SeV ΔN PE wurde Acetyl-Trypsin (AcT) zugesetzt, damit eine Spaltung des F-Proteins potenziell neu gebildeter VP möglich sein sollte. In einer Kontrollinfektion wurde das SeV P-EGFP mit *moi* 0,02 in einem Ansatz mit und in einem Ansatz ohne AcT eingesetzt.

Wie zu erwarten und schon mehrfach zuvor beobachtet entsteht durch SeV P-EGFP, auch bei *moi* 0,02, bereits 1 d p.i. in vielen Zellen eine grüne Fluoreszenz, die sich, im Falle des Ansatzes mit AcT, in den Folgetagen jeweils schweifartig um die ursprünglich infizierte Zelle eines Infektionsherdes ausbreitet.

Die mit den ΔN -Viren infizierten Zellen zeigen selbst 10 d p.i. keine Fluoreszenz. Daher kann von einer sehr geringen Transkriptionsaktivität der NC ausgegangen werden. Da die virale Transkription eine Voraussetzung für die Replikation ist und keine grünen Zellen zu entdecken waren, scheint keine Replikation von SeV ΔN PE und SeV ΔN PE F_{mut} stattgefunden zu haben. Um sicherzugehen, dass nicht doch einige Nachkommenpartikel freigesetzt wurden, die jedoch keine weiteren Zellen mehr infiziert haben, wurden H29-Helferzellen mit ÜS von Tag fünf bis acht infiziert. Da H29-Zellen selbst für SeV N, P und L-Proteine kodieren, unterstützen sie die virale Transkription und Replikation. Sie stellen somit ein sehr sensitives Nachweissystem auch für infektiöse SeV-Mutanten dar. Nach Inkubation der H29-Zellen mit den potenziell SeV ΔN -haltigen ÜS konnte keine grüne Fluoreszenz auch nach sechs Tagen beobachtet werden.

Aufgrund der ausbleibenden grünen Fluoreszenz während Infektionen von Vero-Zellen und der fehlenden Nachweisbarkeit von Nachkommenpartikeln aus Kulturüberständen infizierter Vero-Zellen auf H29-Zellen können die Konstrukte SeV ΔN PE und SeV ΔN PE F_{mut} als replikationsinkompetent bezeichnet werden.

Um zu zeigen, dass bei den beschriebenen Infektionen tatsächlich infektiöse ΔN -VP eingesetzt worden waren, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Vero-Zellen wurden mit einer Mischung aus SeV ΔN PE F_{mut} und dem SeV-Wildtyp (SeV-wt) mit *moi* 0,02 bzw. *moi* 1 (SeV-wt) infiziert. Das hat zur Folge, dass fast alle Zellen mit SeV-wt infiziert werden und einige gleichzeitig auch mit SeV ΔN . Unter diesen Bedingungen wird durch die wt-Infektion auch die Transkription und Replikation von SeV ΔN PE F_{mut} optimal unterstützt. Um nun feststellen zu können ob Zellen mit SeV ΔN PE F_{mut} infiziert worden sind, also ob überhaupt infektiöse Partikel in der Charge vorlagen, musste zwischen der Transkription von SeV-wt und SeV ΔN PE F_{mut} unterschieden werden. Dazu konnte die eGFP-Expression der Mutante herangezogen werden, während SeV-wt kein eGFP-Gen besitzt. Grün fluoreszierende Zellen müssen demnach auf die Transkription von SeV ΔN PE F_{mut} zurückgeführt werden. Das Ergebnis des Versuchs konnte eindeutig infektiöse SeV ΔN PE F_{mut} -Partikel nachweisen. Schon einen Tag nach der Koinfektion von Vero-Zellen mit SeV ΔN PE F_{mut} und SeV-wt waren einzelne grüne Zellen sichtbar, die an Tag zwei noch heller leuchteten. Die grüne Fluoreszenz beschränkte sich auf einen Teil der Kultur, was aufgrund der geringeren *moi* von SeV ΔN PE F_{mut} zu erwarten gewesen war.

Durch diesen Versuch konnte sichergestellt werden, dass bei dem Nachweis der Replikationsinkompetenz von SeV ΔN PE F_{mut} auf Vero-Zellen trotz ausgebliebener grüner Fluoreszenz tatsächlich infektiöse ΔN -Partikel eingesetzt worden waren.

Mit diesem Nachweis der Replikationsinkompetenz konnte die Herstellung der Deletionsmutante SeV ΔN PE F_{mut} erfolgreich abgeschlossen werden. Nach Optimierung des *virus rescue* mit BSR-T7-Zellen lassen sich bis zu $0,15 \times 10^5$ infektiöse Partikel pro ml initial herstellen. Die

Funktionalität der leeren Transkriptionskassette an Position 1 des Genoms konnte gezeigt werden, so dass ein an dieser Stelle des Vektors integriertes Fremdgen gut exprimiert werden sollte.

Um nach der initialen Herstellung die Anzahl an SeV Δ N PE F_{mut} -Partikeln zu erhöhen, sollte im Folgenden ein Vermehrungssystem für diese replikationsdefiziente Mutante etabliert werden.

3.2. Vermehrung von SeV Δ N

Nachdem die initiale Herstellung von SeV Δ N PE F_{mut} im *virus rescue* etabliert werden konnte (s. 3.1), sollten diese Partikel über Transkomplementation vermehrt werden. Die Anzahl an VP aus dem *rescue* lag mit ca. $0,2 \times 10^5$ infektiöse Partikel pro ml nicht ausreichend hoch um das Δ N-Konstrukt charakterisieren oder später als Vektor effizient anwenden zu können. Die Replikationsinkompetenz von SeV Δ N PE F_{mut} beruht auf dem Fehlen des N-Gens. Für eine Vermehrung von SeV Δ N muss das N-Protein über andere Quellen angeboten werden. Eine bereits zuvor bewährte Möglichkeit dafür bietet der Einsatz von Helferzellen, die bestimmte virale Proteine konstitutiv produzieren. Für eine SeV-Mutante mit deletiertem P-Gen (SeV Δ P) konnte durch Transkomplementierung über Helferzellen eine starke Virusvermehrung erzielt werden (Schlecht, 2004). Eine weitere Möglichkeit für eine Transkomplementierung stellt die transiente Transfektion von Zellen mit Expressionsplasmiden dar. Problematisch könnte sich dabei allerdings die Transfektionseffizienz erweisen, da durch Transfektion fast immer nur ein Teil einer Zellkultur erreicht wird. Deshalb wurde dieses Verfahren nicht weiter verfolgt.

Bevor jedoch ein geeignetes Vermehrungssystem entwickelt werden sollte, musste zunächst sichergestellt werden, dass SeV Δ PE F_{mut} prinzipiell vermehrbar ist. Die Replikationsfähigkeit sollte über eine Transkomplementation mit dem SeV-Wildtyp (RS-3G) während einer Koinfektion überprüft werden.

3.2.1. Nachweis der Vermehrbarkeit von SeV Δ N durch Koinfektion mit SeV-wt

Vor der Entwicklung eines Helfersystems zur effizienten Vermehrung der SeV- Δ N-Partikel aus dem *virus rescue* musste die grundsätzliche Vermehrbarkeit von SeV Δ N PE F_{mut} sichergestellt werden. Dabei sollte die Transkomplementation des fehlenden N-Proteins über eine Koinfektion mit dem wt-Virus (RS-3G) erreicht werden. Bekommt das Δ N-Virus in der koinfizierten Zelle ausreichend N-Proteine für eine Verpackung neu synthetisierter RNA-Genome zur Verfügung gestellt, sollten Nachkommenviren von dieser Zelle aus weitere benachbarte Zellen infizieren können. Damit dieser Ablauf funktionieren kann mussten die Versuchsbedingungen sorgfältig ausgewählt werden. Für die wt-Infektion wurde die Anzahl eingesetzter Partikel so gewählt, dass nur ca. jede zehnte Zelle infiziert wird (*moi* 0,1). Die aus dem *rescue* maximal zur Verfügung stehende Menge an Δ N-Partikel betrug 8 000 *ciu*, was der *moi* 0,02 entsprach. Während der Infektion von 400 000 Vero-Zellen soll-

ten so ca. 800 Zellen mit SeV-wt und Mutante koinfiziert sein. Ca. 350 000 Zellen blieben uninfiziert, so dass diese von potenziellen Nachkommenviren aus koinfizierten Zellen befallen werden könnten. Ca. 50 000 Zellen waren mit nur einem der beiden Viren infiziert, wodurch sie einen Superinfektionsschutz besaßen, und daher nicht mehr infiziert werden konnten. Infizieren wt- und Δ N-Nachkommenpartikel gleichzeitig umliegende, noch uninfizierte Zellen, sollte anhand der grünen Fluoreszenz, die ausschließlich von Δ N-Genomen stammen kann, eine Ausbreitung der SeV Δ N PE F_{mut} -Infektion zu erkennen sein.

4×10^5 Vero-Zellen wurden gleichzeitig mit SeV Δ N PE F_{mut} (*moi* 0,02) und SeV-wt (*moi* 0,1) infiziert. Nach der einstündigen Adsorptionsphase wurden die Zellen mit frischem Medium (DMEM + 5% FKS) bei 33 °C inkubiert. Bereits 1 d p.i. konnten einzelne grün fluoreszierende Zellen beobachtet werden. Die Ausbreitung, ausgehend von einer initial mit beiden Viren infizierten Zelle, trat ab Tag zwei an verschiedenen Stellen auf. Wie in Abb. 10 exemplarisch gezeigt, entstanden bis ca. 8 d p.i. deutliche Schweife fluoreszierender Zellen, die nach und nach, zeitgleich mit Nachkommenviren von SeV Δ N PE F_{mut} und dem wt-Virus, infiziert worden waren.

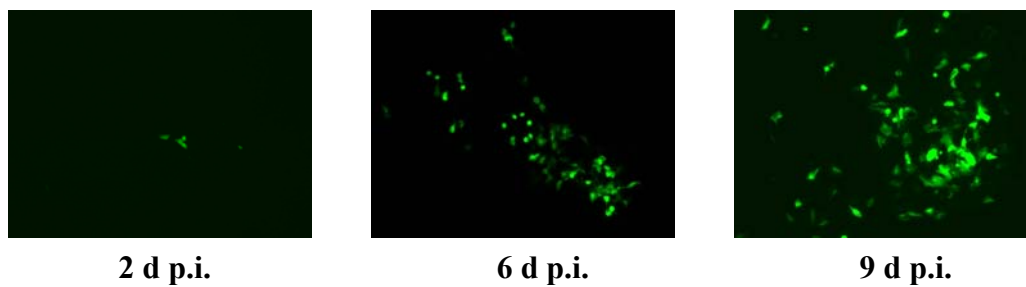


Abb. 10: Nachweis der Vermehrbarkeit von SeV Δ N durch Koinfektion mit SeV-wt. Vero-Zellen wurden mit SeV-wt (*moi* 0,1) und SeV Δ N (*moi* 0,02) koinfiziert. Die SeV Δ N-Ausbreitung wurde anhand der eGFP-Expression von 2 bis 9 d p.i. verfolgt.

Durch dieses Ergebnis konnte sichergestellt werden, dass SeV Δ N PE F_{mut} -Partikel, die im *rescue* initial erzeugt wurden, vermehrt werden können. Darüber hinaus konnte das Prinzip der Transkomplementierung der fehlenden viralen Komponente - in dem Fall des N-Proteins - zur Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} als funktionell bewertet werden. Die ausschließlich durch wt-Viren synthetisierte Menge an N-Protein reichte aus um sowohl Nukleokapside von SeV-wt als auch von SeV Δ N herzustellen.

3.2.2. Versuche zur Vermehrung von SeV Δ N über Helfierzellen

Um eine Vermehrung von SeV Δ N ohne die gleichzeitige Anwesenheit von Helferviren zu erreichen, sollten Helfierzellen eingesetzt werden, die bestimmte virale Gene stabil in ihrem Genom integriert haben. Wie bereits für eine SeV-Mutante mit deletierten P-Gen gezeigt (Schlecht, 2004)

können auf diese Weise Deletionsmutanten *in trans* komplementiert werden und damit ihre Amplifikation ermöglicht werden. Allerdings spielen für eine erfolgreiche Transkomplementation verschiedene Faktoren eine Rolle. Zum einen muss das virale Gen in der Zelle stark genug exprimiert werden, um dem Anspruch der viralen Replikation zu genügen. Darüber hinaus kann auch das mengenmäßige Verhältnis des von der Zelle kodierten viralen Proteins zu anderen, auf dem viralen Genom kodierten Proteinen von Bedeutung sein, d.h. der Expressionslevel des zellulär synthetisierten Proteins muss eventuell dem vom Virus kodierten angepasst werden. Ein spezieller Fall könnte bei der Transkomplementation von SeV ΔN vorliegen. Neben dem N-Protein könnte in der Helferzelle gleichzeitig das P-Protein benötigt werden, da dieses während der Virusreplikation an das N-Protein, im N⁰-P-Komplex, binden muß, um es so löslich zu halten. Andernfalls übt das N-Protein seine Eigenschaft RNA zu binden unspezifisch aus. Dadurch könnte zelluläre RNA unspezifisch verpackt werden wodurch dann möglicherweise wieder nicht ausreichend N-Protein für die virale Replikation zur Verfügung steht.

Da in dieser Arbeitsgruppe bereits Helferzellen, die nur N- oder N- und P-Protein synthetisieren, existieren, sollten diese für eine Vermehrung von SeV ΔN zunächst zum Einsatz kommen.

3.2.2.1. Verwendung bereits existierender Helferzellen

Für die Vermehrung von SeV ΔN sollten Zelllinien getestet werden, die in dieser Arbeitsgruppe stabil transfiziert wurden. Da zum diesem Zeitpunkt nicht klar war ob eine alleinige Bereitstellung von N-Protein durch die Zelle ausreicht oder ob P-Protein ebenfalls vorhanden sein muss, sollten zwei Zelllinien getestet werden, die beide Möglichkeiten anbieten.

3.2.2.1.1. Die Helferzellen LTK⁻-394 und LTK⁻-460

Der von W. Willenbrink stabil transfizierte Zellklon LTK⁻-394 verfügt nur über das SeV N-Gen während der Zellklon LTK⁻-460 sowohl das N- als auch das P-Protein konstitutiv synthetisiert (Willenbrink, 1991). Für eine Unterstützung der Replikation von SeV ΔN PE F_{mut} wurden diesen beiden Zelllinien jeweils mit 1 000 infektiösen VP infiziert. Während der Inkubation der Zellen bei 33 °C konnte jedoch keine grüne Fluoreszenz bis 8 d p.i. festgestellt werden. Dabei traten auch keine einzelnen grün fluoreszierenden Zellen auf, die zumindest eine virale Transkription ohne Replikation angezeigt hätten. Um einen Hinweis darauf zu bekommen ob die Menge des von der Zelle hergestellten viralen Proteins möglicherweise nicht ausreicht, sollte mit Hilfe der Immunfluoreszenz die N-Proteinexpression in LTK⁻-394 und LTK⁻-460 mit der von wt-infizierten Vero-Zellen verglichen werden. Dazu wurden Vero-Zellen mit SeV-wt (*moi* 1) infiziert und nach 24 h, parallel zu den beiden LTK-Zelllinien, mit dem SeV N-spezifischen Antikörper rabbit(rb)-anti-N inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde der mit dem Alexa568-Farbstoff gekoppelte anti-rb IgG verwendet, wodurch detektierte N-Proteine rot fluoreszieren. Erstaunlicherweise wies LTK⁻-394 keine sichtbare

und LTK⁻-460 nur eine sehr schwache rote Fluoreszenz auf. Die wt-infizierten Vero-Zellen strahlten dagegen ein sehr starkes Signal ab (Abb. 11).

Als mögliche Erklärung für die ausgebliebene Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} könnte daher die zu geringe Menge an N-Protein, die von den stabil transfizierten LTK-Zellen hergestellt wird, herangezogen werden.

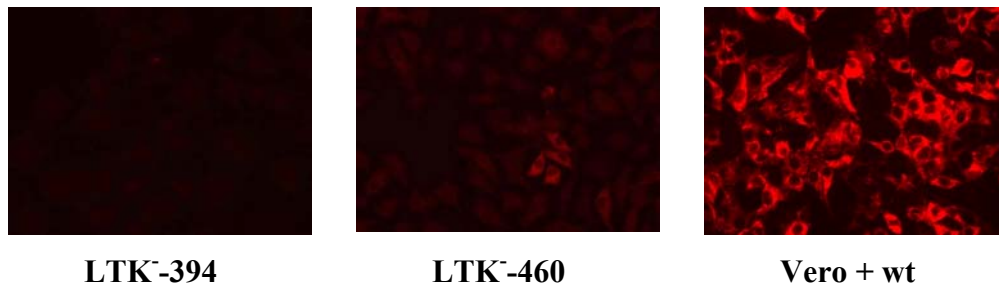


Abbildung 11: Nachweis des SeV N-Proteinsynthese in LTK⁻-394- und -460-Helferzellen im Vergleich zu SeV-wt-infizierten Vero-Zellen. Infektion der Vero-Zellen mit SeV-wt (*moi* 1). Detektion der N-Proteine – bei Vero-Infektionen 1 d p.i. - über Immunfluoreszenz mit N-spezifischen Antikörpern (anti-SeV-N-Protein – Verdünnung 1:100), die mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern (Alexa Fluor®568 goat anti-rabbit IgG – Verdünnung 1:200) markiert wurden.

Nachdem die beiden Helferzelllinien LTK⁻-394 und LTK⁻-460 offensichtlich eine zu geringe Transgenexpression aufwiesen und keine Vermehrung von SeV Δ N-Partikeln bewirken konnten, sollte nun die Helferzelle H29 getestet werden, die bereits erfolgreich für die Vermehrung der replikationsinkompetenten Vektoren SeVV IdE Δ P F_{mut} und SeVV IdE P Δ 2-77 F_{mut} eingesetzt werden konnte (Schlecht, 2004).

3.2.2.1.2. Die Helferzelle H29

Die in unserer Arbeitsgruppe hergestellte Helferzelllinie H29 (Willenbrink & Neubert, 1994) synthetisiert neben den SeV N- und P-Proteinen auch das L-Protein. Somit kann die Helferzelle alle am Replikationskomplex beteiligten Protein-Komponenten bereitstellen, wodurch die virale Transkription und Replikation gefördert wird, wie für die SeV-Deletionsmutanten SeV Δ P und SeV P Δ 2-77 bereits gezeigt wurde (Schlecht, 2004).

Für eine Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} wurden 5×10^5 H29-Zellen mit 3 000 *ciu* infiziert. Im Verlauf der Infektion konnten ab 2 d p.i. einzelne, schwach grün fluoreszierende Zellen entdeckt werden. Um einige von diesen entstanden ab 4 d p.i. weitere „grüne“ Zellen, die aufgrund ihrer Anzahl eindeutig auf eine virale Nachkommenproduktion zurückgeführt werden konnten und nicht auf die Teilung bereits infizierter Zellen. Bis 12 d p.i. nahm diese Ausbreitung an Größe und Intensität der Fluoreszenz zu. Dabei wurde alle zwei Tage der Überstand (ÜS) der Kultur auf die Existenz von

Nachkommenviren untersucht, indem frisch ausgesäte H29-Zellen mit diesem inkubiert wurden. Das Ergebnis dieser Passage 2 (P2) waren wiederum einzelne grüne Zellen, um die sich langsam weitere grüne Zellen ansammelten. Allerdings war das Ausmaß der grünen Fluoreszenz vergleichbar mit dem der ersten Passage. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass eine Nachkommenproduktion stattfindet, das Prinzip der zellulären Transkomplementation von SeV Δ N-Partikel also funktioniert. Trotz mehrfacher Wiederholung der SeV Δ N-Passagen wurden nur wenige Partikel über einen relativ langen Zeitraum freigesetzt, so dass sich die Anzahl an SeV Δ N-Partikel, die initial im *rescue* hergestellt wurden, über diesen Weg nicht signifikant steigern lässt. Verschiedene Gründe könnten für diese ineffektive SeV Δ N-Replikation eine Rolle spielen. Generell eignen sich H29-Zellen nicht besonders gut für eine Produktion von SeV-wt-Viren. Während Testinfektionen von Vero- und H29-Zellen mit dem SeV-wt konnte gezeigt werden, dass sich mit der gleichen Menge an VP ca. viermal weniger H29-Zellen infizieren ließen. Darüber hinaus setzen mit SeV-wt infizierte H29-Zellen ca. zehnmal weniger Nachkommenviren frei als Vero-Zellen (Schlecht, 2004). Einen weiteren Nachteil der H29-Zellen stellt ihre geringe Robustheit während Virusinfektionen dar. Eine SeV-wt-Infektion überlebt eine H29-Kultur nicht länger als drei Tage, wobei dazu noch die Zugabe von 10% FKS zum ihrem Kulturmedium als Stabilisierungsfaktor zur Aufrechterhaltung der Zellen nötig ist. Eine Vermehrung von replikationsdefizienten Viren läuft im Vergleich zu der von wt-Viren wesentlich langsamer ab. Im Falle der Vermehrung von SeV Δ P überlebten die H29-Zellen noch ausreichend lange (Schlecht, 2004). Da sich die Vermehrung von SeV Δ N jedoch als deutlich komplizierter und anspruchsvoller herausstellt, wäre eine längere Inkubationsdauer einer Kultur sicherlich von Vorteil. Aus diesem Grund ist die Zugabe von wachstumsförderndem FKS wiederum kontraproduktiv. Diese angesprochenen Nachteile der H29-Zellen könnten ursächlich zu der beobachteten ineffizienten Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} beitragen und erfordern daher die Entwicklung einer neuen, effektiveren Helferzelllinie.

3.2.2.2. Herstellung neuer Helferzellen

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass sich die Helferzelllinien LTK⁻-394, LTK⁻-460 und H29 eine Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} nicht ausreichend unterstützen, sollte eine neue, effizientere Zelllinie entwickelt werden. Für eine erfolgreiche Transkomplementierung von replikationsdefizienten SeV sollte diese Helferzelle folgende Kriterien erfüllen:

- hohe Infizierbarkeit
- hohe Kapazität für Produktion von Viruspartikel
- Robustheit gegenüber Virusinfektion und mechanischen Einflüssen (häufiger Mediumwechsel oder Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen)
- gute Transfizierbarkeit

- hohe Fremdgenexpression
- Erfüllung von GMP (*good medical practice*)-Standards - die Zelle sollte gut charakterisiert sein und keine möglicherweise schädlichen Elemente im Genom beherbergen

Für die Transkomplementierung von SeV Δ N in Helferzellen sollten sowohl das P- als auch das N-Gen in Helferzellen integriert werden. Da das N-Protein alleine möglicherweise einen starken zytopathischen Effekt auslöst und unspezifisch mit zellulärer RNA interagiert, könnte, wie bereits in LTK⁻ 460- und H29-Zellen die gleichzeitige Anwesenheit von P-Protein nötig sein.

Für die Selektion der neuen stabil transfizierten Zellen sollten Antibiotika zum Einsatz kommen gegen die die eingesetzten Expressionsplasmide zusätzlich eine Resistenz vermitteln. Auf diese Weise überleben nur solche Zellen in Gegenwart eines Antibiotikums, die auch das entsprechende Resistenzgen stabil exprimieren. Die Selektion von Helferzellen, die zwei virale Transgene stabil exprimieren, kann durch zwei verschiedene Antibiotikumsresistenzen erreicht werden. Bevor nun solche Helferzellen entwickelt werden konnten, mussten Expressionsvektoren für die stabile Integration der SeV-Transgene (N und P) bereitgestellt werden.

3.2.2.2.1. Modifikation von Expressionsvektoren zur stabilen Transfektion von Zellen

Damit Helferzellen dauerhaft virale Proteine herstellen können, müssen entsprechende Genkopien in ihr Genom integriert werden. Diese Gene sollen dann möglichst oft abgelesen werden. Das in die Zelle einzubringende Gen befindet sich zunächst auf einem Expressionsplasmid und ist dort von verschiedenen Regulationselementen umgeben, die einen maßgeblichen Einfluss auf den Expressionslevel und die Stabilität der Transkripte haben. Da in dieser Arbeitsgruppe vorhandenen Expressionsvektoren nicht mehr dem aktuellsten Stand der Forschung entsprachen, sollte modernere Vektoren verwendet werden, die durch neuartige Kombination von Regulationselementen eine stärkere und länger andauernde Transgenexpression in Zellen auslösen. Während Promoterbereiche in älteren Plasmiden oft ohne zusätzliche *enhancer*-Elemente vorkommen, wird eine Genexpression in modernen Konstrukten durch *enhancer*- und zusätzlichen *intron*-Sequenzen gesteigert. Darüber hinaus können bestimmte Elemente die Haltbarkeit von mRNAs deutlich erhöhen, was ebenfalls eine stärkere Genexpression zur Folge hat. In dieser Arbeit wurden zwei Wege verfolgt um möglichst effiziente Expressionsplasmide zu erhalten. Zum einen wurde ein gängiges, kommerziell erwerbbares Plasmid (pIRESpuro) eingesetzt, das nur geringfügig modifiziert wurde. Zum anderen sollten, erst vor kurzem als sehr effizient beschriebene, Kombinationen von Regulationselementen in einem Konstrukt (pPRECISE) neuartig zusammengesetzt werden. Letzterer Ansatz versprach aufgrund seiner Aktualität eine größere Expressionsleistung, barg aber zugleich, wegen der selbst durchgeführten Konstruktion, ein höheres Risiko einer Fehlfunktion.

Herstellung von pWIREp

In dem Plasmid pIRESpuro (Fa. Clontech) kann ein *gene of interest (goi)* unter der Kontrolle einer CMV-promotor-enhancer-Einheit exprimiert werden. Über eine IRES-Sequenz ist das *pac*-Gen (Puromycin-N-Acetyl-Transferase) angeschlossen, das eine Puromycinresistenz vermittelt. Der Vorteil dieser Konstruktion ist die gleichzeitige Expression von *goi* und Antibiotikumsresistenz über eine bicistronische mRNA. Durch diese Verknüpfung exprimieren Zellen, die eine Puromycinresistenz aufweisen, ebenfalls das *goi*.

Um eine dauerhafte Expression durch pIRESpuro noch zu erhöhen, wurde als weiteres regulatorisches Element das WPRE (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*) in die Transkriptionseinheit vor das Polyadenylierungssignal eingesetzt. Die Wirkung des WPRE wird mit einer erhöhten Stabilität der mRNA und einem effizienteren Export der mRNA aus dem Zellkern in Verbindung gebracht (Popa et al., 2002). Die Sequenz des WPRE wurde aus dem Plasmid pAAV2-CMV-eGFP (von A. Auricchio) mit *Bam*HI und *Bgl*II ausgeschnitten und in das mit *Fba*I geschnittene pIRES-Plasmid zu pWIREp (Abb. 12) eingesetzt.

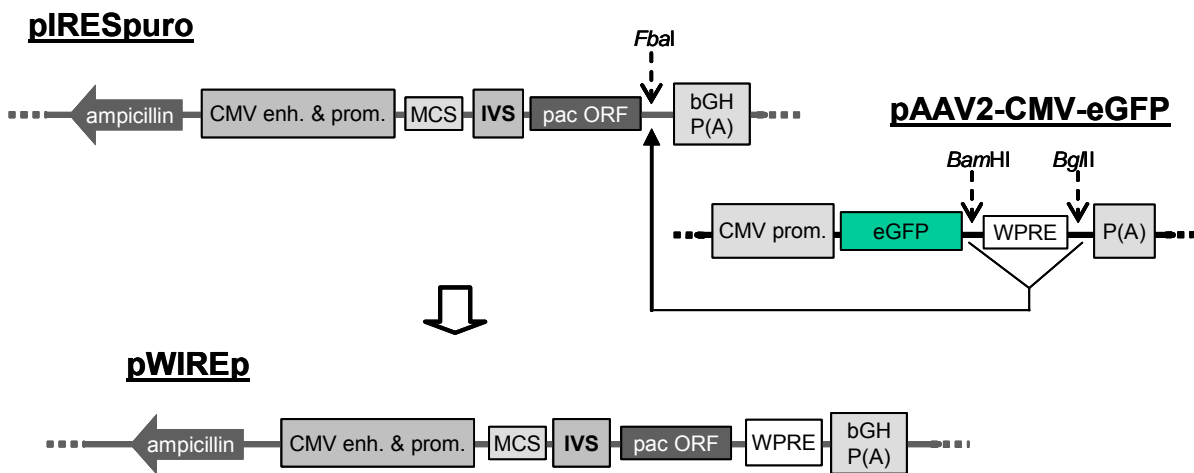


Abbildung 12: Herstellung des Expressionsplasmids pWIREp aus den beiden Ausgangsplasmiden pIRESpuro und pAAV2-CMV-eGFP.

Um die Funktionalität dieses neuen Konstrukts zu testen wurde ein eGFP-Gen als Transgen in pWIREp eingesetzt (pWIREp-eGFP). In einer anschließenden Transfektion von HeLa-Zellen konnte nur eine geringfügig stärkere eGFP-Expression ab 2 d p.t. festgestellt werden, jedoch hielt diese ca. zwei Tage länger an als bei einer Transfektion des Plasmids ohne WPRE.

Die Konstruktion des zweiten alternativen Expressionsplasmids, das eine Kombination aus Elementen verschiedener Plasmide darstellt, wird im Folgenden beschrieben.

Herstellung von pPRECISE_{neo}

In einer Arbeit von Zhi-Li Xu (Xu et al., 2001) wurden verschiedene Regulations- und Steuerelemente für die Expression eines Reportergens in verschiedenen Kombinationen getestet. Im Resultat konnte eine neuartige Kombination von Regulatorelementen, im Vergleich zu einem gängigen, kommerziell erwerbbaaren Expressionskonstrukt (pGL3 von Fa. Promega), die Aktivität eines Reporterproteins um mehr als Fünfzehnfache steigern. Daher sollte diese Expressionseinheit, aus der Kombination von Regulatorelementen aus dem Plasmid pCMVSL3, erhalten von H. Mizuguchi (Tokyo, Japan), in einem neuen Expressionsvektor Anwendung finden.

Wie in Abb. 13 beschrieben, wurde die Expressionseinheit, nachdem das Reportergen für die Luciferase über *Xba*I-Verdau entfernt worden war, mit dem *backbone* des Plasmids pcDNA3.1 (Fa. Invitrogen), der über die Gene für Ampicillin- und Neomycin-Resistenz verfügt, über die Schnittstellen für *Bam*HI und *Nde*I verknüpft. Danach wurde dem Zwischenprodukt pcDNISE mittels PCR über den mutagenen *forward primer* pcMCSfw eine neue MCS (*multiple cloning site*) eingefügt, die verschiedene oft benötigte Restriktionsschnittstellen aufweist. Der *reverse primer* pcS40rv lagerte sich in der Sequenz des Polyadenylierungssignals an, wodurch das DNA-Fragment mit der neuen MCS über die singulären Schnittstellen für *Eco*RI und *Dra*III zum neuen Zwischenprodukt pCISE zusammengesetzt werden konnte. Als letztes wurde das Element WPRE (s. pWIREp) vor das Polyadenylierungssignal gesetzt, um post-transkriptionell die Genexpression zu erhöhen. Die Sequenz des WPRE wurde aus dem Plasmid pAAV2-CMV-eGFP, erhalten von A. Auricchio (Neapel, Italien), mit *Bam*HI und *Bgl*III ausgeschnitten und in das mit *Bam*HI verdauten pCISE-Vektor zum finalen Konstrukt pPRECISE_{neo} eingefügt.

Um das neue Expressionskonstrukt zu testen wurde eine Kopie des eGFP-Gens zum pPRECISE-eGFP eingesetzt. Während einer Testtransfektion von HeLa-Zellen konnte eine im Vergleich zu pcDNA3-eGFP-Transfektionen leicht stärkere und deutlich länger andauernde (ca. 3-4 d länger) eGFP-Expression beobachtet werden.

Wie sich später herausstellte vermittelte das Plasmid pWIREp im Vergleich zu pPRECISE eine deutlich schwächere Transgenexpression (s. 3.2.2.2.5). Daher sollte für die Herstellung der Helferzelle mit SeV N- und P-Genen ein zweites pPRECISE-Konstrukt geschaffen werden, das ein anderes Resistenzgen als das Neomycin-Gen trägt. Seine Herstellung soll der Übersichtlichkeit halber an dieser Stelle bereits geschildert werden.

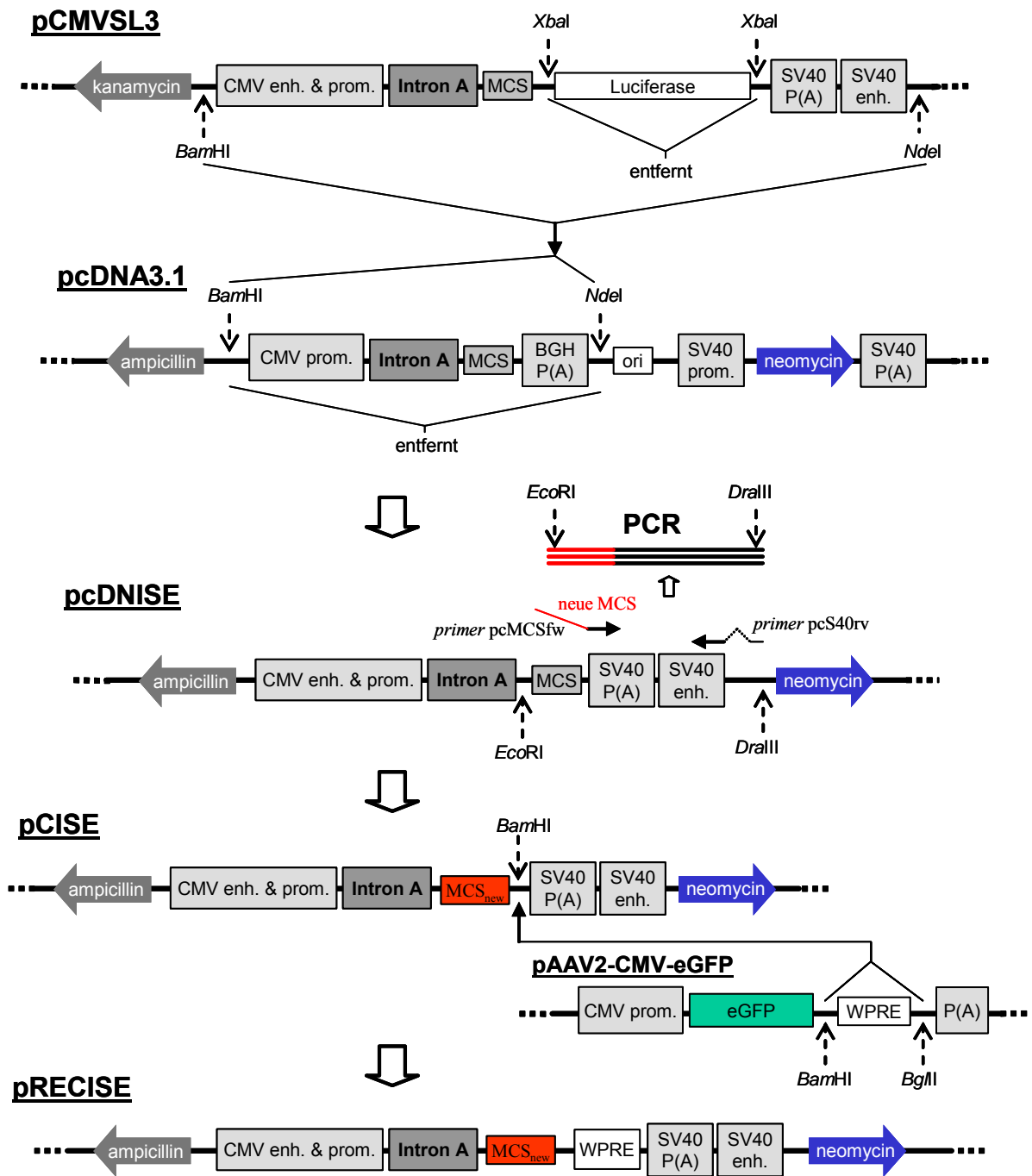


Abbildung 13: Herstellung des Expressionsplasmids pPRECISE aus den beiden Ausgangsplasmiden pCMVSL3 und pcDNA3.1. In das Zwischenprodukt pcDNISE wurde eine neu synthetisierte *multiple cloning site* (MCS) eingesetzt. In das Zwischenprodukt pCISE wurde das *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (WPRE) eingesetzt.

Herstellung von pPRECISE_{hyg}

Damit Helferzellen mit den beiden SeV-Genen N und P, integriert in zwei Vektorkonstrukte, stabil transfiziert und anschließend selektioniert werden konnten, musste neben pPRECISE_{neo} eine weiteres pPRECISE-Konstrukt mit einer von Neomycin verschiedenen Antibiotikumsresistenz geschaffen werden. Für das zweite pPRECISE-Konstrukt wurde das Neomycin- gegen ein Hygromycin-

Resistenzgen ausgetauscht, das aus dem, in unserer Gruppe vorhandenen, Plasmid pcDNA5/TO-eGFP stammte. Über die zwei Restriktionsschnittstellen für *Xma*I und *Pci*I konnte der Bereich mit der Hygromycinresistenz anstelle des Neomycin-Gens in pPRECISE eingefügt werden (Abb. 14).

pPRECISE-neo

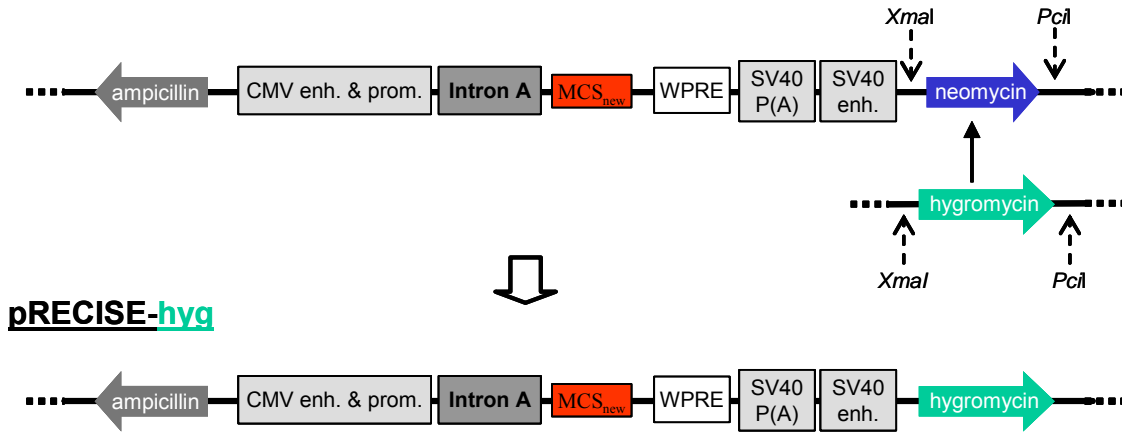


Abbildung 14: Herstellung des Expressionsplasmids pPRECISE_{hyg}. Das Neomycin-Resistenzgen aus pPRECISE_{neo} wurde gegen ein Hygromycin-Resistenzgen über die Restriktionsschnittstellen *Xma*I und *Pci*I ausgetauscht.

Um eine vergleichbar hohe Expression wie durch das pPRECISE_{neo}-Plasmid durch das neue pPRECISE_{hyg}-Plasmid zu überprüfen, wurde der eGFP-ORF eingesetzt. In einem parallel durchgeführten Transfektionsversuch mit pPRECISE_{neo}- und pPRECISE_{hyg}-eGFP konnte eine vergleichbar hohe eGFP-Expression festgestellt werden.

Herstellung von pWIREp-P, pPRECISE_{neo}-N und pPRECISE_{hyg}-P

Um das Plasmid pWIREp für die Herstellung von Helferzellen einsetzen zu können, wurde als Transgen das SeV P-Gen inseriert (= pWIREp-P). Dieses Konstrukt sollte zunächst in einem, erst später beschriebenen, Testversuch zur Vermehrung replikationsdefizienter SeV über zelluläre Transkomplementierung eingesetzt werden (3.2.2.2.5).

Um mit Hilfe der pPRECISE-Plasmide Helferzellen für eine Transkomplementierung von SeV Δ N herzustellen, wurden nun der ORF des N-Gens in pPRECISE_{neo} und der ORF des P-Gens, da sich ja der pWIREp-P-Vektor später als ungeeignet herausstellte, in pPRECISE_{hyg} inseriert.

Alle Transgeninsertionen erfolgten über die Restriktionsschnittstellen für *Age*I und *Not*I. Dazu mussten zunächst der N- und der P-ORF über PCR durch mutagene *primer*-Paare mit diesen Schnittstellen versehen werden. Für den N-ORF wurde als *template* das Plasmid pTM-N und die *primer* AgeNfw und NotNrv verwendet, für den P-ORF das Plasmid pTM-P C'(-) zusammen mit dem *primer*-Paar AgePC'(-)/NotPrv. Die beiden gereinigten PCR-Produkte wurden mit *Age*I und *Not*I verdaut und in die analog geschnittenen, jeweiligen Empfängerplasmide ligiert.

Die nun vorhandenen Plasmide pRECISE_{neo}-N und pRECISE_{hyg}-P sollten bei der stabilen Transfektion von Zellen zur Anwendung kommen.

3.2.2.2. Auswahl geeigneter Zelllinien

Bevor nun Zellen stabil transfiziert wurden, sollte eine Zelllinie gefunden werden, die sich gut für die Etablierung von Helferzellen eignet. Bei der Auswahl einer Zelllinie sollten verschiedene Kriterien beachtet werden. Von besonderer Bedeutung für die Helferzellen ist ihre Robustheit. Bei der Produktion eines viralen Vektors kann die Zelle durch die Virusinfektion selbst aber auch durch mechanische Einflüsse wie der Wechsel des Kulturmediums oder das Schwenken der Kultur belastet werden. Dazu kann auch die Abwesenheit von FKS in der Kultur erforderlich sein. Zwar teilen sich Zellen durch FKS schneller, weshalb eine möglicherweise langsame Virusproduktion durch ein schnelles Altern der Kultur limitiert wäre, doch könnten virale Vektoren, die in FKS-haltigem Medium gewachsen sind, Verunreinigungen aufweisen, die dem GMP-Standard nicht genügen. Eine weitere notwendige Eigenschaft einer Helferzelle ist die Fähigkeit große Mengen an Viruspartikel produzieren und freisetzen zu können. Außerdem müssen sich die Zellen gut transfizieren lassen, um überhaupt fremde DNA in ihren Zellkern befördern zu können. Diese angesprochenen Kriterien sollten nun der Reihe nach für vier Zelllinien (CHO-K1, CV-1, Vero und LLC-MK₂) überprüft werden, die in langjähriger Erfahrung in unserer Arbeitsgruppe als besonders tauglich für eine Virusproduktion aufgrund der oben genannten Kriterien eingeschätzt wurden.

Tabelle 3: Evaluierung der Zellmorphologie während einer SeV-wt-Infektion.

		24 h p.i. ^(*)	48 h p.i. ^(*)	72 h p.i. ^(*)
CHO-K1	- FKS	++	alle tot	
	+ FKS	++	alle tot	
CV-1	- FKS	+	++	alle tot
	+ FKS	+ / -	+	alle tot
Vero	- FKS	+ / -	++	alle tot
	+ FKS	++	alle tot	
LLC-MK₂	- FKS	+	++	+++
	+ FKS	+ / -	++	+++

(*): Stärke des CPE entspricht Anzahl an „+“

Um zu überprüfen wie belastbar diese Zellen sind, wurden sie mit SeV-wt infiziert (*moi* 3) und anschließend in An- (10%) oder Abwesenheit von FKS im Kulturmedium inkubiert. Die Entwicklung des Zellzustandes wurde über einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet. Wie in Tabelle 3 dokumentiert, erwiesen sich CHO-K1-Zellen als wenig widerstandsfähig. Die Anwesenheit von FKS spielte dabei keine Rolle. Vero- und CV-1-Zellen waren deutlich robuster, wobei Vero-Zellen, erstaunlicherweise, ohne FKS länger überlebten. Möglicherweise fördert FKS

eine Virusvermehrung in den Zellen, wodurch diese auch stärker belastet werden und daher schneller zugrunde gehen. LLC-MK₂-Zellen zeigten die höchste Widerstandsfähigkeit. Zwar war der CPE 3 d p.i. deutlich erkennbar, doch waren nur wenige Zellen abgestorben.

Als nächstes wurde die Fähigkeit der einzelnen Zelllinien neue Viruspartikel zu produzieren analysiert. Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen mit SeV-wt (*moi* 3) infiziert und in Gegenwart von 10% FKS inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium erneuert. Mit Hilfe des KID-Tests wurden 2 d p.i. die Virustiter der Kulturüberstände bestimmt. Dabei traten große Unterschiede zwischen den Zelllinien auf. Während CHO-K1- und CV-1-Zellen nur 6,4 bzw. $12,8 \times 10^6$ infektiöse VP freisetzen, erwiesen sich Vero- und LLC-MK₂-Zellen mit 51,2 bzw. $102,4 \times 10^6$ infektiösen VP als wesentlich leistungsfähiger (Abb. 15).

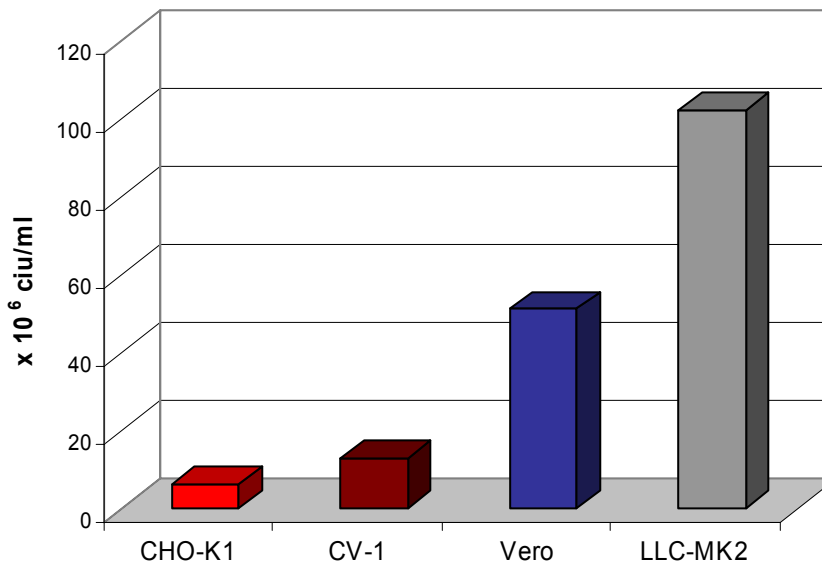


Abbildung 15: Anzahl freigesetzter, infektiöser Viruspartikel aus infizierten CHO-K1-, CV-1-, Vero- und LLC-MK₂-Zellen. Je $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden mit SeV-wt (*moi* 3) infiziert. 2 d p.i. wurden aus den Kulturüberständen die Anzahl der Nachkommenviren durch den KID-Test bestimmt.

3.2.2.2.3. Auswahl des Transfektionsreagenzes

Als letztes Kriterium wurde die Transfizierbarkeit der Zellen untersucht. Um virale Transgene zusammen mit den Antibiotikaresistenzen in die zellulären Genome zu integrieren, muss die fremde DNA zunächst in die Zelle befördert werden. Bei der Transfektion von eukaryontischen Zellen konnten Reagenzien, die auf kationischen Lipiden basieren, bislang sehr gute Ergebnisse erzielen (Simberg et al., 2004). Da die Effizienz solcher Reagenzien, je nach transfiziertem Zelltyp, starken Schwankungen unterworfen sein kann, sollten nun sechs verschiedene Reagenzien für die Transfektion von CHO-K1-, CV-1-, Vero- und LLC-MK₂-Zellen getestet werden. $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden jeweils mit $1,0 \mu\text{g}$ des Plasmids pPRECISE-eGFP transfiziert. Da für die verschiedenen

Transfektionsreagenzien unterschiedliche Verhältnisse von DNA zu Reagenz zu einer optimalen Ausbeute führen können (s. Angaben des Herstellers), wurden von jedem Reagenz, wie in Tabelle 4 aufgelistet, mindestens drei Verhältnisse getestet.

Die Auswertung erfolgte 2 d p.t. Für einen Vergleich der Transfektionseffizienz zwischen den ausgewählten Zelllinien wurde von jedem Reagenz jeweils nur das effizienteste DNA:Reagenz-Verhältnis verwendet (s. fett gedruckte Werte in Tabelle 4). Wie in Abbildung 16 dargestellt, ließen sich die Zellen mit sehr unterschiedlichem Erfolg transfizieren. CHO-K1-Zellen konnten mit Lipofectamine2000 und FuGENE 6 am besten transfiziert werden. Vero- und LLC-MK₂-Zellen ebenfalls, wobei die Effizienz mit 10 – 15% transfizierten Zellen ca. viermal niedriger lag als bei CHO-K1-Zellen. CV-1-Zellen lassen sich mit maximal 5% transfizierten Zellen die niedrigste Transfektionsrate auf.

Tabelle 4: Transfektionsreagenzien mit den jeweiligen Verhältnissen von DNA-Menge zu Reagenz.

	getestete Verhältnisse DNA:Reagenz			
Lipofectamine2000	1:2^(*)	1:3	1:5	--
Metafectene	1:7,5	1:10	1:12,5	1:15
Lipofectace	1:9	1:12	1:15	--
Effectene	1:10	1:15	1:25	--
Superfect	1:5	1:6	1:8	--
FuGENE 6	1:3	1:6	1:8	--

(*): Fett gedruckte Werte repräsentieren das jeweils effektivste Verhältnis.

Abschließend sollte die optimale Menge an DNA bestimmt werden, die durch Transfektion von den Zellen aufgenommen werden kann, ohne gleichzeitig einen zu starken zytopathischen Effekt auszulösen. Für diesen Versuch wurden stellvertretend für sehr robuste Zelllinien Vero-Zellen mit Lipofectamine2000 und für weniger robuste CHO-K1-Zellen mit FuGENE 6 transfiziert. Pro 6-well wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen – subkonfluent, wie für eine spätere Selektion benötigt – ausgesät und 24 h später mit 0,5, 1,0 und 2,0 µg DNA des Plasmids pPRECISE-eGFP transfiziert. 2 d p.t. wurde die Fluoreszenz der einzelnen Ansätze verglichen. Sowohl CHO-K1- als auch Vero-Zellen zeigten bei der Transfektion von 1,0 µg Plasmid-DNA eine stärkere grüne Fluoreszenz als bei einem Einsatz von 0,5 µg. Die Verwendung von 2,0 µg pPRECISE-eGFP führte allerdings zu keiner nennenswerten Steigerung mehr. Daher sollte für die Herstellung stabil transfizierter Zellen 1,0 µg DNA pro $0,2$ bis $0,4 \times 10^6$ Zellen eingesetzt werden.

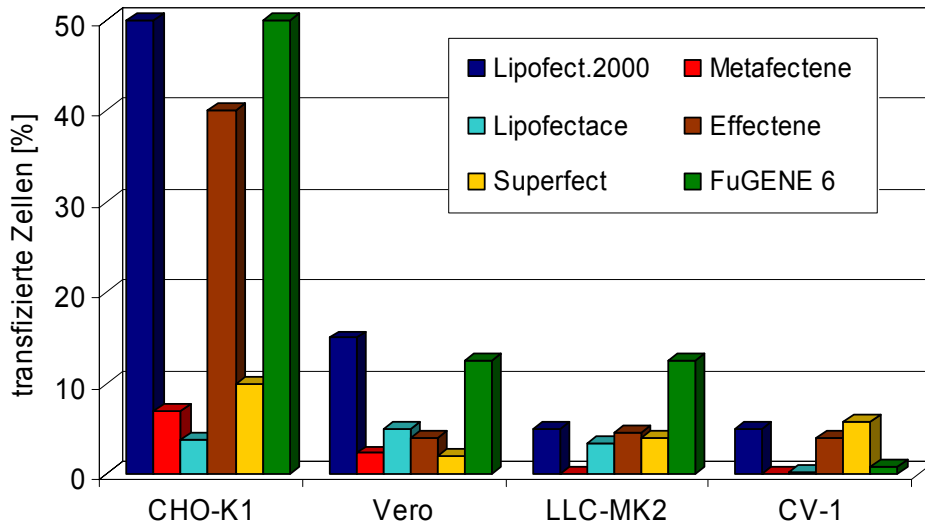


Abbildung 16: Transfektionseffizienz von CHO-K1-, Vero-, CV-1- und LLC-MK₂-Zellen. Transfektion von jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen mit $1,0 \mu\text{g}$ des Plasmids pPRECISE-eGFP und den angegebenen Transfektionsreagenzien. 2 d p.t. wurden grün fluoreszierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt.

3.2.2.2.4. Zusammenfassung der Auswahlkriterien

Nach den Einzelauswertungen der verschiedenen Kriterien für eine geeignete Helferzelle, sollte nun abgewogen werden, welche der vier Zelllinien in der Zusammenschau die besten Voraussetzungen für die Herstellung von Helferzellen bietet. Besonders wichtig erschien hierbei die Fähigkeit von Zellen eine große Menge an Viruspartikel herstellen zu können und besonders robust zu sein, da für die Herstellung von SeV-Deletionsmutanten mit einer lang andauernden Kultivierung (≥ 7 d) der Zellen gerechnet werden muss.

Die Verwendung von CV-1-Zellen erschien aus verschiedenen Gründen unvorteilhaft. Einerseits produzierten sie im Vergleich zu Vero- und LLC-MK₂-Zellen nur eine geringe Menge an VP, andererseits ließen sich CV-1-Zellen sehr schlecht transfizieren. CHO-K1-Zellen ließen sich zwar am besten transfizieren, allerdings setzen sie rund zehn- bis zwanzigmal weniger VP frei als Vero- und LLC-MK₂-Zellen. Ein weiterer Nachteil der CHO-K1-Zellen bestand in ihrer geringen Belastbarkeit, wie das Absterben der Zellen während einer SeV-wt-Infektion bereits nach zwei Tagen zeigt. Obgleich diese Zelle dem GMP-Standard genügen würde, wurde von ihrer Verwendung abgesehen. Vero- und LLC-MK₂-Zellen wiesen dagegen viele Vorteile auf, wobei ihre Eigenschaften sich nicht stark voneinander unterschieden. Zwar produzierten LLC-MK₂- etwas mehr VP als Vero-Zellen, doch konnten letztere effizienter transfiziert werden. Obwohl sich beide Zelltypen deutlich schlechter transfizieren lassen als CHO-K1-Zellen, kann bei einer Menge von 10 bis 15% von $0,5 \times 10^6$ Zellen davon ausgegangen werden ausreichend viele stabil transfizierte Zellklone zu erhalten. Beide Zelllinien erwiesen sich als robust gegenüber der SeV-wt-Infektion und mechanischen Einflüssen von außen. Kultivierung der Zellen unter Serumentzug war über einen

Zeitraum von mehr als sieben Tagen möglich. Es sollte nun sowohl mit Vero- als auch mit LLC-MK₂-Zellen versucht werden Helferzellen herzustellen, die eine Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} unterstützen. Für die Transfektion von Vero-Zellen sollte das Reagenz Lipofectamine2000, für LLC-MK₂-Zellen FuGENE 6 zum Einsatz kommen.

3.2.2.2.5. Stabile Transfektion ausgewählter Zelllinien

Bevor eine Transfektion der Zellen durchgeführt werden konnte, mussten in einem weiteren Vorversuch die Antibiotikatoleranzen für die Selektion positiver Klone bestimmt werden. Gegen Puromycin wird eine Resistenz durch das pWIREp-Plasmid vermittelt. Gegen G418 und Hygromycin durch pPRECISE_{neo} und -_{hyg}. Zellen, die das Resistenzgen nach der Transfektion stabil exprimieren, sollten eine normalerweise letale Dosis eines Antibiotikums überleben. Der Zeitraum bis Zellen ohne Resistenz absterben liegt für G418 und Hygromycin bei 7-10 Tagen und für Puromycin bei 5-7 Tagen. Zur Bestimmung der letalen Dosen der Antibiotika wurden Vero- und LLC-MK₂-Zellen unterschiedlichen Konzentrationen der Antibiotika ausgesetzt und über einen entsprechenden Zeitraum beobachtet. Dabei war zu beachten, dass die Zellen subkonfluent ausgesät werden, denn die Antibiotika wirken nur zuverlässig auf sich teilende Zellen. Das Kulturmedium mit dem Antibiotikum wurde alle drei Tage erneuert. Die Menge eines Antibiotikums, die zu einem vollständigen Absterben der Kultur nach der zu erwarteten Zeit führte, wurde als Selektionskonzentration ausgewählt. Die in Tabelle 5 aufgeführten Werte wurden bei der späteren Selektion stabil transfizierter Zellklone angewandt.

Tabelle 5: Letale Dosen der Antibiotika G418, Hygromycin und Puromycin für Vero- und LLC-MK₂-Zellen.

	G418	Hygromycin	Puromycin
Vero	1500 µg/ml	200 µg/ml	2 µg/ml
LLC-MK₂	600 µg/ml	400 µg/ml	12 µg/ml

Damit waren alle Vorarbeiten für die Herstellung der neuen Helferzellen abgeschlossen.

Transfektion von Vero- und LLC-MK₂-Zellen mit pWIREp-P und pPRECISE_{neo}-N

Nachdem die Bedingungen für eine Transfektion von Vero- und LLC-MK₂-Zellen und eine anschließende Selektion positiver Zellklone bestimmt worden waren, sollten zur Überprüfung des Konzepts zunächst stabil transfizierte Zellklone erschaffen werden, die eine Vermehrung des, zu diesem Zeitpunkt bereits existenten, replikationsdefizienten SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} unterstützen. Anhand dieses Systems sollte getestet werden, wie gut das Prinzip der Vermehrung replikationsdefizienter SeV über zelluläre Transkomplementierung funktioniert. Gleichzeitig könnte eine neue, im Vergleich zu H29-Zellen verbesserte Helferzelle für eine Vermehrung von SeV P Δ 2-

77 geschaffen werden. Obwohl die Transfektion des SeV P-Gens für eine Transkomplementierung von SeV P Δ 2-77 ausreichen würde (Schlecht, 2004), sollte im Hinblick auf die spätere Herstellung von Helferzellen für eine SeV Δ N-Vermehrung bereits hier das SeV N-Gen zusätzlich transfiziert werden.

Je $0,2 \times 10^6$ LLC-MK₂- und Vero-Zellen wurden mit je 1,0 μ g pWIREp-P und pRECISE-N transfiziert. Dabei wurden die LLC-MK₂-Zellen mit FuGENE 6 mit einem Reagenz:DNA-Verhältnis von 2,5:1 transfiziert und Vero-Zellen mit Lipofectamine2000 im Verhältnis 2:1. Ab 2 d p.t. wurden die Kulturen mit FKS-haltigem (10%) Selektionsmedium mit Puromycin und G418 für zwei Wochen kultiviert. Nach diesem Zeitraum waren alle nicht-resistenten Zellen abgestorben. Resistente Zellen bildeten dagegen bereits kleine Kolonien. Nach einer weiteren Woche waren diese groß genug, um vereinzelt zu werden. Von den Vero- und den LLC-MK₂-Ansätzen wurden jeweils 24 Kolonien isoliert, die im weiteren Verlauf in Parallelansätzen kultiviert wurden. Ein Aliquot der Ansätze wurde auf ihre Fähigkeit das replikationsdefiziente Virus SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} zu vermehren untersucht. Auf diese Weise konnte direkt überprüft werden, welche Zellklone Transgene in ausreichendem Maße für eine Virusvermehrung exprimieren. Anhand der eGFP-Expression in infizierten Zellen konnte eine Virusausbreitung mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops zuverlässig beobachtet werden. Es sollten nur solche Klone für eine weitere Verwendung kultiviert werden, die eine rasche Vermehrung von SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} zeigten.

Jeweils 24 Ansätze der Vero- und LLC-MK₂-Zellen wurden mit SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} (*moi* 0,01) infiziert. Durch den Einsatz von wenigen VP konnte eine potenzielle Ausbreitung der Viren über die Kultur gut verfolgt werden. Ab 2 d p.i. traten in drei Ansätzen mit Vero- und in fünf Ansätzen mit LLC-MK₂-Zellklonen einige grüne Zellen auf. Nach weiteren vier Tagen fluoreszierten die Vero-Zellansätze kaum noch. Von den LLC-MK₂-Zellen zeigten vier Zellklone kleine Virusausbreitungen (ca. 4-8 Zellen pro *spot*) und ein Klon (L23) große Ausbreitungen (ca. 40-60 Zellen pro *spot*).

Wenngleich die Ausbeute an Zellklonen, die eine Vermehrung von SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} effizient fördern, sehr gering war, so sah zumindest der Klon L23 vielversprechend aus und sollte daher monoklonalisiert werden. Die daraus resultierenden 39 Subklone wurden während einer weiteren Testinfektion mit SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} (*moi* 1) untereinander verglichen. Von denjenigen Subklonen mit der meisten grünen Fluoreszenz wurde die Anzahl an freigesetzten Nachkommenviren bestimmt. Dazu wurden die Kulturüberstände 4 und 5 d p.i. mit Hilfe des ZID-Tests (5.2.2.6) getitert. Subklon L23-17 setzte mit Abstand die meisten VP frei und erzielte von Tag drei bis vier einen Titer von $0,5 \times 10^6$ *ciu/ml* und von Tag vier bis fünf sogar 30×10^6 *ciu/ml*. In einer analogen Infektion wurde die Vermehrung von SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} in H29-Helferzellen, die bisher standardmäßig verwendet wurden, analysiert. Dabei zeigte sich, dass die H29-Zellen mit 21 x

10^6 c.i.u./ml einen ähnlich hohen Virustiter erzielen konnten, wie die neuen L23-Helferzellen, jedoch bereits 3 d p.i. die maximale Menge an VP freisetzen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es mit Hilfe der neuen Vektoren sofort gelungen war eine effizient das replikationsdefiziente SeV lde P Δ 2-77 F_{mut} vermehrende Helferzelllinie (L23) zu etablieren. Das Protokoll zur Herstellung von stabil transfizierten Helferzellen war also korrekt und konnte für zukünftige Helferzellen beibehalten werden. Erstaunlich an dieser Testtransfektion waren allerdings die geringe Ausbeute an gut funktionierenden Zellklonen und die schwache Steigerung der Virusproduktion gegenüber H29-Zellen. Eine mögliche Ursache konnte eine zu geringe Transgenexpression in den stabil transfizierten Zellen sein, die möglicherweise mit der Expressionsstärke der eingesetzten Vektoren (pWIREp-P und pPRECISE-N) in Zusammenhang stand. Um die Expressionsstärke der beiden Vektoren zu analysieren wurden $0,5 \times 10^6$ CHO-Zellen mit jeweils 0,5 μ g DNA von pPRECISE-eGFP oder pWIREp-eGFP transfiziert. Der Ansatz mit pPRECISE-eGFP wies bereits nach 24 h ca. 90% stark grün fluoreszierende Zellen auf. Der Ansatz mit pWIREp-eGFP enthielt dagegen zum einen ca. 50% weniger grüne Zellen, die darüber hinaus meist schwächer fluoreszierten. Nach 48 h war der Unterschied zwischen beiden Ansätzen noch deutlicher zu erkennen. Eine Wiederholung des Versuchs mit LLC-MK₂-Zellen führte zu einem ähnlichen Ergebnis, woraus geschlossen wurde, dass das pPRECISE-Plasmid eine deutlich höhere Genexpression vermitteln kann als pWIREp. Um für die Herstellung von Helferzellen zur Vermehrung von SeV Δ N nur Vektoren die eine starke Transgenexpression vermitteln können einzusetzen, sollte daher der Expressionsvektor pPRECISE_{hyg}-P (3.2.2.2.1) anstatt pWIREp-P zusammen mit pPRECISE_{neo}-N für die stabile Transfektion verwendet werden.

Transfektion von Vero- und LLC-MK₂-Zellen mit pPRECISE_{neo}-N und pPRECISE_{hyg}-P

Für eine Vermehrung von SeV Δ N sollten im Vergleich zu zuvor beschriebenen bessere Helferzellen hergestellt werden, die sowohl das SeV N- als auch das SeV P-Protein stabil synthetisieren. Die Gene für beide Proteine sollten über die Expressionsvektoren pPRECISE_{neo}-N und pPRECISE_{hyg}-P in die Zellen eingeschleust werden. Dabei wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurden die Zellen mit beiden Plasmiden gleichzeitig transfiziert. Zum anderen wurden Zellen seriell transfiziert, wobei die zuerst mit pPRECISE_{hyg}-P und positiv selektionierte Klone anschließend mit pPRECISE_{neo}-N transfiziert wurden. Dadurch sollten nur diejenigen Zellklone mit pPRECISE_{neo}-N transfiziert werden, die bereits vorher das P-Gen stabil in ihr Genom aufgenommen hatten. Hintergrund dafür war die Eigenschaft des N-Proteins zelluläre RNA zu komplexieren falls es nicht zusammen mit dem SeV P-Protein im N⁰-P-Komplex (2.4.3) in der Zelle vorliegt. Auf diese Weise sollten Zellklone, die eine nach Integration P-Gens stabil P-Protein synthetisieren, die Basis für die darauf folgende Integration und Expression des N-Gens bieten. Das

P-Protein kann dann das gebildete N-Protein im N⁰-P-Komplex löslich und damit für eine SeV Genom-Replikation verwendbar halten. Viel N-Protein ohne eine adäquate Menge an P-Protein würde den Zellen wohl stark schaden, da viel zelluläre RNA komplexiert und dadurch unbrauchbar werden würde. Eine große Menge an N-Protein in der Helferzelle wird für eine Replikation von SeV ΔN aber benötigt.

Subkonfluent ausgesäte Vero-Zellen, $0,2 \times 10^6$ Zellen pro 6-well, wurden mit jeweils $1,0 \mu\text{g}$ pPRECISE_{neo}-N und pPRECISE_{hyg}-P transfiziert oder zunächst nur mit $1,0 \mu\text{g}$ pPRECISE_{hyg}-P. Zwei Tage nach der Transfektion wurde den Doppel-Transfektionsansätzen Selektionsmedium mit G418 und Hygromycin und den Einfach-Transfektionsansätzen nur mit Hygromycin zugesetzt. Nach einer Selektionsdauer von ca. 10 Tagen waren alle nicht resistenten Zellen abgestorben. Resistente Zellen bildeten bereits kleine Kolonien, die nach einer Woche groß genug waren, um vereinzelt zu werden. Von den doppelt transfizierten Zellen wurden 59 Klone isoliert.

Von den Ansätzen, die nur mit pPRECISE_{hyg}-P transfiziert worden waren, wurden die überlebenden Zellen gemeinsam neu ausgesät und $0,2 \times 10^6$ Zellen bei einer Konfluenz von ca. 50% mit $1,0 \mu\text{g}$ pPRECISE_{neo}-N transfiziert. Nach einer weiteren Selektionsphase von 14 Tagen unter Einsatz von Hygromycin und G418 wurden 456 Zellklone isoliert. Die Ausbeute der seriell transfizierten Zellen war damit deutlich größer als die der gleichzeitig mit SeV N- und P-Genen transfizierten Zellen. Um diejenigen Zellklone zu finden, die sich für eine Vermehrung von SeV ΔN eigneten, wurden Testinfektionen mit SeV ΔN durchgeführt.

3.2.2.2.6. Identifizierung geeigneter Zellklone

Um aus den nach der Selektionsphase isolierten Zellklonen diejenigen zu identifizieren, die eine SeV ΔN-Vermehrung möglichst stark unterstützten, wurden von jedem Klon ca. $0,3 \times 10^6$ Zellen pro 12-well mit jeweils ca. 1000 *ciu* von SeV ΔN PE F_{mut} infiziert. Während einer anschließenden Inkubationsphase von fünf bis acht Tagen wurde die Entwicklung grün fluoreszierender Zellen verfolgt. Durch die Verwendung von nur 1 000 *ciu* konnte sichergestellt werden, dass mögliche Virusausbreitungen in den Kulturen gut beobachtet werden konnten. Für eine weitere Verwendung wurden solche Zellklone ausgewählt, die spätestens 3 d p.i. grüne Fluoreszenz aufwiesen und im Anschluss Anzeichen für eine Ausbreitung dieser Fluoreszenz zeigten, was auf eine Vermehrung der SeV ΔN-Partikel schließen ließ. Nach der ersten Testinfektion wurden auf diese Weise 22 der 456 seriell transfizierten und drei der 59 gleichzeitig doppelt transfizierten Zellklone (VPN-Klone) ausgewählt. Alle übrigen Zellklone wurden verworfen. Da die vorausgewählten Zellklone noch inhomogene, nicht monoklonale Kulturen darstellten, sollten in einer weiteren vergleichenden Testinfektion mit SeV ΔN PE F_{mut} die aussichtsreichsten Klone für eine spätere Monoklonalisierung identifiziert werden. Wiederum wurden ca. $0,3 \times 10^6$ Zellen pro 12-well jeweils mit 1 000 SeV ΔN-Partikel infiziert. Während der anschließenden Entwicklung der grünen Fluoreszenz konnten die

Zellklone in zwei Kategorien aufgeteilt werden. Die eine, zu der die meisten Klone gehörten, wies ab ca. 3 d p.t. schwach grüne Zellen auf, deren Fluoreszenz in der Folge nur langsam zunahm und sich kaum auf Nachbarzellen ausbreitete. Klone der zweiten Kategorie wiesen dagegen bereits 2-3 d p.i. deutlich grüne Zellen auf und ab 4 d p.i. konnten ca. 20 – 40 *spots* mit ca. 3-5 grünen Zellen beobachtet werden. Diese Entwicklung war sehr vielversprechend, so dass von diesen Klonen monoklonale Kulturen erstellt werden sollten. Es handelte sich bei diesen Klonen um zwei der ursprünglich gleichzeitig transfizierten (VPN11 und VPN44) und um den seriell transfizierten Klon VPN285. Nachfolgend soll genauer auf die Charakteristika dieser drei Klone mit Bezug zu einer SeV Δ N-Vermehrung eingegangen werden.

3.2.2.2.7. Charakterisierung der Helferzellklone VPN11, VPN44 und VPN285

Um die von diesen noch nicht monoklonalen Zellklonen produzierte Menge an viralen N- und P-Proteinen abschätzen zu können, wurde zunächst ein Western Blot angefertigt. Als Kontrollen wurden mit dem SeV-wt-infizierte Vero-Zellen und Zellen der bereits bestehenden, monoklonalen H29-Helferzelllinie verwendet.

Interessanterweise unterschieden sich alle drei neuen Klone signifikant in den synthetisierten Proteinmengen voneinander, obwohl sie bisher vergleichbar gut eine SeV Δ N-Vermehrung unterstützten. VPN285 produziert große Mengen an N- und P-Protein, die den Mengen der H29-Zelllinie ähneln (Abb. 17). VPN44 dagegen produziert fast kein P-Protein, dafür aber die größte Menge an N-Protein. VPN11 produziert kein P-Protein und eine geringere Menge N-Protein als VPN44 und VPN285.

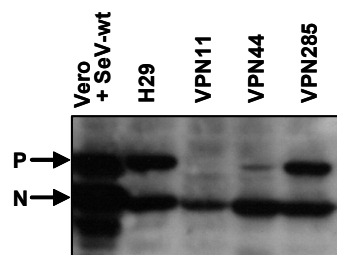


Abbildung 17: SeV N- und P-Transgenexpression in stabil transfizierten Helferzellen VPN11, VPN44 und VPN285. Auftrennung von 10 μ g Gesamtprotein aus Proteinzell-extrakten über SDS-PAGE. Nach Proteintransfer auf PVDF-Membran Nachweis der SeV N- und P-Proteine im Western Blot (ECL) durch anti-SeV-Serum (rb). Zu Vergleichszwecken wurden H29-Helferzellen und mit SeV-wt infizierte Vero-Zellen (*moi* 3, 2 d p.i.) analysiert.

Der Zellklon VPN285 schien aufgrund seiner relativ großen Mengen an N- und P-Protein der aussichtsreichste Kandidat für eine SeV Δ N-Vermehrung zu sein und wurde daher als erster monoklonalisiert. Dazu wurde eine Zellverdünnung angelegt, die ca. 0,5-1 Zelle pro 100 μ l enthielt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 100 μ l in ein 96-well gegeben, wobei insgesamt vier 96-well-Platten angelegt wurden. Nach einer zweiwöchigen Inkubationsphase der Zellen unter

Selektionsbedingungen zeigten 176 monoklonale Subklone ein normales Wachstumsverhalten und wurden daher wiederum in Testinfektionen auf ihre Fähigkeit eine SeV Δ N-Vermehrung zu unterstützen verglichen. Nach diesem ersten Auswahlverfahren verblieben sieben Subklone. Diese sollten nun wiederum anhand eines Western Blots charakterisiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass die synthetisierten Mengen an N- und P-Protein zwischen den einzelnen Subklonen stark schwankten (Abb. 18). Besonders die Menge an synthetisiertem P-Protein variierte stark, so dass manche Klone fast kein P mehr aufwiesen (-46, -123) und andere ca. halb so viel P- wie N-Protein (-166, -169).

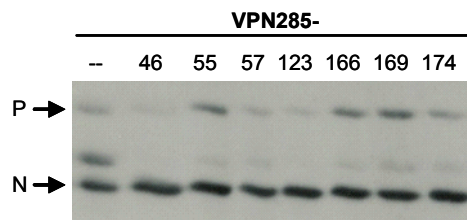


Abbildung 18: SeV N- und P-Transgenexpression in VPN285-Subklonen. Auftrennung von 10 μ g Gesamtprotein aus Proteinzellextrakten über SDS-PAGE. Nach Proteintransfer auf PVDF-Membran wurden die SeV N- und P-Proteine im Western Blot (ECL) durch anti-SeV-Serum (rb) nachgewiesen. Als Vergleich wurde der nicht monoklonalisierte VPN285-Ausgangszellklon eingesetzt.

In einer finalen Testinfektion mit SeV Δ N stellte sich heraus, dass trotz Monoklonalisierung und guter Transgenexpression keiner der Subklone in der Lage war über einen Zeitraum von 10 Tagen eine SeV Δ N-Vermehrung so zu unterstützen, dass anschließend eine größere Anzahl an infektiösen VP aus ihrem Zellkulturüberstand isoliert werden konnte als ursprünglich zur Infektion eingesetzt worden war. Trotz des Vorhandenseins von P-Proteinen in der Zelle um N-Protein löslich zu halten, vermochte keines der verschiedenen Verhältnisse von N- und P-Proteinen in den einzelnen Subklonen eine SeV Δ N-Vermehrung ausreichend zu fördern. Im Vergleich der einzelnen Subklon-Infektionen traten sogar kaum Unterschiede auf, unabhängig ob viel P-Protein vorhanden war oder nicht. Möglicherweise spielt eine zelluläre P-Expression zusätzlich zu einer N-Expression keine entscheidende Rolle für eine SeV Δ N-Vermehrung, da ja SeV Δ N selbst noch für das P-Protein kodiert und, sobald es eine Helferzelle infiziert hat, möglicherweise selbst ausreichend P-Protein für eine Bindung der N-Protein im N⁰-P-Komplex synthetisieren kann. Die von den Helferzellen ohne gleichzeitige P-Expression hergestellte Menge an SeV N-Protein entspricht möglicherweise der gerade noch von der Zelle ertragbaren Menge ohne ernsthaft Schaden zu nehmen.

Nachdem durch die VPN285-Subklone keine Amplifikation von SeV Δ N erreicht werden konnte, verblieben als weitere aussichtsreiche Zellklone noch VPN11 und VPN44. VPN44 zeigte im Western Blot zwar eine sehr geringe Menge an P-Protein aber dafür eine größere Menge an N-

Protein als VPN285 (Abb. 17). Da die Menge an P-Protein möglicherweise unerheblich für eine SeV Δ N-Vermehrung ist, aber vielleicht eine größere Menge an N-Protein als in VPN285 nötig ist, wurden monoklonale Kulturen von VPN44 erstellt. Wie bei Klon VPN285 wurden aus den monoklonalen Subklonen (59 Stück) über eine vergleichende Testinfektion mit SeV Δ N (1 000 *ciu*) derjenige Subklon ermittelt, der eine SeV Δ N-Vermehrung am effizientesten fördert. Eine mit diesem Subklon, VPN44-21, und dem besten VPN285-Subklon, VPN285-169, durchgeführte vergleichende SeV Δ N-Infektion zeigte eine sehr unterschiedliche Vermehrung von SeV Δ N für beide Zellklone (Abb. 19). Wenngleich die Stärke der grünen Fluoreszenz bei VPN285-169 vergleichbar war zu VPN44-21, so konnte sich SeV Δ N in letzteren Zellen deutlich schneller und in größerem Ausmaß ausbreiten. Während bei VPN285-169 ab 7 d p.i. kein Fortschritt mehr erkennbar war, konnte VPN44-21 bis mindestens 15 d p.i. eine Vermehrung noch fördern. Hier zeigte sich ein erster deutlicher Vorteil der neuen Helferzellen gegenüber der H29-Zellen, die sich höchstens über ca. sieben Tage kultivieren lassen. Da sich die SeV Δ N-Mutante über Helferzellen aber scheinbar nur langsam vermehren lässt, ist eine lange Inkubationszeit der infizierten Helferzellkultur von essentieller Bedeutung.

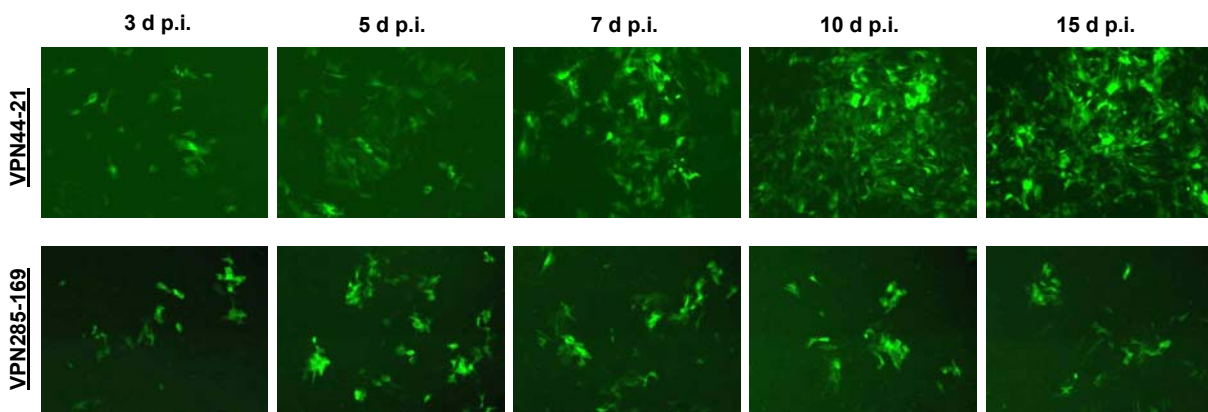


Abbildung 19: Infektion von VPN44-21 und VPN285-169 mit SeV Δ N. Infektion von $0,3 \times 10^6$ Zellen mit je 1 000 *ciu* SeV Δ N. Vergleich der SeV Δ N-Ausbreitung über die Kulturen anhand der eGFP-Transgenexpression 3 bis 15 d p.i.

Um nun zu überprüfen, wie groß die in VPN44-21-Zellen produzierte Menge an SeV Δ N-Nachkommen war und ob eine Steigerung der VP im Vergleich zu der für die Infektion eingesetzten Menge erzielt worden war, wurden Kulturen von $0,3 \times 10^6$ Zellen (im 12-*well*) mit einer möglichst großen Menge von SeV Δ N (6 000 *ciu* in 300 μ l) infiziert. Nach einer anfänglichen Inkubationsphase von drei Tagen wurden alle zwei Tage die Kulturüberstände gewechselt und auf enthaltene Nachkommenviren untersucht. Dazu wurden mit einem Teil der ÜS frisch ausgesäte VPN44-21-Zellen infiziert und ca. 3 d p.i. die Anzahl grün fluoreszierender Zellen bestimmt. Daraus konnte die von den Zellen freigesetzte Menge an SeV Δ N-Nachkommen errechnet werden. Obwohl

die mit 6 000 *ciu* infizierten Kulturen ca. ab 8 d p.i. viele große grün fluoreszierende Bereiche aufwiesen, produzierten die VPN44-21 kaum Nachkommenviren. Nach einer Passage der ÜS traten weniger grün fluoreszierende Zellen auf als bei der zuvor durchgeführten Infektion, woraus geschlossen werden konnte, dass keine SeV Δ N-Vermehrung stattgefunden hatte. SeV Δ N konnte also mit den VPN44-21-Helferzellen nicht effizient vermehrt werden.

Erstaunlich erschien die Tatsache, dass sich die grüne Fluoreszenz, als Kennzeichen für infizierte Zellen, während wiederholt durchgeführten SeV Δ N-Infektionen von VPN44-21 immer nur lückenhaft über die infizierte Kultur ausbreitete. Es fand nie eine vollständige Infektion aller vorhandenen Zellen statt. Es machte daher den Anschein als sei die Kultur nicht homogen, möglicherweise nahm die Expression der viralen Transgene mit zunehmendem Alter der Zelllinie ab – ein als *gene silencing* bekannter Effekt, der v.a. durch zelltoxischen Transgene bewirkt wird. Um diese Möglichkeit zu untersuchen sollten die viralen Transgenprodukte einer VPN44-21-Kultur über Immunfluoreszenz (IF) detektiert werden, da so die Transgenexpression in allen Zellen individuell begutachtet werden kann, während ein Western Blot nur den Durchschnitt aller Zellen zusammen repräsentiert. Als Vergleich und Kontrolle wurden Zellen der noch nicht untersuchten VPN11-Linie und uninferierte und mit dem SeV-wt-infizierte Vero-Zellen verwendet. Die Detektion der viralen Proteine erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen das SeV N-Protein, die anschließend mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten zweiten Antikörpern sichtbar gemacht werden konnten.

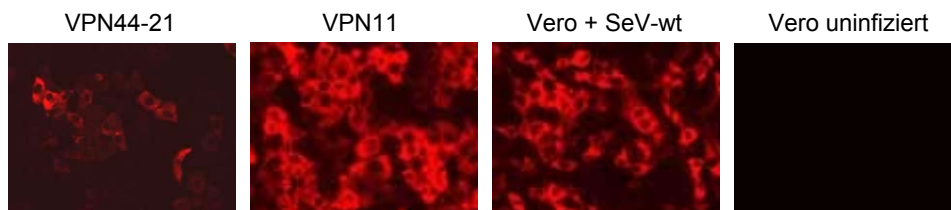


Abbildung 20: Transgenexpression in den Helferzelllinien VPN44-21 und VPN11. Detektion des SeV-N-Proteins über Immunfluoreszenz mit anti-SeV-N-Antikörper. Detektion der anti-N-Antikörper mit Alexa Fluor®568 goat anti-rabbit IgG. Zu Vergleichszwecken wurden SeV-wt-infizierte (*moi* 1, 1 d p.i.) und uninferierte Vero-Zellen untersucht.

Wie in Abbildung 20 deutlich zu erkennen ist zeigten die VPN44-21-Zellen eine meist schwächere und stark inhomogen verteilte Fluoreszenz im Vergleich zu VPN11- und SeV-wt-infizierten Vero-Zellen. Die SeV-N-Transgenexpression in VPN44-21 variiert also stark zwischen den einzelnen Zellen einer Kultur und konnte als Ursache für die beobachtete lückenhafte SeV Δ N-Infektion angesehen werden. Zwei Gründe waren für die inhomogene SeV-N-Transgenexpression denkbar. Entweder war die bereits monoklonalisierte Kultur von VPN44-21 aufgrund der hohen Zytotoxizität des N-Proteins durch *gene silencing* nach weiteren 10 Passagen wieder inhomogen geworden oder die N-Expression in VPN44-21 unterlag Schwankungen, die z.B. die Phasen des Zellzyklus bedingt

sein könnten. Um zu überprüfen, ob das N-Protein tatsächlich ein so starker Induktor für *gene silencing* ist, wurde eine weitere Monoklonalisierung der VPN44-21-Zellen durchgeführt und daraus entstandene Subklone unmittelbar danach wiederum über IF analysiert. Dabei zeigte sich, dass sofort nach Monoklonalisierung ein vergleichbar inhomogenes Fluoreszenzmuster auftrat, wie es für VPN44-21 in Abb. 20 gezeigt ist, ein *gene silencing* also weniger wahrscheinlich ist.

Deswegen sollten als nächstes die Auswirkungen verschiedener Zellzyklusphasen auf die N-Transgenexpression untersucht werden. Dazu wurden VPN44-21-Zellen durch den Einsatz von Nocodazole synchronisiert. Nocodazole vermittelt einen Block des Zellzyklus zwischen G2- und M-Phase, indem es die Polymerisierung von Mikrotubuli für den Aufbau der Teilungsspindel unterdrückt. In Anwesenheit von Nocodazole durchlaufen alle Zellen ihren Zyklus bis zum Ende der G2-Phase und lösen sich dann vom Boden der Zellkulturflasche ab. Werden diese Zellen anschließend in ein frisches Kulturgefäß überführt und ohne Nocodazole kultiviert setzen alle Zellen ihren Zyklus mit der M-Phase fort und durchlaufen für mindestens drei Tage synchron den Zellzyklus. Auf diese Weise behandelte VPN44-21-Zellen wurden einen Tag nach der Synchronisierung über IF untersucht. Tatsächlich wiesen die synchronisierten VPN44-21-Zellen im Gegensatz zu den nicht-synchronisierten nun eine homogene und starke Fluoreszenz auf (Abb. 21). Für die als Vergleich genauso behandelten VPN11-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen synchronisierten und nicht-synchronisierten Zellen festgestellt werden.

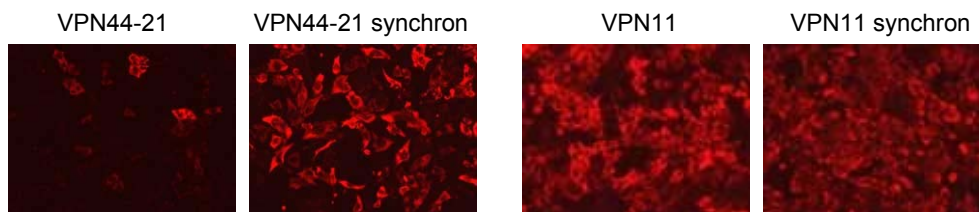


Abbildung 21: Transgenexpression in den Helferzelllinien VPN44-21 und VPN11 im synchronisierten und nicht-synchronisierten Zustand. VPN44-21- und VPN11-Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit 400 ng Nocodazole/ml Medium für 18 h inkubiert. Nach Neuaussaat der dabei abgelösten Zellen wurden SeV-N-Proteine über IF mit anti-SeV-N-Antikörpern markiert. Über die Detektion der anti-N-Antikörper mit Alexa Fluor®568 goat anti-rabbit IgG konnte ein Fluoreszenzsignal erzeugt werden. Als Vergleich wurden nicht-synchronisierte Zellen auf die gleiche Weise untersucht.

Nachdem die Ursache für die inhomogene SeV-N-Proteinverteilung in VPN44-21 gefunden worden war, wurden als nächstes zuvor synchronisierte VPN44-21-Zellen für eine Vermehrung von SeV Δ N eingesetzt. Wie bereits während der Infektion nicht-synchronisierter Zellen wurden alle zwei Tage die Kulturüberstände auf infektiöse SeV Δ N-Nachkommenpartikel überprüft. Erstaunlicherweise produzierten die synchronisierten Zellen nur unwesentlich mehr SeV Δ N-Partikel als die nicht-synchronisierten, so dass auch dieser Ansatz keine effiziente SeV Δ N-Vermehrung bewirken konnte.

Interessanterweise zeigten die VPN11-Zellen, als dritte neue Helferzelllinie, im Gegensatz zu VPN44-21-Zellen, bereits im nicht-monoklonalen Zustand, ein starkes und homogen verteiltes Fluoreszenzsignal nach der Detektion von SeV-N-Transgenprodukten (Abb. 20 & 21). Über eine Monoklonalisierung sollten nun Zellklone gewonnen werden, die durch eine starke N-Genexpression eine Vermehrung von SeV Δ N wirkungsvoll unterstützten. Aus 168 monoklonalen Subklonen wurde durch zwei vergleichende Testinfektionen mit SeV Δ N-Partikel (1 000 *ciu*) und einer abschließenden IF der fünf besten Subklone derjenige ermittelt, der die stärkste N-Transgenexpression aufwies und eine SeV Δ N-Vermehrung am wirkungsvollsten unterstützte. Dieser Subklon, VPN11-31, wurde zur Vermehrung von SeV Δ N mit 6 000 *ciu* infiziert. Obwohl bereits 1 d p.i. eine schwache grüne Fluoreszenz zu erkennen war und diese bis 4 d p.i. deutlich an Stärke zunahm, war die Bereitstellung von SeV-N-Proteinen auch durch die VPN11-31-Zellen nicht auszureichend, um eine SeV Δ N-Vermehrung so stark zu unterstützen, dass die gesamte Kultur infiziert werden konnte. Wiederum konnte aus den Kulturüberständen keine größere Anzahl an SeV Δ N gewonnen werden als ursprünglich für ihre Infektion eingesetzt worden war.

Zusammenfassend kann über die Entwicklung neuer Helferzellen festgehalten werden, dass die Zelllinien VPN11, VPN44 oder VPN285 zwar in der Lage sind eine Replikation von SeV Δ N zu unterstützen, diese allerdings so abläuft, dass sie zu keiner Vermehrung der Viren im Zellüberstand führt. Der Weg und die Auswahlverfahren, die zu allen beschriebenen Klone und Subklone geführt haben, sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Es erhärtete sich der Eindruck, dass die Menge an SeV N-Protein, die von einer Helferzelle produziert werden kann, limitiert und zu gering ist, um eine Vermehrung von SeV Δ N effizient zu fördern.

Tabelle 6: Zusammenfassung des Auswahlprozesses der finalen Subklone VPN11-31, VPN44-21, VPN285-169.

Transfektion	gleichzeitig: pRE-N und		seriell: erst pRE-P, dann pRE-
	pRE-P		N
Selektion	↓		↓
erhaltene Klone	48		456
Testinfektionen	↓	↓	↓
beste Zellklone	VPN11	VPN44	VPN285
Monoklonalisierung	↓		↓
erhaltene Subklone	168	59	176
Testinfektionen, IF	↓		↓
beste Subklone	VPN11-31	VPN44-21	PN285-169

Wie in dem vergleichenden Western Blot in Abb. 17 gezeigt, scheinen die hier vorgestellten neuen Helferzellen, VPN285, VPN44 und VPN11, ebenfalls wie die ältere H29-Zelllinie nicht über den Wert von ca. 5% der Menge an N-Protein, das während einer SeV wt-Infektion synthetisiert wird, hinauszukommen. Auch wenn diese neuen Zelllinien deutlich robuster sind als die H29-Zellen, kann möglicherweise bedingt durch diese geringe Menge an N-Protein auch trotz deutlich längerer Inkubationszeit einer infizierten Kultur keine ausreichend starke SeV Δ N-Replikation stattfinden. Interessanterweise scheint eine gleichzeitige Expression von P-Protein zusammen mit N-Protein in Helferzellen keine entscheidende Rolle für die Fähigkeit eine Vermehrung von SeV Δ N zu fördern zu spielen. Während VPN285 viel und VPN44 sehr wenig P-Protein synthetisieren, konnte in VPN11 kein P-Protein im Western Blot nachgewiesen werden. Dennoch kann in VPN11-Zellen während einer SeV Δ N-Infektion früher eine eGFP-Transgenexpression und eine Virusausbreitung festgestellt werden als in VPN285- und VPN44-Zellen.

Während SeV Δ P- und SeV P Δ 2-77-Mutanten in einigen der neu hergestellten Helferzellen sehr effizient amplifiziert werden können, z.B. SeV P Δ 2-77 in VPN285-169 mit ca. 20×10^6 *ciu/ml*, musste dieser Versuchsansatz zur Vermehrung von SeV Δ N ohne Erfolg beendet werden.

3.2.3. Vermehrung von SeV Δ N über transiente Transfektion

Stabil transfizierte Helferzellen erwiesen sich nicht als geeignetes System zur Amplifikation der Δ N-Mutanten. Auffällig war, dass es bei allen Helferzellen nur zu einer schwachen N-Proteinsynthese kam. Deswegen sollte nun eine Möglichkeit gesucht werden größere Mengen an SeV N-Protein für eine SeV Δ N-Vermehrung bereitzustellen. Da während der Herstellung stabil transfizierter Helferzellen Kopien eines Transgens unspezifisch in die zellulären Genome integrieren, kann die Expression solcher Transgene, abhängig von der Integrationsstelle im Genom, sehr unterschiedlich reguliert sein. Während des Selektionsprozesses von erfolgreich stabil transfizierten Zellklonen werden nur diejenigen überleben und ein normales Wachstumsverhalten aufweisen, deren Vitalität durch die Expression des Transgens nicht zu stark eingeschränkt wird. Eine sehr große Menge an Fremdprotein, wie sie in Form von SeV N-Protein für eine Vermehrung von SeV Δ N wahrscheinlich benötigt wird, könnte eine Zelle und ihren Stoffwechsel stark belasten. Daher überleben womöglich nur solche Zellklone den Selektionsprozess, die eine „verträgliche“ Menge an N-Protein synthetisieren. Doch kann eine Vermehrung von SeV Δ N durch diese „verträgliche“ Menge an SeV-N-Protein offenbar bisher nicht ausreichend unterstützt werden.

Die Herstellung einer größeren Menge an SeV N-Protein könnte jetzt nur noch über transiente Transfektion von Zellen erreicht werden. Auf diese Weise wird kurzfristig eine große Menge an *template* in Zellen eingebracht ohne dass es zu einer Selektion gegen die Transgen-exprimierende Zelle kommen kann. Die transiente Transfektion war zunächst nicht als gangbarer Weg für eine SeV

Δ N-Vermehrung angesehen worden, da über diese Technik im Gegensatz zur stabilen Transfektion meist nur in einen Bruchteil der vorhandenen Zellen Transgene eingebracht werden können.

Als Test, ob eine transiente Transfektion zu einer größeren Mengen an SeV N-Protein in einer ausreichenden Anzahl von Zellen führen könnte, wurden die für den *virus rescue* eingesetzten BSR-T7-Zellen transfiziert. $0,3 \times 10^6$ Zellen wurden mit $1,0 \mu\text{g}$ pTM-N transfiziert (Reagenz: FuGENE 6) und 2 d p.t. zur Proteingewinnung lysiert. Im der angeschlossenen Western Blot-Analyse wurden zu Vergleichszwecken Proteinextrakte der Helferzellen H29 und VPN44 aufgeführt (Abb. 22). Ein Vergleich der Banden mit $10 \mu\text{g}$ Proteinauftrag zeigt, unter Berücksichtigung der stark unterschiedlichen Expositionszeiten des Röntgenfilms, eindeutig, dass in BSR-T7-Zellen ein Mehrfaches der N-Proteinmenge aus H29- oder VPN44-Zellen synthetisiert wurde. Wie an der Doppelbande zu erkennen ist entstanden in den BSR-T7-Zellen zwei Varianten des SeV-N-Proteins, die auch in SeV-wt-infizierten Zellen beobachtet werden können und möglicherweise für die SeV-Replikation von Bedeutung sind.

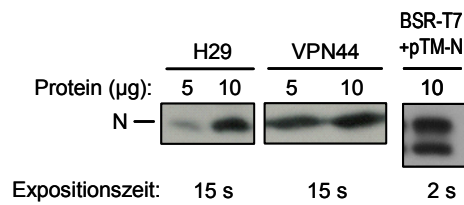


Abbildung 22: SeV N-Proteinsynthese in transient transfizierten BSR-T7-Zellen. $0,3 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen wurden mit $1,0 \mu\text{g}$ pTM-N transfiziert und nach zwei Tagen zur Proteingewinnung lysiert. Die Auftrennung der 5 und $10 \mu\text{g}$ Gesamtproteinextrakte erfolgte über eine SDS-PAGE. Nach Proteintransfer auf separaten PVDF-Membranen wurden das SeV N-Protein aus H29- und VPN44-Zellen durch eine 15 s-Belichtung, das aus den BSR-T7-Zellen durch eine 2 s-Belichtung im Western Blot (ECL) durch anti-N-Serum (rb) nachgewiesen. Zu Vergleichszwecken wurden H29- und VPN44-Helferzellen auf die gleiche Weise analysiert.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass in transient transfizierten Zellen deutlich mehr SeV N-Protein hergestellt werden kann als in den beschriebenen Helferzellen, sollten weitere Bedingungen festgelegt werden, unter denen eine Vermehrung von SeV Δ N in transient transfizierten Zellen möglich sein könnte.

3.2.3.1. Überlegungen zur transienten Transfektion als SeV Δ N-Vermehrungssystem

Grundvoraussetzung für ein System zur Vermehrung von SeV Δ N über transiente Transfektion muss eine gute Transfizierbarkeit der verwendeten Zellen sein. Nur wenn mindestens 80-90% der in einer Kultur vorhandenen Zellen mit der Plasmid-DNA transfiziert werden können, kann nach einer Infektion dieser Kultur eine effiziente Vermehrung von SeV Δ N-Partikel erwartet werden. Eine Vermehrung der SeV Δ N-Partikel ist nur in transfizierte Zellen möglich, da sonst kein N-Protein

bereitgestellt wird. Die für eine Infektion einsetzbare Menge an SeV Δ N-Partikel ist aufgrund der *rescue*-Ausbeute auf ca. 6 000 *ciu* pro Kultur in einem 6-well beschränkt (3.1.3). Werden dort beispielsweise nur ein Drittel aller Zellen transfiziert, würden nur rund 2 000 VP auf transfizierte Zellen treffen, in denen sie sich vermehren könnten. Versuche mit SeV Δ P zeigten, dass eine Amplifikation von replikationsdefizienten SeV im Vergleich zu SeV-wt nur sehr langsam abläuft und deutlich weniger Nachkommenpartikel aus Zellen freigesetzt werden (Schlecht, 2004). Für SeV Δ N ist ähnliches zu erwarten, so dass möglicherweise nur ca. 10-100 Nachkommenviren aus einer Zelle freigesetzt werden. Im Ergebnis würde dann bei der Transfektionsrate von 33% der Zellen kaum eine Vermehrung von SeV Δ N stattfinden.

Als weitere Voraussetzung für dieses System sollte die zu transfizierende Zelllinie robust und widerstandsfähig sein, um der Belastung einer Transfektion und der anschließenden hohen Transgen-expression standhalten zu können.

Weitere grundsätzliche Anforderungen an eine Virus-produzierende Zelllinie entsprechen den für Helferzellen bereits beschriebenen. So sollten sich die Zellen gut mit SeV infizieren lassen und in der Lage sein eine möglichst große Menge an VP zu produzieren und freizusetzen.

Mögliche Zelllinien die (aus Erfahrung der Arbeitsgruppe) für eine solche Aufgabe in Frage kamen waren HeLa-, BSR-T7, CHO- oder BHK-Zellen.

3.2.3.2. Verifizierung des Systems zur Vermehrung replikationsdefizienter SeV

Um zu testen ob das Prinzip der Vermehrung replikationsdefizienter SeV in transient transfizierten Zellen funktioniert, sollte zunächst versucht werden die Mutante SeV IdE PA2-77 F_{mut} zu vermehren. SeV IdE PA2-77 F_{mut} konnte bereits mit verschiedenen Helferzellen amplifiziert werden, woraus geschlossen werden konnte, dass die Bedingungen für seine Vermehrung weniger kritisch waren als für SeV Δ N. Als Zelllinie sollte zunächst die für den *rescue* erfolgreich eingesetzten BSR-T7-Zellen verwendet werden. Im *rescue* lassen sich BSR-T7-Zellen zu ca. 90-95% transfizieren und produzieren SeV-wt-Mengen von ca. 10^7 *ciu/ml*. Um möglichst nahe an dem etablierten System des *virus rescue* zu bleiben, sollten als Plasmid-DNA pTM-N und pTM-P eingesetzt werden, die von der T7-Polymerase in den BSR-T7-Zellen transkribiert werden können. Die Bereitstellung der Kombination von N- und P-Proteinen durch die transfizierte Zelle für eine Unterstützung der SeV IdE PA2-77 F_{mut}-Replikation hatte sich bereits in Helferzellen als effizient erwiesen (S. Bossow – persönliche Kommunikation) und sollte deshalb hier ebenfalls angeboten werden. $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen wurden 24 h nach ihrer Aussaat mit 1 000 *ciu* von SeV IdE PA2-77 F_{mut} infiziert. Durch die geringe Menge an Viruspartikeln sollte eine mögliche Ausbreitung gut verfolgt werden können. Nach einer einstündigen Adsorptionsphase wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und anschließend transfiziert. Für die Transfektion wurden zwei verschiedene Mengenverhältnisse der Plasmide eingesetzt. Zum einen die für den *virus rescue* optimierten Mengen von 0,25 μ g pTM-N

und 0,15 µg pTM-P (5.2.2.1.2) und zum anderen je 0,5 µg pTM-N und -P. Als Transfektionsreagenz wurde FuGENE 6 verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen bei 33 °C inkubiert und alle 24 h auf das Vorhandensein von grüner Fluoreszenz überprüft. Bereits 2 d p.i. konnten in dem Ansatz mit zweimal 0,5 µg transfizierter DNA kleine *spots* von ca. 4-8 Zellen entdeckt werden. Der andere Ansatz entwickelte erst ab 3-4 d p.i. kleine *spots*. Im weiteren Verlauf der Infektionen nahm die Virusvermehrung bis ca. 7 d p.i. deutlich zu, wobei der Ansatz mit den geringeren Mengen transfizierter DNA eine geringere Virusausbreitung aufwies (Abb. 23). Um zu überprüfen ob diese infizierten Kulturen Nachkommenviren freisetzen, wurden mit einem Teil der Kulturüberstände von 5-7 d p.i. Vero-Zellen infiziert. 3 d p.i. zeigten auch diese Zellen eine deutlich grüne Fluoreszenz, wodurch die Herstellung von Nachkommenviren mit Hilfe der transienten Transfektion festgestellt werden konnte. Auffallend war bei diesen zwei Ansätzen, dass die mit 0,5 µg Plasmid-DNA-transfizierten Zellen eine ca. 4-5-fach größere Menge an SeV PΔ2-77 herstellten als die mit den *rescue*-Mengen transfizierten.

Zusammengefasst kann die transiente Transfektion für die Vermehrung von SeV PΔ2-77 als ein System beschrieben werden, das im vorliegenden Fall, ohne vorherige Optimierung der Mengen an transfizierter DNA und unter Einsatz weniger VP - 1 000 *ciu* pro $0,25 \times 10^6$ Zellen -, SeV PΔ2-77 schnell - bis 7 d p.i. war Kultur vollständig infiziert – vermehren kann. Dabei trat eine Ausbreitung der VP über die transfizierte Kultur schneller auf als während einer vergleichbaren H29-Helferzellinfektion. Diese relativ grobe Beurteilung der Effizienz der transienten Transfektion zur Vermehrung von SeV PΔ2-77 reichte aus, um die Funktionalität dieses Prinzip nachzuweisen und einen Versuch zur Vermehrung von SeV ΔN zu rechtfertigen.

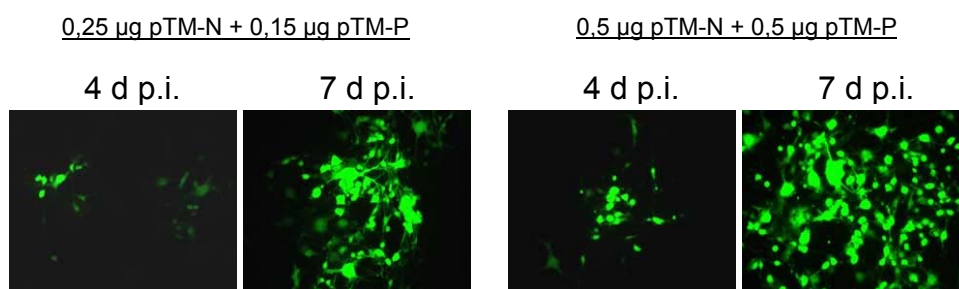


Abbildung 23: Vermehrung von SeV IdE PΔ2-77 F_{mut} auf transfizierten BSR-T7-Zellen. Zwei BSR-T7-Kulturen wurden mit je 1 000 *ciu* von SeV IdE PΔ2-77 F_{mut} infiziert und danach mit unterschiedlichen Mengen von pTM-N und -P transfiziert (0,25 µg pTM-N + 0,15 µg pTM-P bzw. je 0,5 µg pTM-N und -P). Dargestellt ist die Virusausbreitung in der Kultur anhand von zwei *spots*, vier und sieben Tage nach der Infektion (4, 7 d p.i.).

3.2.3.3. Vermehrungsversuch von SeV ΔN

Nachdem die Vermehrung replikationsdefizienter SeV durch transiente Transfektion anhand von SeV IdE PΔ2-77 gezeigt werden konnte, sollte nun versucht werden SeV ΔN über diesen Weg zu

amplifizieren. Zunächst sollte festgestellt werden, ob durch eine transiente Transfektion überhaupt eine Ausbreitung von SeV Δ N unterstützt werden konnte. Die Bedingungen der Transfektion für diesen ersten Test wurden für SeV Δ N zunächst so beibehalten, wie sie für zuvor für SeV P Δ 2-77 angewandt worden waren. $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen wurden zunächst mit 3 000 *ciu* von SeV Δ N PE F_{mut} infiziert und anschließend mit je 0,5 μ g pTM-N und -P transfiziert. Das Inkubationsmedium (DMEM^{2%}) wurde über einen Zeitraum von acht Tagen alle zwei Tage erneuert. Erste Anzeichen, dass eine virale Genexpression in den Zellen stattfand, konnten anhand von einzelnen, noch schwach, grün fluoreszierenden Zellen ab 4 d p.i. beobachtet werden (Abb. 24). Im weiteren Verlauf der Infektion entstanden an verschiedenen Stellen der Kultur kleine, jedoch eindeutige „grüne“ *spots*, die auf eine Virusausbreitung schließen ließen (Abb. 24).

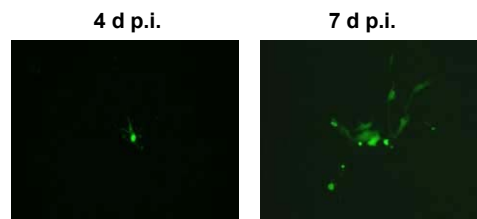


Abbildung 24: Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} auf transfizierten BSR-T7-Zellen. BSR-T7-Zellen wurden mit 3000 *ciu* von SeV Δ N PE F_{mut} infiziert und danach mit je 0,5 μ g pTM-N und -P transfiziert. Dargestellt ist die Virusausbreitung in der Kultur anhand eines *spots*, vier und sieben Tage nach der Infektion (4, 7 d p.i.).

Um die Freisetzung von Nachkommenviren in den Kulturüberstand zu untersuchen, wurde 7 d p.i. der BSR-T7-ÜS auf VPN11-Helferzellen, die eine SeV Δ N-Transkription gut unterstützen, gegeben und über eine auftretenden eGFP-Expression die Menge an freigesetzten SeV Δ N-Partikeln bestimmt. 2 d p.i. traten einige (ca. 10-50 pro 500 μ l ÜS) grün fluoreszierende Zellen auf. Zwar war die Anzahl an Nachkommenviren ziemlich gering, doch konnte durch dieses Ergebnis eindeutig nachgewiesen werden, dass sich das Prinzip der transienten Transfektion zur Vermehrung replikationsdefizienter SeV auch auf SeV Δ N anwenden ließ. In der Folge galt es eine Optimierung der Bedingungen zur SeV Δ N-Vermehrung durchzuführen.

3.2.3.4. Optimierung der Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut}

Um eine umfassende Optimierung der Bedingungen für eine SeV Δ N-Vermehrung über transient transfizierte Zellen durchzuführen, sollte jede an dem Prozess beteiligte Komponente sorgfältig ausgewählt werden.

3.2.3.4.1. Test verschiedener Zelllinien

Für den Nachweis der generellen Funktionalität einer SeV Δ N-Vermehrung über transiente Transfektion waren BSR-T7-Zellen eingesetzt worden. Diese ließen sich mit einer hohen Effizienz transfizieren und hatten im *rescue*-Versuch bereits bewiesen, dass sie SeV produzieren können. Für

eine Optimierung der Vermehrung von SeV Δ N sollte überprüft werden, ob mit dem Einsatz anderer Zelllinien, die ebenfalls die unter 3.2.3.1 aufgeführten Kriterien erfüllen, die erforderliche höhere Effizienz erreicht werden kann. Folgende Zelllinien entsprachen den Voraussetzungen und sollten getestet werden. HeLa-Zellen, die in dem ursprünglichen *rescue*-System zur Virusherstellung transfiziert wurden (5.2.2.1.1), BHK-21-Zellen, die sich sehr effizient transfizieren lassen und oft für eine Vermehrung von SeV eingesetzt werden, und CHO-K1-Zellen, die ja bereits aus den gleichen Gründen als Kandidat für die Entwicklung einer Helferzelle ausgewählt worden war (3.2.2.2.2). Diese drei Zelllinien sollten mit BSR-T7-Zellen verglichen werden. Die Bedingungen für Infektion und Transfektion der Zellen wurde zunächst so beibehalten, wie sie zuvor für den Nachweis der SeV Δ N-Vermehrung über transiente Transfektion bestanden. Zwar traten dabei nur relativ kleine Virusausbreitungen auf, dennoch sollten diese groß genug sein, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien erkennen zu können. Der einzige Unterschied zu der vorherigen Durchführung bestand darin, dass für die Transfektionen aller Zellen außer der BSR-T7-Zellen je 0,5 μ g der Plasmide pRE-N und pRE-P verwendet wurden, die von zellulären Polymerasen transkribiert werden, da die T7-Polymerase nur in BSR-T7-Zellen synthetisiert wird. Von jeder Zelllinie wurden für diesen Vergleich zwei parallele Ansätze angelegt. Nach Infektion und Transfektion wurden die Kulturen über einen Zeitraum von acht Tagen alle 24 h analysiert. Als Transfektionskontrolle wurden bei jedem Ansatz zusätzlich 0,1 μ g pRE-DsRed transfiziert. Über die einsetzende rote Fluoreszenz konnte bereits 1-2 d p.t. erkannt werden wie groß der Anteil der erfolgreich transfizierten Zellen war und dieses Ergebnis mit der Virusausbreitung korreliert werden. Es stellte sich heraus, dass BHK-Zellen, trotz effizienter Transfektion, kaum grüne Fluoreszenz entwickelten und sich damit deutlich von den übrigen Zelllinien abgrenzten. CHO-K1-Zellen zeigten zwar Ausbreitungen von SeV Δ N, jedoch waren diese 6 d p.i. nur ca. 3-4 Zellen groß. HeLa und BSR-T7-Zellen brachten bis 6 d p.i. ca. dreimal so viele *spots* mit 5-10 Zellen hervor. Die größere Anzahl an *spots* konnte auf eine höhere Transfektionseffizienz bei HeLa- und BSR-T7-Zellen zurückgeführt werden. Obwohl HeLa-Zellen vergleichbar große Virusausbreitungen wie BSR-T7-Zellen zeigten, litt ihre Vitalität deutlich unter dem Einfluss von Transfektion und Infektion kombiniert mit einer geringen FKS-Menge im Kulturmedium (2%), die für eine reduzierte Zellteilungsrate und dadurch nicht zu schnellen Alterung der Kultur während einer SeV Δ N-Vermehrung notwendig ist. Eine Inkubation der HeLa-Zellen über den Zeitraum von sechs Tagen hinaus war nicht ohne massives Zellsterben aufrechtzuerhalten. Dadurch starben aber auch die Virus-produzierenden Zellen, so dass keine große Menge an Nachkommen erwartet werden konnte. Die BSR-T7-Zellen ließen sich jedoch über den Zeitraum von acht Tagen hinaus noch mindestens 7 Tage weiter kultivieren. Dadurch unterstützt diese Zelllinie von allen vier getesteten die Virusvermehrung am besten und wurde für die weiteren Versuche eingesetzt.

3.2.3.4.2. Optimierung der Plasmidmengen

Die für den Nachweis der Vermehrbarkeit von SeV Δ N (3.2.3.2) eingesetzten Plasmidmengen – 0,25 μ g pTM-N + 0,15 μ g pTM-P, sowie je 0,5 μ g pTM-N und -P pro $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen – waren bei den ersten Versuchen in Anlehnung an die zuvor durchgeführte Vermehrung von SeV IdE PA2-77 F_{mut} gewählt worden. Diese Mengen eigneten sich zwar dafür, den Nachweis der SeV Δ N-Vermehrung in transfizierten BSR-T7-Zellen zu führen, jedoch war noch keine große Ausbeute an Nachkommenviren möglich gewesen. Deshalb musste an dieser Stelle eine Optimierung der eingesetzten Plasmidmengen erfolgen. Für alle folgenden Optimierungsschritte wurden immer $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen eingesetzt. Als Hauptursache für die geringe SeV Δ N-Vermehrung durch Helferzellen war die zu geringe Menge an bereitgestelltem SeV N-Protein angesehen worden. Daher wurde beim Einsatz der transienten Transfektion als erstes getestet, ob durch eine größere Menge an transfizierter Plasmid-DNA eine Steigerung der N-Proteinmenge in den BSR-T7-Zellen möglich war. Da in diesem Fall zunächst nur auf die N-Proteinmenge geachtet wurde, sollte von einer pTM-P-Kotransfektion abgesehen werden. BSR-T7-Zellen wurden mit 0,5 und 1,0 μ g pTM-N transfiziert. 2 d p.t. wurden Proteinextrakte angefertigt und ihre Mengen an SeV N-Protein in einem Western Blot verglichen. Wie in Abb. 25 deutlich zu erkennen, konnte eine Verdoppelung der Plasmidmenge eine stark erhöhte N-Proteinsynthese bewirken.

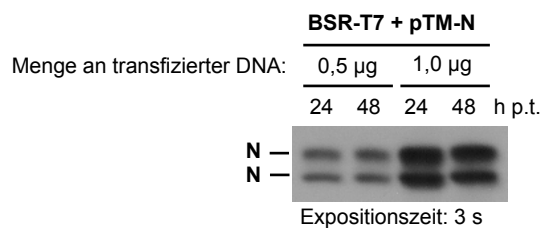


Abbildung 25: SeV N-Transgenexpression in mit pTM-N transient transfizierten BSR-T7-Zellen. $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen wurden mit 0,5 und 1,0 μ g pTM-N transfiziert. 24 und 48 h p.t. wurden die Zellen zur Proteingewinnung lysiert. Die Auftrennung von 10 μ g Gesamtproteinextrakt erfolgte über eine SDS-PAGE. Nach Proteintransfer auf separaten PVDF-Membranen wurden das SeV N-Protein im Western Blot (ECL) durch anti-N-Serum (rb) nachgewiesen.

Um zu überprüfen, ob sich diese N-Proteinmenge positiv auf die SeV Δ N-Vermehrung auswirkte, wurden verschiedene Testinfektionen unternommen. Dabei sollten gleichzeitig noch weitere Parameter untersucht werden. Zum einen wurden verschiedene Plasmidkombinationen getestet: Es wurde entweder nur pTM-N transfiziert – als Test ob die pTM-P-Kotransfektion überhaupt nötig ist – oder pTM-N und pTM-P – wie bereits zuvor erfolgreich getestet – oder pTM-N, pTM-P und pTM-L – um alle Komponenten des Replikationskomplexes bereitzustellen, wie beim *virus rescue* oder in den H29-Helferzellen, und so möglicherweise eine Beschleunigung von Transkription und Replikation zu erreichen. Bei all diesen Transfektionsansätzen wurden die Mengen der eingesetzten

Plasmide, wie in Tabelle 7 zusammengefasst, variiert. Bei allen Infektionen wurden jeweils 3 000 *ciu* SeV ΔN PE F_{mut} eingesetzt. Über den Zeitraum von 2-8 d p.i. wurden alle Infektionen auf die Entwicklung von Virusausbreitungen (*spots*), erkennbar an grün fluoreszierenden Zellen, untersucht. Für den Vergleich der verschiedenen Vermehrungsansätze wurden die Anzahl und die Größe (Anzahl infizierter Zellen) der *spots* bewertet. Es stellte sich heraus, dass die Transfektion von je 1,0 μg pTM-N und pTM-P eine Vermehrung von SeV ΔN am besten unterstützten. Die zusätzliche Transfektion von pTM-L bewirkte keine Steigerung mehr. Daher sollten für alle weiteren Transfektionen nur die SeV N- und P-Gene transfiziert werden.

Tabelle 7: Variation der Mengen und Kombinationen von Expressionsplasmiden in Transfektionen von infizierten BSR-T7-Zellen zur Vermehrung von SeV ΔN.

Plasmidkombinationen	pTM-N			pTM-N + pTM-P			pTM-N + pTM-P + pTM-L			pRE-N			pRE-N, -P				
	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5			
Mengen [μg]	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5			
Effizienz der Vermehrung	-*	+/-	+	+	++	+	++	++	++	++	++	+/-	+	+/-	++	+++	++

(*): Effizienz der Vermehrung ausgedrückt durch „-“, „+/-“ und „++“. Je mehr „+“, desto effizienter.

Eine Auffälligkeit, die während aller Infektionen der transfizierten Zellen beobachtet werden konnte, war eine Abschwächung der grünen Fluoreszenz ab 3-4 d p.i. und in der Folge (4-8 d p.i.) eine deutlich langsamere Ausbreitung der Viren. Diese Entwicklung wurde auf eine absinkende Expression der transfizierten Gene aus den pTM-Plasmiden zurückgeführt, da ähnliches schon während des *virus rescue* von SeV ΔN beobachtet worden war (3.1.2). Eine effiziente Vermehrung von SeV ΔN muss allerdings über einen längeren Zeitraum als 4-5 Tage durch Transgenexpression unterstützt werden. Deshalb sollte entweder 4 d p.i. ein zweites Mal transfiziert werden, oder eine längere Transgenexpression sichergestellt werden. Während der Optimierung des *rescue* von SeV ΔN (3.1.2.3) kamen aus dem gleichen Grund pPRECISE-Expressionsplasmide (3.2.2.2.1) mit SeV N- und P-Genen (pRE-N und pRE-P) zum Einsatz. Deren Expression erfolgt unabhängig von der T7-Polymerase und sie ermöglichen eine deutlich längere und ebenfalls starke Transgenexpression. Aus diesem Grund sollte an dieser Stelle die alternative Verwendung von pRE-N und -P anstelle von pTM-N und -P für die Vermehrung von SeV ΔN analysiert werden. Der Vergleich der N- und P-Transgenexpression durch pTM- oder pRE-Plasmide über einen Zeitraum von drei Tagen zeigte erstaunlich deutlich, dass die pRE-Plasmide sowohl eine viel stärkere Proteinsynthese auslösen als

auch eine wesentlich länger andauernde (Abb. 26). Während in mit pTM-Plasmiden transfizierten BSR-T7-Zellen bereits 2 d p.t. die Proteinmenge deutlich abzusinken beginnt, bleibt sie in mit pRE-Plasmiden transfizierten Zellen auch 3 d p.t. noch konstant hoch. Damit ist eine um mindestens zwei Tage längere, starke Proteinsynthese durch pRE-Plasmide im Vergleich zu pTM-Plasmiden gezeigt, weshalb diese in der Folge eingesetzt werden sollten.

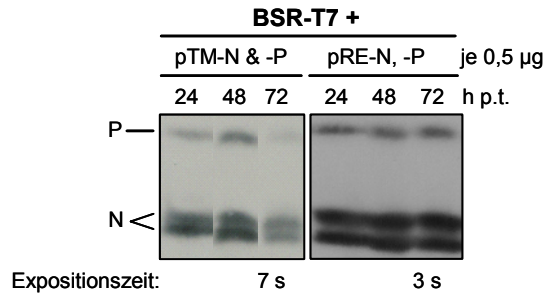


Abbildung 26: SeV N- und P-Transgenexpression in mit pTM- oder pRE-N und -P transient transfizierten BSR-T7-Zellen. 0,25 x 10⁶ BSR-T7-Zellen wurden mit je 0,5 µg pTM-N und -P oder pRE-N und -P transfiziert. 24, 48 und 72 h p.t. wurden die Zellen zur Proteingewinnung lysiert. Die Auftrennung von 10 µg Gesamtproteinextrakt erfolgte über eine SDS-PAGE. Nach Proteintransfer auf separaten PVDF-Membranen wurden die SeV N- und P-Proteine im Western Blot (ECL) durch anti-SeV-Serum (rb) nachgewiesen.

Als nächstes wurde getestet, ob die durch die Verwendung der pRE-Plasmide erhöhte Menge an SeV N- und P-Protein einen Effekt auf die Vermehrung von SeV ΔN hat. In unterschiedlichen Ansätzen wurden BSR-T7-Zellen mit SeV ΔN infiziert und anschließend mit verschiedenen Mengen von pRE-N oder pRE-N und pRE-P transfiziert (s. Tabelle 7). Danach wurde wiederum die Virusausbreitung in der Zellkultur verfolgt und auf diese Weise die optimale Menge an Plasmid-DNA bestimmt. Wie sich herausstellte fördert die Transfektion der Kombination von je 1,0 µg pRE-N und pRE-P eine SeV ΔN-Vermehrung am besten. Im Vergleich zu den vorherigen Infektionen, in denen mit pTM-Plasmiden transfiziert wurde, traten bereits früh nach der Transfektion (1-2 d p.t.) stark fluoreszierende Zellen auf und die Größe der *spots* nahm deutlich zu. Wurden 0,25 x 10⁶ BSR-T7-Zellen in einem 12-well mit rund 5 000 *ciu* infiziert und mit je 1,0 µg pRE-N und -P transfiziert hatten sich die SeV ΔN-Infektion bis 6-7 d p.i. fast auf die gesamte Kultur, wohl mit Ausnahme der nicht transfizierten Zellen, ausgebreitet (Abb. 27).

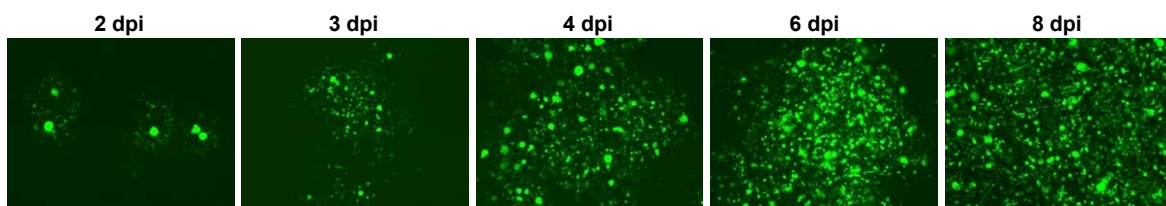


Abbildung 27: Verlauf einer SeV ΔN-Infektion von transfizierten BSR-T7-Zellen. 0,25 x 10⁶ BSR-T7-Zellen wurden mit 5 000 *ciu* von SeV ΔN PE F_{mut} infiziert und anschließend mit je 1,0 μg pRE-N und -P transfiziert. Die Virusausbreitung wurde anhand der grün fluoreszierenden Zellen bis 8 d p.i. verfolgt.

Um zu überprüfen, ob unter diesen Bedingungen eine effiziente Freisetzung von SeV ΔN-Nachkommenpartikeln stattfand, wurden in wiederholt durchgeführten Versuchen die Menge an infektiösen SeV ΔN in den ÜS von 4-6, 6-8 und 8-10 d p.i. bestimmt. Dazu wurden mit einem Teil der ÜS VPN11-Helferzellen infiziert, die ja eine SeV ΔN-Transkription gut unterstützten und daher im Falle einer Infektion 2 d p.i. stark grün fluoreszierten. Durch Auszählen der „grünen“ Zellen konnte der SeV ΔN-Titer aus den ÜS ermittelt werden. Die größte Menge an freigesetzten SeV ΔN befand sich im ÜS von 6-8 d p.i. und lag bei ca. 0,5 x 10⁶ *ciu* pro ml. Mit Hilfe der transienten Transfektion von infizierten BSR-T7-Zellen konnte erstmals eine so große Menge an SeV ΔN-Nachkommenviren erzielt werden, dass auch die Genexpression dieser Viren untersucht werden kann. Für eine Analyse dieses transienten Vermehrungssystems sollte abschließend die in den mit je 1,0 μg pRE-N und -P transfizierten BSR-T7-Zellen hergestellte N- und P-Proteinmenge in Relation zu SeV-wt-Infektionen gesetzt werden. Ein Vergleich der Stärke der Proteinbanden im Western Blot ließ die Abschätzung zu, dass in BSR-T7-Zellen ca. 50-90% der Proteinmenge bereitgestellt werden kann, die während einer SeV-wt-Infektion synthetisiert wird (Abb. 28). Erst durch diese große Menge an synthetisiertem N-Protein, in Verbindung mit P-Protein, ist anscheinend eine effiziente Vermehrung von SeV ΔN möglich.

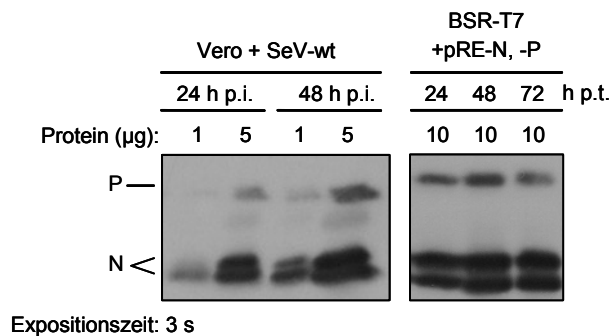


Abbildung 28: Vergleich der SeV N- und P-Transgenexpression in SeV-wt-infizierten Vero-Zellen und mit pRE-N und -P transfizierten BSR-T7-Zellen. 0,25 x 10⁶ Vero-Zellen wurden mit SeV-wt mit *moi* 1 infiziert. BSR-T7-Zellen wurden mit je 1,0 μg pRE-N und -P transfiziert. 24 und 48 h p.i. wurden Proteinextrakte der infizierten Zellen erstellt, 24, 48 und 72 h p.t. wurden Proteinextrakte der transfizierten Zellen erstellt. Die Auftrennung von 1, 5 und 10 μg Gesamtproteinextrakt erfolgte über eine SDS-PAGE. Nach Proteintransfer auf separaten PVDF-Membranen wurden die SeV N- und P-Proteine im Western Blot (ECL) durch anti-SeV-Serum (rb) nachgewiesen.

3.2.4. Zusammenfassung der Vermehrung von SeV Δ N

Um eine Vermehrung von initial im *virus rescue* hergestellten Partikel des SeV Δ N PE F_{mut} zu erreichen musste das SeV N-Protein über ein Helfersystem zur Verfügung gestellt werden. Da in unserer Arbeitsgruppe bereits Helferzelllinien existierten (LTK⁻-394, -460 und H29), die das SeV N-Gen stabil exprimierten, wurden diese zunächst für eine Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} getestet. Es stellte sich jedoch heraus, dass keine dieser Zelllinien in der Lage war die Vermehrung ausreichend stark zu unterstützen um Nachkommenpartikel zu generieren. Da festgestellt werden konnte, dass in diesen Zellen nur eine relativ geringe Menge an SeV N-Protein im Vergleich zu SeV-wt-Infektionen synthetisiert wurde, mussten neue Helferzellen entwickelt werden, die eine größere Menge an SeV N-Protein stabil synthetisierten. Dazu wurden zunächst Expressionsvektoren, über die die viralen Transgene N und P in die Helferzellen eingeschleust werden sollten, modifiziert, um eine starke Transgenexpression auslösen zu können. Nach der Auswahl einer geeigneten Zelllinie und eines gut funktionierenden Transfektionsreagenzes wurden Vero-Zellen mit den Vektoren pRECISE_{neo}-N und pRECISE_{hyg}-P transfiziert. Die daraus resultierenden stabil transfizierten Zellklone wurden durch Kultivierung der Zellen in Selektionsmedium und anschließenden Testinfektionen zur Unterstützung einer Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} ermittelt. Nach Monoklonalisierung und ausführlicher Analyse der drei effizientesten Klone VPN11, VPN44 und VPN285 musste allerdings festgestellt werden, dass durch den Einsatz dieser neuen Helferzellen zwar die Transkription von SeV Δ N deutlich besser unterstützt wurde als durch die älteren Helferzellen, jedoch wiederum keine ausreichend starke Vermehrung von SeV Δ N erreicht werden konnte. Trotz der leicht gesteigerten Menge (ca. 3-5% mehr) an N-Protein in diesen neuen Helferzellen, produzierten sie noch deutlich weniger als SeV-wt-infizierte Zellen. Da über eine konstitutive Expression von stabil transfizierten Helferzellen anscheinend keine ausreichend große Menge an SeV N-Protein hergestellt werden kann wurde versucht, eine effiziente Transkomplementation von SeV Δ N PE F_{mut} über eine transiente Transfektion zu erreichen. Nach Auswahl einer geeigneten Zelllinie (BSR-T7) und Optimierung der Transfektionsbedingungen, wobei verschiedene Expressionsplasmide (pTM- oder pRECISE-Plasmide) in unterschiedlichen Mengen (jeweils 0,5, 1,0 oder 1,5 μ g transfizierte Plasmid-DNA pro $0,25 \times 10^6$ Zellen) und Kombinationen (mit Transgenen N, P und L) getestet wurden, konnte erstmals eine signifikante Vermehrung von SeV Δ N PE F_{mut} erzielt werden. Durch die Infektion von $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen mit 5000 *ciu* SeV Δ N PE F_{mut} und einer anschließenden Transfektion mit jeweils 1,0 μ g pRECISE-N und pRECISE-P (Transfektionsreagenz: FuGENE HD) konnten aus dem Kulturüberstand 6-8 d p.i. Nachkommenviren in einer Menge von $0,5 \times 10^6$ infektiösen VP/ml gewonnen werden. Durch die transiente Transfektion von BSR-T7-Zellen konnte damit ein reproduzierbares System zur

Vermehrung von SeV ΔN PE F_{mut} etabliert werden, das ausreichend SeV N-Protein für eine effiziente Transkomplementierung bereitstellte.

Nachdem ein System zur Vermehrung des replikationsdefizienten SeV ΔN PE F_{mut} entwickelt werden konnte sollte im Folgenden die für einen Vektor essentielle Funktion der Transgenexpression in Zielzellen eingehend untersucht werden.

3.3. Genexpression von SeV-Mutanten mit Deletionen im N-Gen

Die Entwicklung eines replikationsdefizienten SeV-Vektors auf Basis der N-Gendeletion verlief in mehreren Schritten. Nachdem ein System zur Vermehrung von SeV ΔN PE F_{mut} etabliert werden konnte, sollte die Transgenexpression des Vektors untersucht werden.

3.3.1. Genexpression von SeV ΔN in Zielzellen und Helferzellen

Die Genexpression von SeV ΔN PE F_{mut} sollte auf verschiedene Weisen analysiert werden. Eine einfache Möglichkeit war durch den Einbau des eGFP-Transgens in das Genom, hinter dem P-Gen, geschaffen worden. Stellvertretend für andere mögliche Transgene kann eine eGFP-Expression mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops oder einer FACS-Analyse leicht detektiert werden. Während der Vermehrung von SeV ΔN PE F_{mut} konnte bereits eine starke eGFP-Expression in Helferzellen (VPN11) und in transient transfizierten BSR-T7-Zellen beobachtet werden. Nun sollte die eGFP-Expression in Zellen beurteilt werden, die keine viralen Proteine synthetisieren (= Zielzellen).

3.3.1.1. EGFP-Transgenexpression

Als erstes sollte eine eGFP-Transgenexpression während einer SeV ΔN PE F_{mut} -Infektion von Vero-Zellen untersucht werden. Als Positivkontrolle wurden VPN11-Helferzellen, die das SeV N-Protein synthetisieren, mit SeV ΔN -PE F_{mut} infiziert. Um die Stärke der eGFP-Expression einschätzen zu können wurden parallel Vero-Zellen mit SeV PE infiziert, das abgesehen von dem zusätzlich ins Genom integrierten eGFP-Gen dem SeV-wt entspricht und deshalb auch so bezeichnet wird (SeV-wt). Um die eGFP-Expression durch SeV ΔN PE F_{mut} mit der anderer replikationsdefizienter SeV vergleichen zu können wurden ebenfalls Infektionen mit SeV IdE ΔP F_{mut} und SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} durchgeführt, die eine eGFP-Genkopie, inseriert hinter dem *leader*, sitzen. Das interessante an diesen beiden Mutanten war, dass SeV IdE ΔP F_{mut} ohne die Bereitstellung von SeV P-Protein während Vero-Zellinfektionen nicht in der Lage ist signifikante, detektierbare Mengen an eGFP herzustellen. SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} dagegen zeigte trotz Replikationsdefizienz eine starke eGFP-Expression in Vero-Zellen. Als Positiv-Kontrolle für diese beiden SeV P-Mutanten wurden Helferzellen infiziert, die das P-Protein in großer Menge synthetisierten.

0,2 x 10⁶ Vero- oder Helferzellen wurden mit den jeweiligen Viren mit *moi* 0,05 infiziert und anschließend alle 24 h auf die Entwicklung von grüner Fluoreszenz überprüft. Durch die relativ geringe Menge an eingesetzten Viren konnte die eGFP-Expression in Helferzellen, die eine Genomreplikation der replikationsdefizienten SeV ermöglichen und somit eine Zunahme der *templates* für die eGFP-Transkription, sehr gut von der in Vero-Zellen, die ausschließlich auf der *template*-Menge der eingesetzten Viren beruht, unterschieden werden. Erstaunlicherweise konnten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (FM) während der SeV ΔN-Infektion von Vero-Zellen über einen Zeitraum von acht Tagen keine fluoreszierenden Zellen festgestellt werden. Dagegen glich die Transkriptionsstärke von SeV ΔN in Helferzellen sogar der von SeV-wt, wie in Abb. 29 2 d p.i. exemplarisch für die Ergebnisse aller Infektionen dargestellt. Für die SeV ΔP-Infektionen ergab sich das gleiche Bild. In Vero-Zellen lösten sie keine sichtbare eGFP-Expression aus, in Helferzellen hingegen eine sehr starke. Im Gegensatz zu diesen beiden Mutanten trat während der Vero-Zellinfektion mit SeV PΔ2-77 bereits 2 d p.i. eine klar erkennbare Fluoreszenz auf.

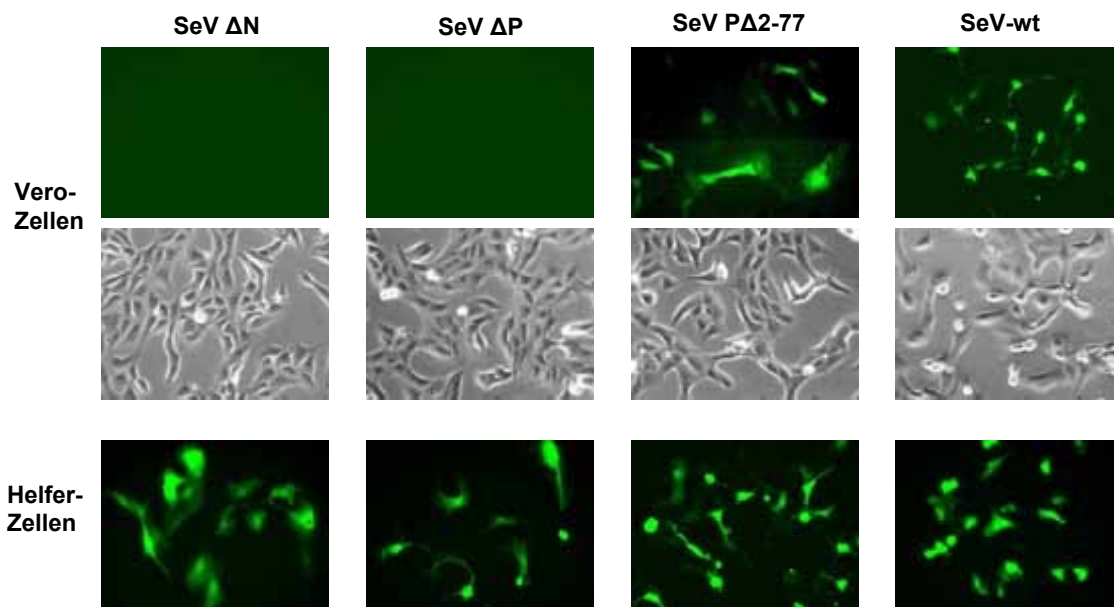


Abbildung 29: Vergleich der eGFP-Expression während SeV ΔN PE F_{mut}-, SeV IdE ΔP F_{mut}-, SeV IdE PΔ2-77 F_{mut}- und SeV-wt (SeV PE)-Infektionen von Vero- und Helferzellen. 0,2 x 10⁶ Zellen wurden mit den jeweiligen Viren infiziert (*moi* 0,05). 2 d p.i. wurde die eGFP-Expression verglichen. Die Phasenkontrastbilder zeigen alle in einem Mikroskopausschnitt vorhandenen Zellen. In Vero-Zellen können nur SeV PΔ2-77 und SeV-wt eine eGFP-Transgenexpression auslösen, in Helferzellen alle vier Virusvarianten.

Um eine eGFP-Expression mit Hilfe des FM erkennen zu können müssen pro Zelle ca. 10⁶ Proteine vorhanden sein. Möglicherweise konnte die eGFP-Expression in SeV ΔN-infizierten Vero-Zellen aufgrund einer geringen Anzahl synthetisierter eGFP-Moleküle nicht erkannt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen sollte die eGFP-Expression in infizierten Zellen über eine FACS-Analyse

detektiert werden, die eine wesentlich sensitivere Technik darstellt und durch eine entsprechende Einstellung der Schwellwerte auch eGFP-Fluoreszenz, die unter dem Mikroskop nicht wahrgenommen werden kann, identifiziert. Zu diesem Zweck wurden die gleichen Infektionen wie oben durchgeführt und die Zellen 2 d p.i. einer FACS-Analyse unterzogen. Wie in Abb. 30 zu erkennen zeigt sich jedoch das gleiche Bild wie bereits zuvor: Nur diejenigen Vero-Zellen, die mit SeV PA2-77 oder SeV-wt infiziert waren, synthetisieren das eGFP-Transgen in einer detektierbaren Menge. In Helferzellen dagegen konnten auch SeV Δ N und SeV Δ P das eGFP-Transgen in großer Menge exprimieren.

Das Ausbleiben der eGFP-Transgenexpression in SeV Δ N-infizierten Vero-Zellen überraschte und war so nicht erwartet worden. Gemäß dem gegenwärtigen Wissensstand sind an der SeV-Transkription nur der Polymerasekomplex aus P- und L-Protein und das mit N-Proteinen verpackte

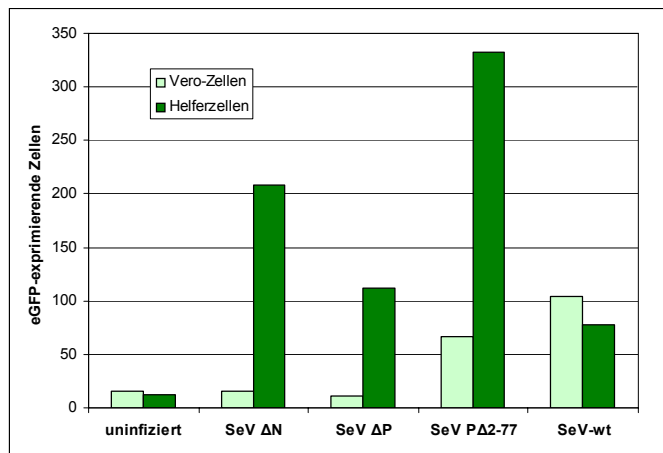


Abbildung 30: Anzahl fluoreszierender Vero- und Helferzellen nach Infektion mit SeV Δ N PE F_{mut}, SeV Δ E Δ P F_{mut}, SeV Δ E PA2-77 F_{mut} und SeV-wt (SeV PE). Nach Infektion von $0,2 \times 10^6$ Zellen mit jeweiligem Virus (*moi* 0,05) wurde 2 d p.i. die Anzahl an eGFP-exprimierenden Zellen pro 10 000 *events* über FACS-Analyse bestimmt.

virale Genom beteiligt. Diese Komponenten waren bei den beschriebenen Infektionen eindeutig vorhanden. Die Existenz von infektiösen SeV Δ N konnte an den parallel durchgeführten Infektionen von Helferzellen erkannt werden und das SeV Δ N-Genom beinhaltet die Gene für eine Neusynthese von P- und L-Proteinen. Daher sollte virale Transkription, auch ohne Neusynthese von SeV N-Protein, stattfinden können. Dass das Vorhandensein von nur einem *template* pro infizierter Zelle für eine detektierbare eGFP-Expression ausreicht zeigte die Infektion mit dem ebenfalls replikationsdefizienten SeV Δ E PA2-77. Möglicherweise wurden um eGFP selbst über FACS-Analyse detektieren zu können einfach zu wenige Transkripte des eGFP-Transgens hergestellt; das eGFP-Gen sitzt an der dritten Position im Genom von SeV Δ N PE F_{mut} und wird daher gemäß des Transkriptionsgradienten weniger stark abgelesen. Hierin besteht ein Unterschied zu SeV Δ E PA2-77, als die beiden davor liegenden Transkriptionseinheiten (Δ N-Transkriptionskassette und P-Gen).

Die Detektion aller exprimierten viralen Proteine in SeV Δ N-infizierten Zellen (P-, M-, F-, HN- und L-Proteine) könnte daher ein noch sensitiveres Verfahren darstellen, um eine Transkriptionsaktivität nachzuweisen.

3.3.1.2. Nachweis der Genexpression über virales Protein

Während einer SeV-Infektion beginnt die Primärtranskription rund 2-3 h p.i. Von einem in die Zelle gelangten Nukleokapsid werden die viralen Gene der Reihe nach abgelesen und anschließend translatiert. Während der Infektion von Vero-Zellen mit einer replikationsdefizienten SeV-Mutante können alle Transkripte ausschließlich von einem *template* erstellt werden. Da die Halbwertszeit eines Nukleokapsids in der Zelle mehrere Wochen betragen kann, könnte in SeV Δ N-infizierten Zellen eine, wenngleich auch langsame, Transkription zu einer Anhäufung aller auf dem viralen Genom kodierten Proteine führen. Um einen möglicherweise sensitiveren Nachweis für eine virale Genexpression als die Detektion einer eGFP-Expression durchzuführen sollten über Immunfluoreszenz (IF) alle SeV-Proteine in infizierten Zellen detektiert werden. Durch die Verwendung eines polyklonalen und polyspezifischen ersten Antikörpers könnten alle SeV-Proteine an verschiedenen Epitopen markiert werden. Der im Anschluss eingesetzte zweite Antikörper kann dann mehrfach an einen ersten Antikörper binden. Auf diese Weise könnte eine Signalverstärkung erreicht werden, die möglicherweise eine höhere Sensitivität als die Detektion einer eGFP-Expression aufweist.

Für eine Detektion einer fortschreitenden Transkription wurden Vero-Zellen mit SeV Δ N PE F_{mut} infiziert und 1 und 3 d p.i. auf das Vorhandensein von SeV-Proteinen untersucht. Als Kontroll- und Vergleichsmöglichkeiten zu SeV Δ N wurden wiederum parallel Infektionen von Vero- und Helferzellen mit SeV IdE Δ P F_{mut}, SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} und SeV PE (SeV-wt) durchgeführt. Über Immunfluoreszenz (IF) wurden in allen Ansätzen die vorhandenen viralen Proteine detektiert. Wie in Abb. 31 gezeigt entwickelt sich in SeV Δ N-infizierten Vero-Zellen von 1 bis 3 d p.i. keine signifikante Fluoreszenz.

Die Größe der sichtbaren kleinen rot fluoreszierenden „Flecken“ unterschieden sich zwischen 1 und 3 d p.i. nicht. Diese könnte in die Zelle eingeschleuste Nukleokapside (NC) darstellen, die aufgrund ihrer N-Proteine von den Antikörpern detektiert werden und nach 1 und 3 d p.i. in der Zelle inaktiv vorliegen. Für SeV Δ P-infizierte Vero-Zellen kann wieder eine vergleichbare Situation beobachtet werden. Um zu zeigen, dass einzelne NC alleine bereits zu einem sichtbaren Fluoreszenzsignal führen können und die kleinen „roten Flecken“ in den SeV Δ N- und SeV Δ P-infizierten Vero-Zellen nicht auf einer aktiven Transkription beruhen, wurden mit dem SeV-wt-infizierten Vero-Zellen bereits 2 h p.i. eine IF durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt konnte ein NC, nach erfolgreicher Adsorption seines Virus an die Zell-Rezeptoren, in die Zelle aufgenommen worden sein und am Anfang der Primärtranskription stehen. Wie in der Aufnahme gezeigt, sind die beiden sichtbaren

„roten Flecken“ sogar schon etwas größer als die der SeV Δ N- und SeV Δ P-Infektionen, was für eine bereits gestartete Transkription spricht. Dadurch ist aber gleichzeitig gezeigt, dass schon eine

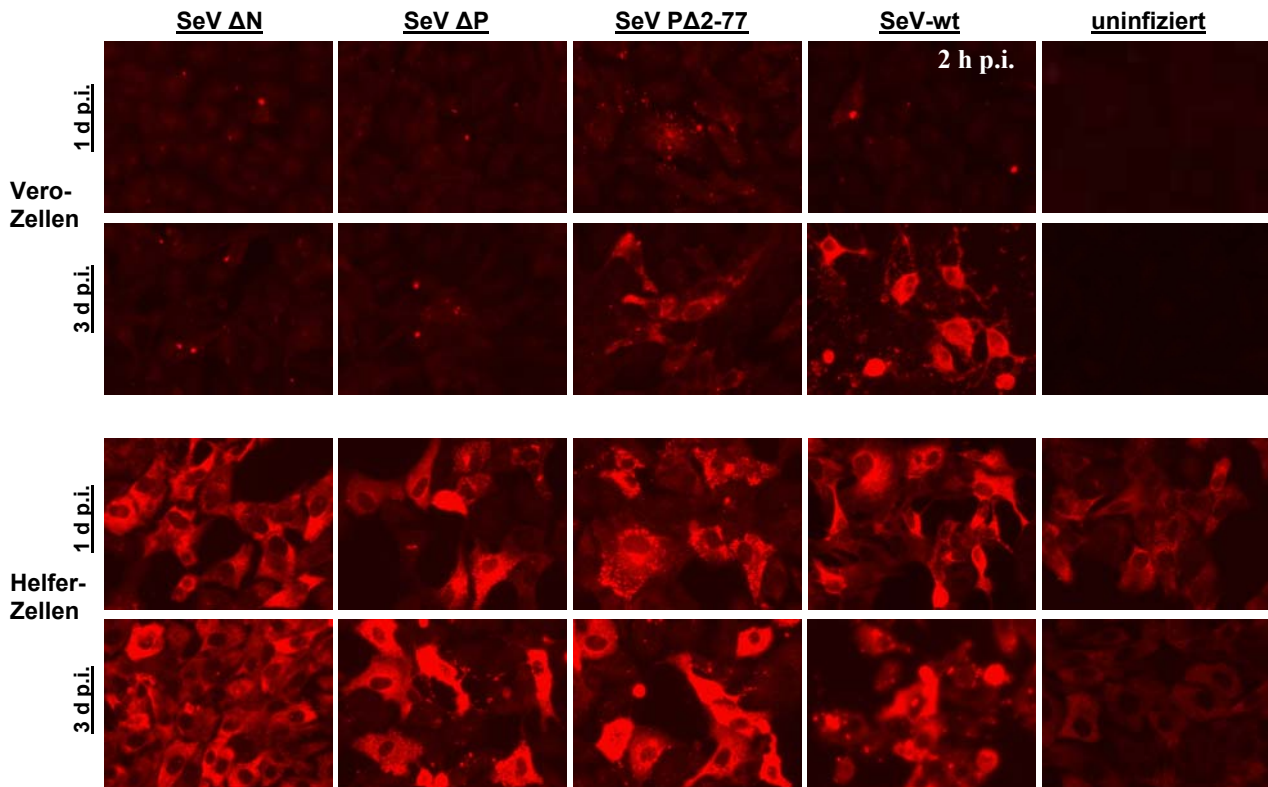


Abbildung 31: Vergleich der viralen Genexpression während Infektionen von Vero- und Helferzellen mit SeV Δ N PE F_{mut}, SeV IdE Δ P F_{mut}, SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} und SeV-wt (SeV PE). Nach Infektion von $0,2 \times 10^6$ Zellen mit den aufgeführten Viren (*moi* 0,5) wurden 1 (bzw. Vero-Zellen mit SeV-wt infiziert 2 h p.i.) und 3 d p.i., alle viralen Proteine in den Zellen mit anti-SeV-Serum markiert. Durch Verwendung des zweiten, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpers Alexa Fluor®568 goat anti-rabbit IgG wurden die ersten Antikörper sichtbar gemacht.

geringe Transkriptionsleistung, und bis zu diesem Zeitpunkt (2 h p.i.) konnte nur wenig Transkription stattgefunden haben, durch die IF erkannt werden kann. Jedoch war 3 d p.i. nicht einmal eine geringe Transkriptionsleistung in SeV Δ N- und SeV Δ P-infizierten Vero-Zellen festzustellen. Die Infektionen von Vero-Zellen mit SeV P Δ 2-77 wiesen dagegen bereits 1 d p.i. deutlich mehr rote Fluoreszenz auf, die bis 3 d p.i. noch deutlich an Größe und Stärke zunahm, wenngleich auch nicht so stark wie in SeV-wt-infizierten Vero-Zellen.

Da Helferzellen stabil virale Proteine synthetisieren (N- und P-Proteine), wiesen selbst die uninfizierten ein Fluoreszenzsignal auf. Interessant war jedoch, dass die SeV Δ N-infizierten, ebenso wie die SeV Δ P-infizierten Helferzellen, bereits 1 d p.i. eine deutlich stärkere Fluoreszenz zeigten als die uninfizierten. Das spricht dafür, dass die jeweilige Neusynthese von N-Protein im Falle von SeV Δ N und von P-Protein bei SeV Δ P für eine gut funktionierende Transkription benötigt wird.

Durch diesen Versuch verstärkte sich der Eindruck, dass die Mutante SeV ΔN ohne eine Neusynthese von SeV N-Protein zu keiner Transkription in der Lage ist. Die Daten der IF deckten sich, trotz einer möglicherweise höheren Sensitivität des Versuchs, mit den zuvor gewonnenen Ergebnissen der eGFP-Transgenexpression. Da eine Transgenexpression für einen viralen Vektor allerdings unabdingbar ist, sollte eine alternative Virusvariante entwickelt werden, die für ein partiell deletiertes N-Protein kodiert.

3.3.2. Modifikation von SeV ΔN zur Steigerung der Genexpression

Aufgrund der ausbleibenden Transkriptionsaktivität von SeV ΔN PE F_{mut} in Vero-Zellen, sollte versucht werden das N-Gen nicht mehr vollständig zu deletieren, so dass der Vektor weiterhin replikationsdefizient bleibt aber für ein verkürztes N-Protein kodiert, das möglicherweise die virale Transkription unterstützt. Im Falle der bereits zuvor entwickelten replikationsdefizienten SeV-Mutanten SeV IdE ΔP F_{mut} und SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} konnte das um die As 2-77 verkürzte P-Protein die virale Transkription unterstützen während ohne neu synthetisiertes P-Protein keine nachweisbare Transkription stattfand (Abb. 29). Die Replikationsdefizienz von SeV IdE P Δ 2-77 F_{mut} bleibt weiterhin bestehen, da das Rumpf-P-Protein nicht mit dem N-Protein im sogenannten N^0 -P-Komplex wechselwirken kann und daher keine neu synthetisierten SeV-Genome mit N-Protein verpackt werden können.

Eine analoge Situation sollte nun für die SeV ΔN -Mutante herbeigeführt werden. In verschiedenen Untersuchungen konnten funktionelle Bereiche des N-Proteins recht genau kartiert werden. So wurde der Bereich von As 472-491 als essentiell für die N^0 -P-Wechselwirkung beschrieben (Çevik et al., 2004). Die Deletion der entsprechenden Nt innerhalb des SeV N-Gens sollte demnach ausreichen um eine Replikationsinkompetenz des Virus zu bewirken. Obwohl eine Beteiligung des N-Proteins an der viralen Transkription bisher noch nicht entdeckt wurde, sind für ein partiell deletiertes N-Protein verschiedene Funktionen zumindest denkbar. So könnte ein *N-turnover* während der Transkription, bei der die N-Proteine des NC durch die virale Polymerase (RdRp) für eine Zugänglichkeit des *templates* bewegt werden müssen, durch ein Rumpf-N-Protein ausgeglichen werden. Auch könnte das N-Protein direkt als Komponente an der viralen Transkription teil.

Um diese Hypothese zu überprüfen und zu testen ob ein Rumpf-N-Protein für die Unterstützung der viralen Transkription genügt, sollten zwei Varianten von Mutanten hergestellt werden, die die Kodons für die As472-491 des N-Proteins deletiert haben. Zum einen sollte in dem Konstrukt SeV N Δ 472-91 ein möglichst kleiner Bereich des N-Proteins wegfallen, damit nicht mögliche andere Funktionen des Proteins, die auf einem der Deletion benachbarten Bereich beruhen, beeinträchtigt werden. Bei dem Konstrukt SeV N Δ 472-524 sollte dagegen der vollständige C-Terminus ab As472 deletiert werden, da für den Bereich ab As492 keine wichtige Funktion bekannt ist und eine

vollständige Deletion des C-Terminus ab As472 eventuell eine Replikationsdefizienz zuverlässiger sicherstellt.

Um diese Virusmutanten herstellen zu können mussten ihre Genome zunächst auf cDNA-Ebene konstruiert werden.

3.3.2.1. Herstellung der Mutanten SeV N Δ 472-91 PE F_{mut} und SeV N Δ 472-524 PE F_{mut}

Das Genom von SeV N Δ 472-91 PE F_{mut} wurde zunächst in Form einer cDNA hergestellt, um anschließend im *virus rescue* VP erzeugen können. Der partiell deletierte N-ORF wurde über PCR hergestellt (Abb. 32). Dazu wurden zunächst in zwei Reaktionen mit dem *template* pTM-N ein N-terminales Fragment (Fr. I) bis zum Beginn der Deletion (Nt 1414) und ein C-terminales Fragment (Fr. II) ab dem Ende der Deletion (Nt 1473) synthetisiert. Dabei wurden über mutagene *primer* am Ende von Fr. I 13 Nt von der Sequenz hinter der Deletion, ab Nt 1473, eingefügt (Nd472-91rv), und am Anfang von Fr. II 14 Nt von der Sequenz vor der Deletion, von Nt 1400 bis 1413 (Nd472-91fw). Dadurch entstand eine überlappende Sequenz beider Fragmente von 27 Nt (rote Linien). Über die mutagenen *primer* NotNfw, der sich am N-Terminus des N-ORF anlagert, und NotNrv, der sich am C-Terminus des N-ORF anlagert, wurden *NotI*-Schnittstellen in die PCR-Produkte eingebaut.

In einer anschließenden Fusions-PCR wurden die beiden Fragmente über ihre überlappenden Teile zu der Sequenz des N Δ 472-91-ORF, verbunden, flankiert von zwei *NotI*-Schnittstellen. Während einer Zwischenklonierung des N Δ 472-91-ORF in das pUC-Plasmid konnte die Sequenz verifiziert werden. Zum Schluss wurde dieser partiell deletierte N-ORF in die Δ N-TRKA von pRS- Δ N PE F_{mut} über die *NotI*-Schnittstelle zum finalen Konstrukt pRS-N Δ 472-91 PE F_{mut} eingesetzt.

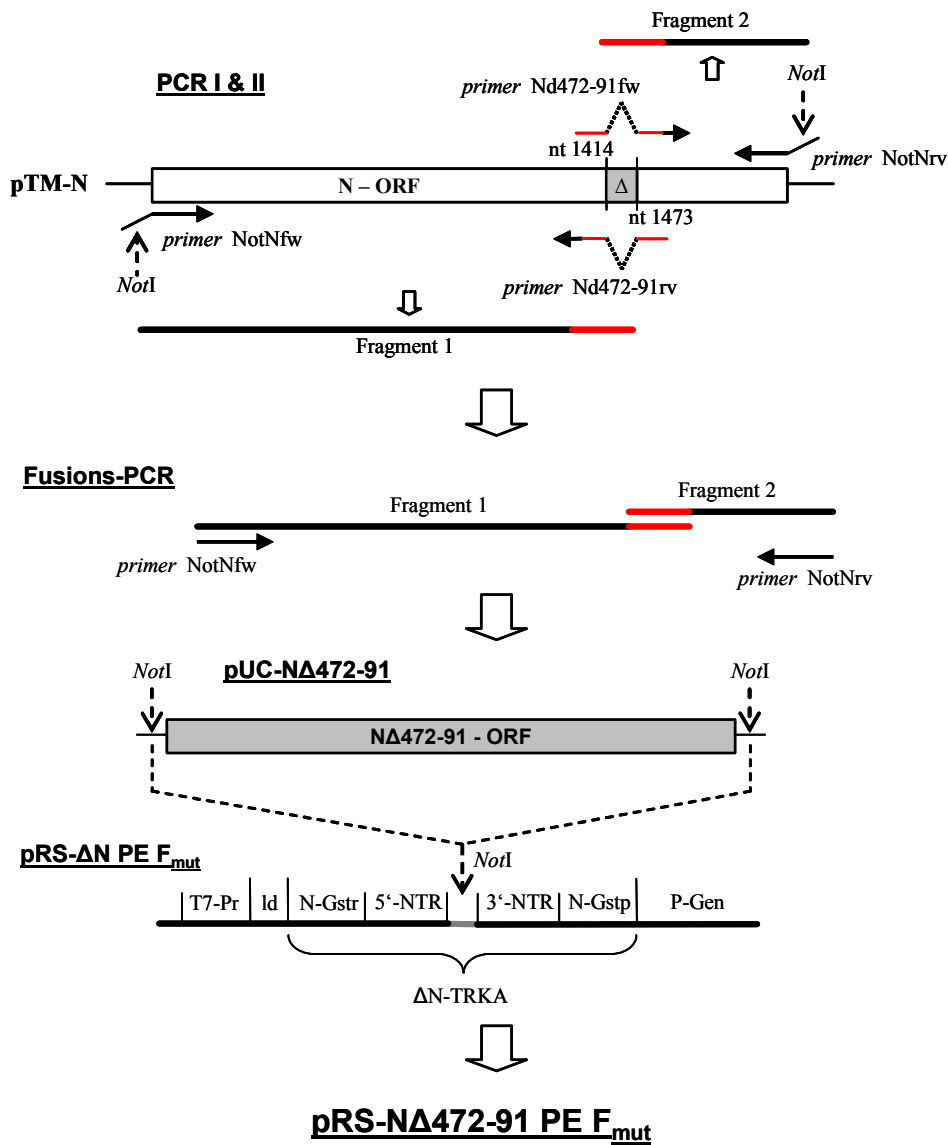


Abbildung 32: Klonierungsschema zur Herstellung der cDNA pRS-NΔ472-91 PE F_{mut}. Zunächst Herstellung des partiell deletierten N-ORF über PCR und Fusions-PCR unter Verwendung mutagener primer. Dann Integration des Rumpf-N-ORF in die ΔN-TRKA des Plasmids pRS-ΔN PE F_{mut}.

Der ORF des Konstrukts mit der vollständigen C-terminalen Deletion, NΔ472-524, wurde ebenfalls über PCR hergestellt. Die *primer* waren dabei so ausgewählt worden, dass nur der Bereich von As1-471 vervielfältigt und an den Enden jeweils eine *NotI*-Schnittstelle eingefügt wurde. Der NΔ472-524-ORF wurde in ein pUC-Plasmid kloniert, wo seine korrekte Sequenz verifiziert werden konnte. Anschließend wurde der ORF über die *NotI*-Schnittstelle in die ΔN-TRKA in pRS-ΔN PE F_{mut} zu pRS-NΔ472-524 PE F_{mut} integriert (Abb. 33).

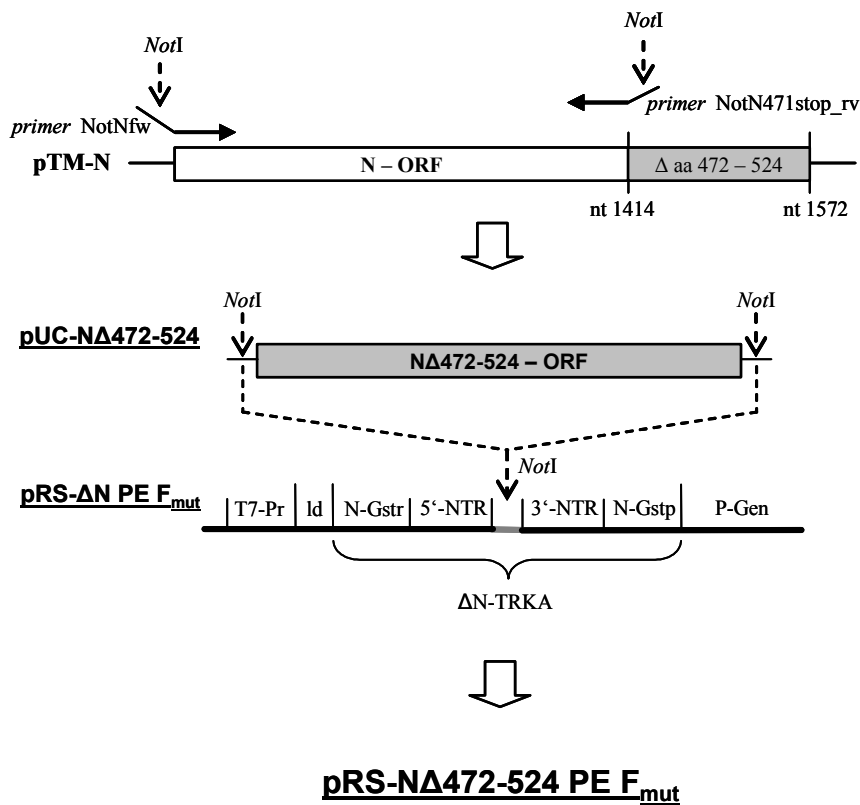


Abbildung 33: Klonierungsschema zur Herstellung der cDNA pRS-NΔ472-524 PE F_{mut}. Zunächst Herstellung des partiell deletierten N-ORF über PCR unter Verwendung mutagener *primer*. Dann Integration des Rumpf-ORF in die ΔN-TRKA des Plasmids pRS-ΔN PE F_{mut}.

Mit den beiden cDNA-Konstrukten pRE-NΔ472-91 PE F_{mut} und pRS-NΔ472-524 PE F_{mut} sollten nun im *virus rescue* initiale VP hergestellt werden. Dazu wurden zunächst die für SeV ΔN optimierten Bedingungen des *rescue* übernommen (3.1.3.3). Auf diese Weise ließen sich von beiden Virusmutanten ca. 13 500 *ciu/ml* initial herstellen. Obwohl diese Menge geringer war als bei SeV ΔN (20000 *ciu/ml*) wurde von einer Optimierung der jeweiligen *rescue*-Bedingungen für die beiden Mutanten und einer Vermehrung zunächst abgesehen, da diese Anzahl dennoch ausreichen sollte um ein potenziell von SeV ΔN verschiedenes Transkriptionsverhalten in Vero-Zellen feststellen zu können.

3.3.2.2. Detektion der eGFP-Transgenexpression

Um die Transkriptionseigenschaften der beiden Mutanten SeV NΔ472-91 PE F_{mut} und SeV NΔ472-524 PE F_{mut} zu testen wurden, analog zu vorherigen Versuchen, Vero- und Helferzellen (je 0,2 x 10⁶ Zellen) infiziert (*moi* 0,03). Als Kontrolle wurden SeV-wt-Infektionen durchgeführt. Alle 24 h wurden die Infektionen auf die Entwicklung von grüner Fluoreszenz überprüft. Während die SeV-wt-infizierten Zellen ab 1 d p.i. eine starke Fluoreszenz in Vero- und Helferzellen entwickelten, konnte eine eGFP-Transgenexpression nur in den SeV NΔ472-91- und SeV NΔ472-524-infizierten

Helferzellen ab 2 d p.i., nicht aber in Vero-Zellen beobachtet werden. Das Transkriptionsverhalten der beiden SeV-Mutanten mit partiell deletiertem N-Gen in Helferzellen unterschied sich daher nicht von dem von SeV ΔN , d.h. die von den Mutanten kodierten verkürzten N-Proteine schienen keinen Einfluss auf die Transkription zu haben. Voraussetzung für diese Annahme ist allerdings eine Herstellung der Rumpf-N-Proteine. Würde es in den mit SeV N Δ 472-91- und SeV N Δ 472-524-infizierten Vero-Zellen zu keiner oder nur einer sehr schwachen Transkription kommen, würden auch diese N-Proteine nicht synthetisiert werden oder möglicherweise nicht in der Menge, in der sie eine Transkription signifikant unterstützen könnten. Um daher eine mögliche Wirkung von partiell deletierten SeV N-Proteinen zuverlässiger beurteilen zu können, müssten die Rumpf-Proteine in großer Menge während einer Infektion vorhanden sein.

3.3.2.3. Test auf Unterstützung der SeV ΔN -Transkription durch verkürzte N-Proteine

Für die Beschreibung einer potenziellen Funktion des N-Proteins während der viralen Transkription sollten die Wirkungen von drei C-terminal deletierten N-Varianten im Vergleich zu vollständigem N-Protein während SeV ΔN -Infektionen untersucht werden. Alle drei N-Varianten unterstützen die SeV-Replikation nicht (Cevik et al., 2004), so dass die *template*-Anzahl während der Infektion unverändert bleibt. Um eine große Menge der verkürzten N-Proteine während SeV ΔN -Infektionen sicherstellen zu können, sollten diese auf Expressionsplasmiden kodiert vorliegen und über Transfektion in mit SeV ΔN -infizierte Zellen eingebracht werden.

Gemäß einer Kartierung der C-terminalen Domäne des N-Proteins sollten die Deletionen verschiedene funktionelle Bereiche des N-Proteins ausschalten (Cevik et al., 2004).

Tabelle 8: Übersicht über die partiellen N-Deletionen und ihre verbliebenen Funktionen.

	deletierte	restliches	Wechselwirkungen		
	Nt	Protein (As)	N ⁰ -P	N ^{NC} -P	N ^{NC} -N ^{NC}
N	0	524	x	x	x
N471	159	471	--	x	x
N461	189	461	--	--	x
N439	255	439	--	--	--

Wie in Tabelle 8 zusammengefasst, wurden bei den einzelnen Rumpf-N-Proteinen einige Eigenschaften eliminiert. Das N471, das über die As 1-471 verfügt und dem von der SeV-Mutante SeV N Δ 472-524 kodierten entspricht, kann nicht mit dem P-Protein im N⁰-P-Komplex interagieren, wodurch es die virale Replikation nicht mehr unterstützt. Das gleiche gilt auch für N461 und N439. Darüber hinaus sind bei N461 As, die für eine Wechselwirkung zwischen dem N-Protein im Nukleokapsid und dem P-Protein aus dem Polymerasekomplex verantwortlich sind, deletiert (N^{NC}-

PL). Das N439-Protein kann zusätzlich nicht mehr mit anderen, im Nukleokapsid integrierten, N-Proteinen interagieren (N^{NC} - N^{NC}).

Um diese Rumpf-N-Proteine während einer SeV ΔN -Infektion stark exprimieren zu können wurden ihre Leserahmen aus pGEM-Plasmiden (erhalten von Sue Moyer – Florida, USA) in pRECISE-Expressionsplasmide (3.2.2.2.1) umgesetzt. Dazu wurden die ORFs über die Schnittstellen für *SalI* und *XhoI* ausgeschnitten und an der *XhoI*-Schnittstelle in pRECISE-Plasmide ligiert. Nach erfolgreicher Transformation von *E.coli* (XL10-Gold) und Plasmid-Mini-Präparation konnte die korrekte Sequenz der N-Gene über Restriktionsverdau und Sequenzierung sichergestellt werden.

Bevor mit den erhaltenen Expressionsplasmiden SeV ΔN -infizierte Zellen transfiziert werden konnten, musste die Expression dieser Rumpf-N-Proteine durch die Plasmide verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen, da sie sich effizient transfizieren lassen, mit je $0,5 \mu\text{g}$ pRE-N439, -N461 und -N471 transfiziert. Als Kontrolle wurde auch das vollständige SeV N-Gen transfiziert (pRE-N). 2 d p.i. wurde die Expression der N-Proteine durch IF mit einem SeV N-spezifischen Antikörper überprüft. Wie die starken Fluoreszenzsignale in Abb. 34 zeigen, wurden alle N-Proteinvarianten in großer Menge in den transfizierten Zellen exprimiert.

Nun konnte die Wirkung der verschiedenen N-Proteine auf die Transkription während SeV ΔN -Infektionen getestet werden. $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen wurden zuerst mit SeV ΔN infiziert (*moi* 0,05) und anschließend mit jeweils $0,5$ und $1,0 \mu\text{g}$ der verschiedenen Plasmide (pRE-N439, pRE-N461, pRE-N471, pRE-N) transfiziert. Über den Zeitraum von 2-7 d p.i. wurden die transfizierten Infektions-Ansätze täglich auf eine eGFP-Transgenexpression untersucht. Während der Ansatz mit vollständigem N-Protein eine deutliche grüne Fluoreszenz ab 2 d p.i. aufwies, entwickelte sich in allen Ansätzen mit den Rumpf-N-Varianten keine grüne Fluoreszenz (Abb. 34). Die in den Zellen synthetisierten Rumpf-N-Proteine sind demnach nicht in der Lage eine Transkription von SeV ΔN zu unterstützen. Da allerdings das vollständige N-Protein eine starke Transkription auslöst, liegt möglicherweise C-terminal von As471 ein weiterer funktioneller Bereich des N-Proteins der direkt oder indirekt für die transkriptionsunterstützende Wirkung des N-Proteins essentiell ist.

Wie an der sternförmigen Ausbreitung der grünen Fluoreszenz der SeV ΔN -Infektion mit transfizierten vollständigem N-Gen zu erkennen ist, trat parallel zu einer Transkription auch eine Replikation von SeV ΔN auf. Dabei werden zusätzliche Virusgenome in den transfizierten Zellen hergestellt, wodurch die Anzahl an *templates* für eine eGFP-Transgenexpression zunimmt. Um auszuschließen, dass die beobachtete eGFP-Expression während SeV ΔN -Infektionen in Gegenwart von vollständigem N-Protein nur auf der erhöhten Anzahl an *templates* beruht, wurde eine weitere SeV N-Mutante entwickelt, die trotz Bereitstellung von SeV N-Protein replikationsdefizient bleibt.

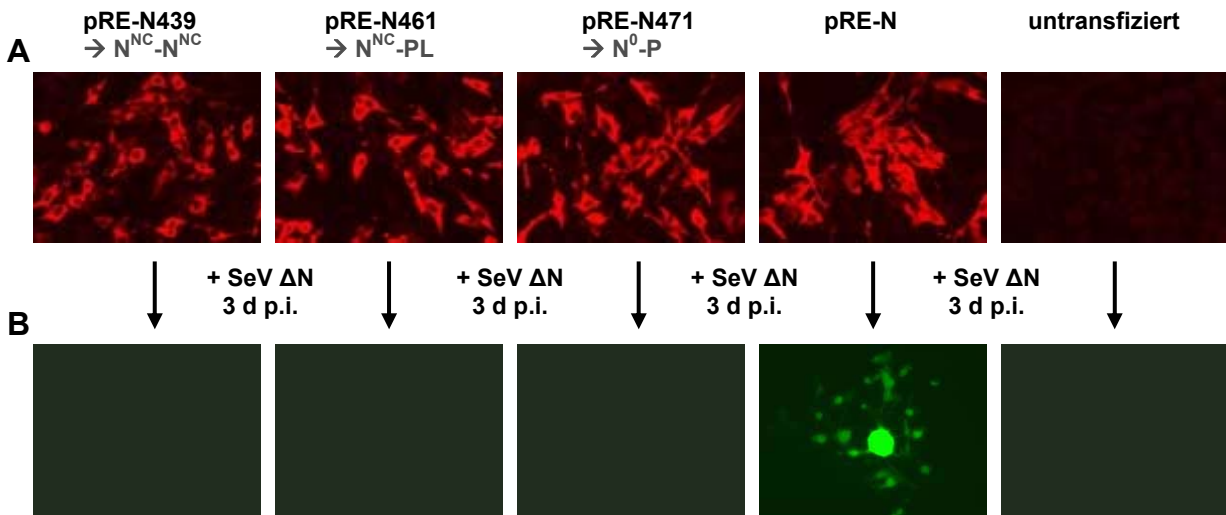


Abbildung 34: Nachweis der Expression der partiell deletierten SeV N-Proteine in transfizierten BSR-T7-Zellen (A) und der eGFP-Transgenexpression nach zusätzlicher Infektion mit SeV ΔN (B). (A) $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen wurden mit je $0,5 \mu\text{g}$ pRE-N439, -N461, -N471 und -N transfiziert. Durch SeV-N-spezifische Antikörper konnte die Expression der verschiedenen großen N-Proteine über IF verifiziert werden. Die für bei den N-Proteinvarianten deletierten Wechselwirkungen sind jeweils angegeben. (B) Zusätzlich zur Transfektion wurden die Zellen mit SeV ΔN infiziert (*moi* 0,05) und eine eGFP-Transgenexpression überprüft, hier exemplarisch für 3 d p.i. dargestellt.

3.3.3. Neusynthese von SeV N-Protein essentiell für effiziente SeV-Transkription

Um die Bedeutung des SeV N-Proteins für die virale Transkription genauer untersuchen zu können wurde die replikationsdefiziente SeV-Mutante SeV ΔN PΔ2-77E F_{mut} hergestellt. Diese Mutante vereint die Deletion des SeV N-Gens mit der Deletion der für die As 2-77 des P-Proteins kodierenden Nt. Hinter dem partiell deletiertem P-Gen befindet sich wiederum ein eGFP-Transgen. Während Infektionen mit dieser Mutante könnte SeV N-Protein zusätzlich zugeführt werden, ohne dass dadurch eine Virusreplikation ermöglicht würde. Trotz einer Transkomplementierung des fehlenden N-Proteins bliebe diese Mutante replikationsdefizient, da sie nur das Rumpf-P-Protein PΔ2-77 bilden kann, das alleine bereits eine Replikationsdefizienz vermittelt. Auf diese Weise würde die Anzahl an *templates*, die für eine Transgenexpression zur Verfügung standen, konstant bleiben.

Für eine genauere Untersuchung der Rolle des SeV N-Proteins bei der SeV-Transkription soll eine weitere Mutante, SeV ΔN PΔ2-77E F_{mut} , hergestellt werden.

3.3.3.1. Herstellung von SeV ΔN PΔ2-77E F_{mut}

Als erstes wurde wiederum das Virusgenom auf Ebene einer cDNA konstruiert, um danach im *virus rescue* zur Herstellung von VP eingesetzt werden zu können. Über PCR sollte ein Fragment mit

einer Deletion der Nt für die As 2-77 des SeV P-Proteins synthetisiert und anschließend in das Plasmid pRS-ΔN PE F_{mut} integriert werden. Als *template* für die PCR wurde pRS-ΔN PE F_{mut} eingesetzt. Der forward *primer* M13R lagerte sich vor dem T7-Promoter der cDNA an. Der mutagene *reverse primer* dNPd2-77rv lagerte sich im 5'UTR des P-Gens inklusive des Startkodons des P-ORF an und besaß einen Anhang von 24 Nt, die der Sequenz hinter dem Kodon der As 77 des P-Proteins entspricht (Abb. 35). So wurde ein ca. 370 bp-großes Fragment mit einer *Mlu*I-Schnittstelle am 3'-Ende und einer *Cla*I-Schnittstelle am 5'-Ende amplifiziert.

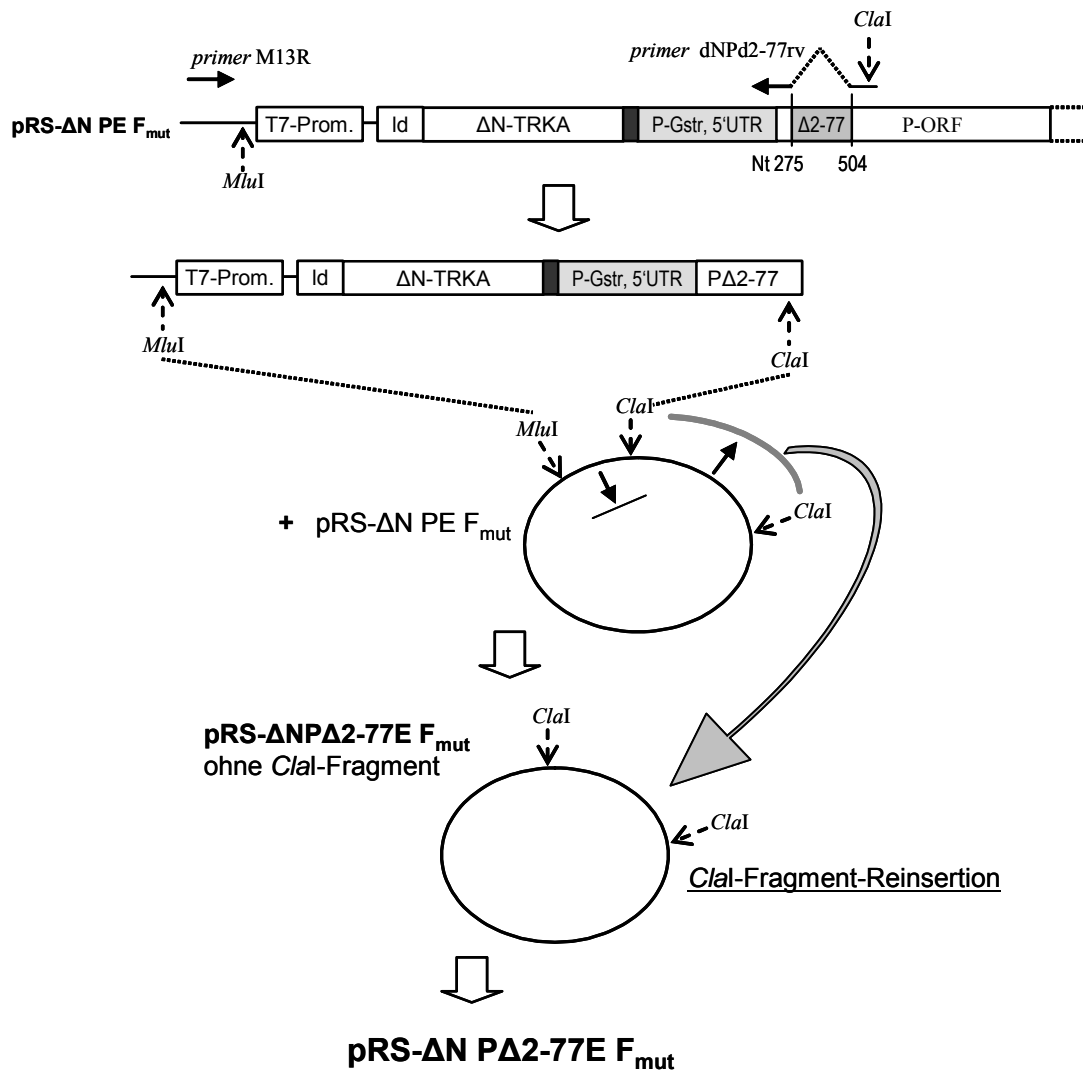


Abbildung 35: Klonierungsschema zur Herstellung der cDNA pRS-ΔN PΔ2-77E F_{mut}. Zunächst wurde in einer PCR mit dem *forward primer* M13R, dem mutagenen *reverse primer* dNPd2-77rv und dem *template* pRE-ΔN PE F_{mut} ein Fragment amplifiziert, das eine Deletion der Nt für die As 2-77 des SeV P-Proteins aufwies. Dem Empfängerplasmid pRE-ΔN PE F_{mut} wurde vorübergehend über *Cla*I-Restriktionsverdau ein Fragment entfernt um eine singuläre *Cla*I-Schnittstelle zu erhalten. Nun wurde das PCR-Produkt über *Mlu*I und *Cla*I in den Empfänger inseriert. Abschließend wurde das ausgeschnittene *Cla*I-Fragment zur finalen cDNA pRE-ΔN PΔ2-77E F_{mut} reinsertiert.

Da das Restriktionsenzym *Cla*I methylierungssensitiv ist, musste zunächst eine Retransformation von pRS-ΔN PE F_{mut} mit einem methylierungsdefizienten *E. coli*-Stamm angefertigt werden. Die

aus der angeschlossenen Plasmid-Mini-Präparation isolierte DNA konnte nun mit *ClaI* geschnitten werden. Aufgrund der Anwesenheit von zwei *ClaI*-Schnittstellen hinter der *MluI*-Schnittstelle im Empfängerplasmid pRS- Δ N PE F_{mut}, wurde das aus dem *MluI-ClaI*-Verdau generierte *ClaI*-Fragment zunächst zwischengelagert. Nachdem das PCR-Produkt über die *MluI*- und *ClaI*-Schnittstellen eingesetzt worden war, konnte das ausgeschnittene *ClaI*-Fragment zum vollständigen Konstrukt pRS- Δ N P Δ 2-77E F_{mut} reinsertiert werden. Abschließend wurde die korrekte Sequenz der cDNA über Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

Mit Hilfe dieser cDNA wurde nun versucht über den *virus rescue* VP herzustellen. Die Bedingungen wurden zunächst in Anlehnung an den SeV Δ N-*rescue* gewählt. Da diese „Doppeldeletionsmutante“ jedoch zwei Proteine zur Transkomplementierung und Produktion von Nachkommenviren benötigt resultierten aus dem *rescue* anfangs nur wenig VP. Durch Nachtransfektion von jeweils 1,5 μ g pRE-N und pRE-P 3 d p.t. konnte die Ausbeute an VP gesteigert werden. Obwohl die Effizienz des *rescue* noch deutlich geringer als die des SeV Δ N-*rescue* war konnten mit ca. 2 000 *ciu/ml* ausreichend infektiöse VP bereitgestellt werden, um die SeV-Transkription näher zu untersuchen.

3.3.3.2. Effiziente SeV-Transkription durch Neusynthese von SeV N-Protein

Die im *virus rescue* hergestellten SeV Δ N P Δ 2-77E F_{mut} sollten nun für eine Untersuchung der SeV-Transkription eingesetzt werden, um die Rolle des N-Proteins während der viralen Transkription genauer zu analysieren. Daraus sollten Rückschlüsse gezogen werden können warum während SeV Δ N-Infektionen von Zielzellen keine virale Genexpression beobachtet werden konnte.

Nach einer Infektion von BSR-T7-Zellen mit SeV Δ N P Δ 2-77E F_{mut} sollten die Zellen nur mit pRE-N oder mit pPRECISE-N und -P transfiziert werden. Durch die alleinige Transfektion von pRE-N sollte überprüft werden ob die Synthese von vollständigem SeV N-Protein bei einer konstanten *template*-Anzahl in den infizierten Zellen eine Transkription fördert. Die konstante *template*-Anzahl bleibt dabei bestehen, da zu einer vollständigen Transkomplementierung der Doppeldeletionsmutante neben pRE-N auch pRE-P benötigt wird. Eine Vermehrung der Viren durch Transfektion von pRE-N und -P sollte in einer parallel durchgeführten Infektion gezeigt werden. Werden keine zusätzlichen viralen Gene transfiziert ist keine Transkription zu erwarten.

$0,2 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen wurden mit ca. 800 *ciu* SeV Δ N P Δ 2-77E F_{mut} infiziert. Anschließend wurden die infizierten Zellen entweder gar nicht, mit 1,0 μ g pRE-N oder mit jeweils 1,0 μ g pRE-N und -P transfiziert. Die Entwicklung einer eGFP-Transgenexpression wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen verfolgt. Wie in Abb. 36 in Ausschnitten dargestellt, trat in infizierten Zellen, die nur mit pRE-N transfiziert worden waren, tatsächlich eine eGFP-Expression auf, die bereits 2 d p.i. deutlich sichtbar war. Dabei entwickelten sich im Gegensatz zu den mit pRE-N und pRE-P transfizierten Zellen keine Virusausbreitungen um die ursprünglich infizierten Zellen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der *templates* während der Infektion konstant blieb. Da

die nicht-transfizierten Zellen keinerlei Fluoreszenz zeigten, war transkriptionsfördernde Wirkung durch eine Neusynthese des SeV N-Proteins während SeV-Infektionen eindeutig nachgewiesen.

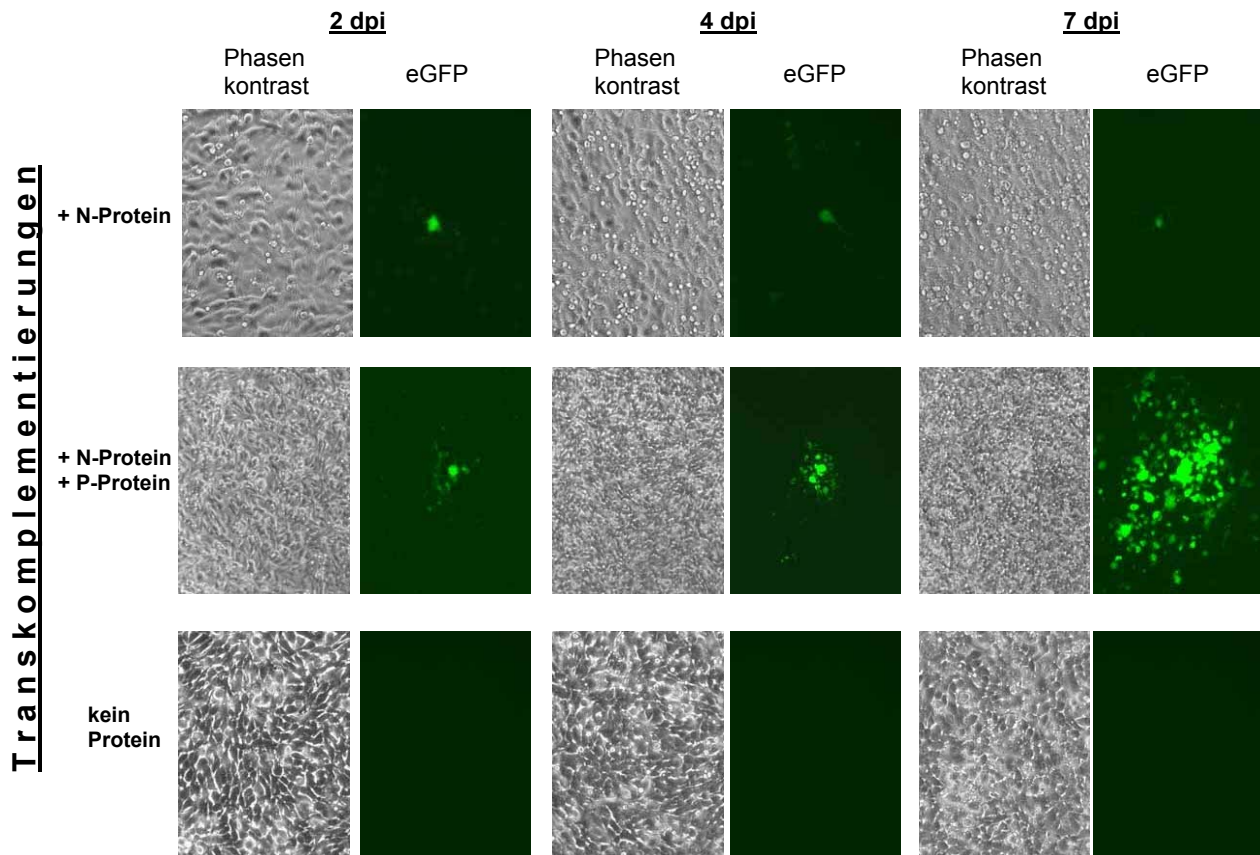


Abbildung 36: eGFP-Transgenexpression in SeV ΔN PA2-77-infizierten BSR-T7-Zellen bei angegebener Transkomplementierung. $0,25 \times 10^6$ BSR-T7-Zellen wurden mit 800 *ciu* SeV ΔN PA2-77E F_{mut} infiziert. Durch Transfektion wurde einem Infektionsansatz zusätzliches SeV N-Protein (+N-Protein) und einem anderen zusätzliches N- und P-Protein (+N-Protein, +P-Protein) zugeführt. Von jeder Plasmid-DNA (pRE-N, pRE-P) wurden jeweils 1,0 μg eingesetzt. Die Entwicklung der eGFP-Transgenexpression ist exemplarisch für 2, 4 und 7 d p.i. aufgeführt. Die Phasenkontrastbilder zeigen alle vorhandenen Zellen pro Mikroskopausschnitt.

3.3.4. Zusammenfassung der Genexpression von SeV ΔN

Während der Infektion von Vero-Zellen mit SeV ΔN PE F_{mut} trat keine eGFP-Transgenexpression auf, die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops oder einer FACS-Analyse detektiert werden konnte. Über das sehr sensitive Nachweisverfahren der Immunfluoreszenz wurde anschließend überprüft ob für SeV ΔN in Vero-Zellen von 1 bis 3 d p.i. überhaupt eine virale Proteinsynthese auftrat. Allerdings konnte keine Zunahme an viralen Proteinen in infizierten Vero-Zellen beobachtet werden. Zu Vergleichszwecken wurden die ebenfalls replikationsdefizienten Mutanten SeV IdE ΔP F_{mut} und SeV IdE PA2-77 F_{mut} eingesetzt. Während SeV ΔP , analog zu SeV ΔN , keine Genexpression ohne zusätzlich zugefügtem SeV P-Protein zeigte, vermochte SeV PA2-77, das für ein nur partiell deletiertes P-Protein kodiert, eine deutliche eGFP-Transgenexpression während

Vero-Zellinfektionen auszulösen. Wurde während SeV Δ N-Infektionen das SeV N-Protein *in trans* bereitgestellt, sei es durch eine Helferzelle oder durch transiente Transfektion, trat eine deutlich eGFP-Transgen- bzw. virale Genexpression auf. Durch das zusätzliche SeV N-Protein war SeV Δ N jedoch auch wieder in der Lage Genome zu replizieren, wodurch mehr *templates* für eine Transkription zur Verfügung standen und möglicherweise der Grund für die nun auftretende eGFP-Expression waren.

Der Versuch über weitere replikationsdefiziente SeV N-Genmutanten (SeV N Δ 472-91 PE F_{mut} und SeV N Δ 472-524 PE F_{mut}), die über ein partiell deletiertes N-Gen verfügten, die virale Transkription zu steigern gelang nicht. Für eine eingehende Analyse der Wirkung von teilweise deletierten N-Proteinen auf die SeV-Transkription wurden drei C-terminal verkürzte SeV N-Proteinvarianten (N439, N461, N471) über transiente Transfektion in SeV Δ N-infizierten Zellen in großer Menge synthetisiert. Keines der N-Proteine konnte eine Genomreplikation von SeV Δ N unterstützen, da der Bereich für die Wechselwirkung mit dem SeV P-Protein im N⁰-P-Komplex fehlte. Zusätzlich konnten N439 und N461 als N im Nukleokapsid eingebaut (N^{NC}) nicht mehr mit dem P-Protein der Polymerase (PL) interagieren und N439 auch nicht mehr mit anderen N^{NC}-Proteinen. Keines dieser C-terminal verkürzten N-Proteine war allerdings in der Lage eine eGFP-Transgenexpression von SeV Δ N zu unterstützen.

Die Frage, ob nur ein vollständiges N-Protein die SeV-Transkription unterstützen kann und somit von potenziellen SeV-Vektoren kodiert werden müsste, sollte durch die Herstellung einer weiteren SeV-Mutante beantwortet werden. Bei Infektionen mit der replikationsdefizienten Mutante SeV Δ N P Δ 2-77E F_{mut} konnte während Infektionen zusätzliches SeV N-Protein bereitgestellt werden, ohne dass eine Genomreplikation möglich war, da sie gleichzeitig nur das verkürzte P Δ 2-77-Protein bildet, das alleine bereits eine Replikationsdefizienz vermittelt. Während Transfektion von SeV Δ N P Δ 2-77-infizierten Zellen mit SeV N-Genkopien konnte eindeutig eine Unterstützung der SeV-Transkription durch vollständiges N-Protein bei gleich bleibender *template*-Anzahl festgestellt werden. Damit erweisen sich SeV Δ N oder SeV N Δ -Mutanten nicht als geeignete Kandidaten für die Entwicklung replikationsdefizienter Vektoren, weil sie keine Transgene exprimieren können. Durch die Herstellung und Charakterisierung dieser Mutanten wurden aber völlig neue Erkenntnisse gewonnen, die eine Modifikation der Vorstellungen zur Funktion des viralen Polymerasekomplexes zwingend erfordern.

3.4. Reduzierung der Zytotoxizität von SeV-Vektoren

Das Sendai Virus (SeV) eignet sich als ein gut erforschter und nicht-humanpathogener Vertreter der Paramyxoviren besonders gut für die Entwicklung eines viralen Vektors, der auf dem Gebiet der Gentherapie oder der Impfstoffentwicklung eingesetzt werden könnte. Eine essentielle

Voraussetzung eines Vektors stellt die Anwendungssicherheit dar. Einerseits soll der Vektor im Zielorganismus durch das Immunsystem nicht zu schnell eliminiert werden, da er sonst seine Wirkung nicht entfalten kann. Andererseits darf er den Organismus nicht ernsthaft schädigen, da sonst sein Nutzen in Frage gestellt ist.

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde die SeV-Mutante Fctr48z hergestellt, die durch eine stabil integrierte Mutation im *leader* einen zelltypabhängigen, reduzierten zytopathischen Effekt (CPE) bei gleichzeitig guter Vermehrbarkeit auslöst (Wiegand, 2003).

Eine Charakterisierung der Mutante in Zellkultur wurde bisher überwiegend mit Zellen vorgenommen, die tierischen Ursprungs waren. Da der Vektor allerdings im humanmedizinischen Bereich Anwendung finden soll, sollte sein Verhalten auf weiteren menschlichen Zelllinien erforscht werden. Des Weiteren sollte beurteilt werden können inwieweit die Zytopathogenität von Vektoren auf Basis des SeV durch stammspezifische Eigenschaften definiert wird. Dabei sollte auf mögliche Unterschiede bei der Auslösung einer Zellschädigung durch den SeV Stamm Z, auf dessen Sequenz die mutierte *leader*-Sequenz des Fctr48z beruht, und den Stamm Fushimi (F), von dem der restliche genomische Anteil des Fctr48z stammt, geachtet werden (Abb. 37).

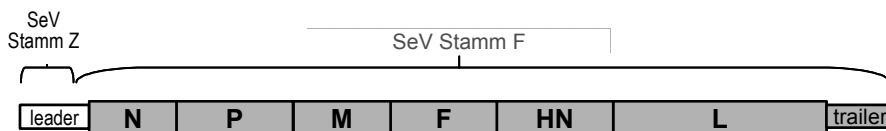


Abbildung 37: Genomschema von SeV Fctr48z mit SeV Z- und F-Stamm-spezifischen Anteilen.

3.4.1. Zelltyp-abhängiger reduzierter CPE bei Humanzelllinien

Um die Auswirkungen von Infektionen mit der Virusmutante Fctr48z auf humanen Zellen und mögliche Zelltyp-spezifische Unterschiede feststellen zu können, wurden folgende menschliche Zelllinien ausgewählt: 293 (Nierenepithelzellen), HepG2 (Leberkarzinomzellen), A549 (Lungenkarzinomzellen). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem Wildtyp SeV des F-Stamms infiziert. Nach Infektion der Zellen, jeweils mit beiden Viren (*moi* 3), wurde das Auftreten eines CPE anhand der Zellmorphologie von 1-3 d p.i. verfolgt. Während SeV F jede Kultur bis 3 d p.i. vollständig abgetötet hatte, überlebten nach Infektion mit Fctr48z bei allen drei Zelllinien ca. 30% der Zellen (Abb. 38). Es trat also ein großer Unterschied in der Virulenz zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden. Dennoch löste die Mutante bei den hier untersuchten Zelllinien einen relativ starken CPE aus (ca. 70% tote Zellen 3 d p.i.), verglichen mit Infektionen bereits früher getesteter Zelllinien (Vero, LLC-MK₂, BHK-21, HeLa). Zu Vergleichszwecken sind in Abb. 38 alle, d.h. auch die bereits früher getesteten, Zelllinien aufgeführt.

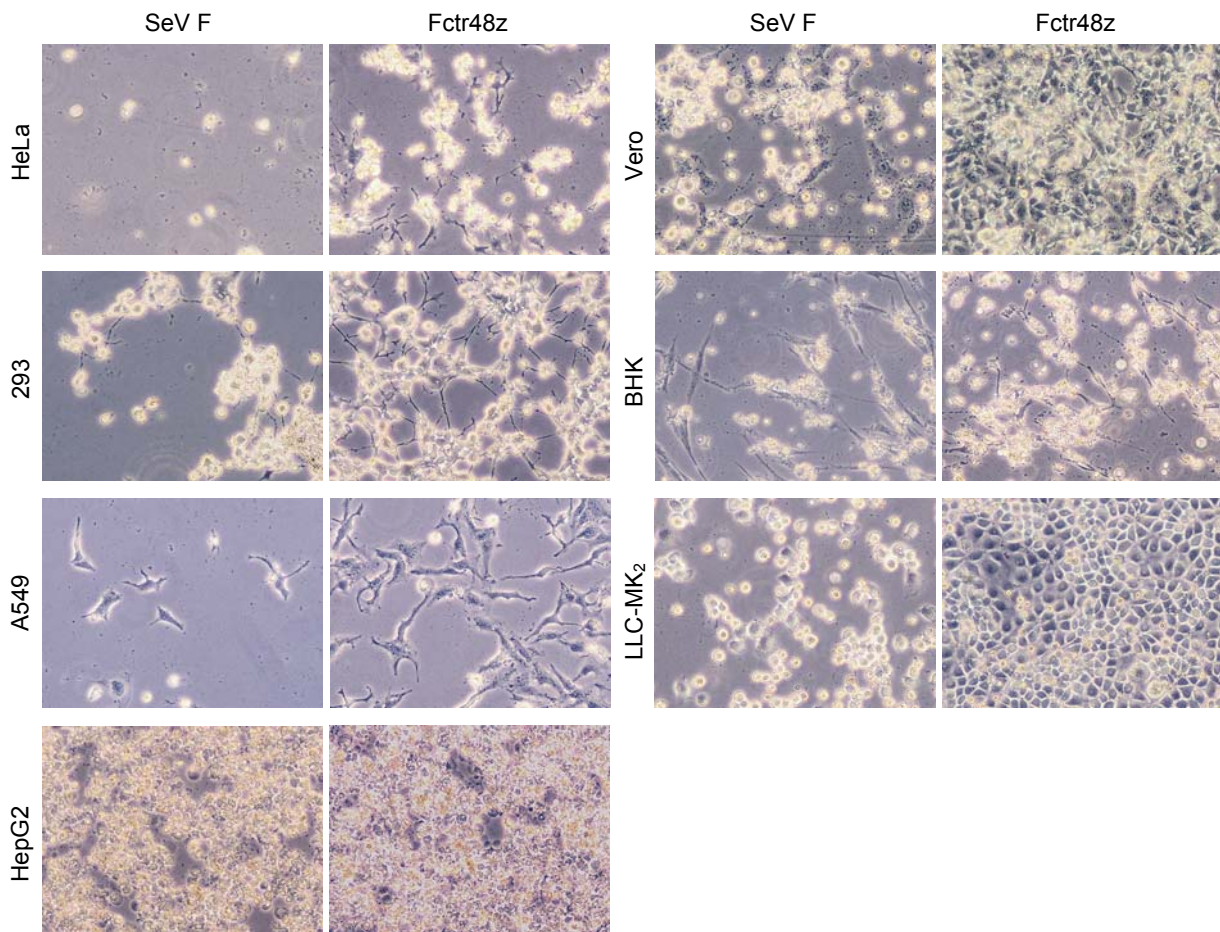


Abbildung 38: Vergleich des CPE ausgelöst durch SeV-wt- oder Fctr48z-Infektionen 3 d p.i. in sieben verschiedenen Zelllinien. HeLa-, 293-, A549-, HepG2-, Vero-, BHK- und LLC-MK₂-Zellen wurden mit SeV-wt oder Fctr48z infiziert (*moi* 3). 3 d p.i. wurden die Zytopathogenität der SeV-wt-Infektionen mit denen der Fctr48z-Infektionen anhand der Zellmorphologie verglichen.

Wie bei allen zuvor getesteten Zelllinien, wurde als nächstes die Virusvermehrung von Fctr48z und SeV F gemessen, um eine mögliche Korrelation der Stärke des beobachteten CPE und der Zellbelastung durch Produktion von Viruspartikeln (VP) beurteilen zu können. Dazu wurden die Zellen wieder jeweils mit *moi* 3 infiziert. Anschließend wurden alle 24 h die Überstände mit Hilfe des HA-Tests auf freigesetzte Viruspartikel untersucht. Dabei wurden die Überstände der infizierten Zellkulturen bis 4 d p.i. analysiert und die bestimmten Mengen an VP für jede Zelllinie zusammengezählt. Hierbei zeigte sich jeweils eine geringere Vermehrung von Fctr48z im Vergleich zu SeV F. Die Reduktion fiel allerdings nicht so reduziert aus, dass damit der bei einigen Zelltypen schwächere CPE zu erklären wäre. Die absoluten Mengen zwischen den Zelllinien variieren deutlich, unabhängig von der Stärke des CPE. Während HepG2-Zellen 140×10^7 Nachkommenpartikel von SeV F generierten, sind es bei A549-Zellen nur 50×10^7 und bei 293-Zellen nur 20×10^7 . Trotzdem induziert SeV F, unabhängig von der Menge an

Nachkommenpartikel, bei allen drei Zelllinien eine so heftige Zellschädigung, dass alle Zellen bis 3 d p.i. abgestorben waren.

Die Werte an produzierten VP für die Mutante liegen für HepG2 bei 50×10^7 , für A549-Zellen bei 10×10^7 und für 293-Zellen bei 5×10^7 (Abb. 39). Trotz der geringeren Herstellung von VP im Vergleich zu SeV F zeigen diese Werte, dass die mit der Mutante infizierten Zellen einer hohen Last durch die Synthese von VP ausgesetzt sind und dennoch einen deutlich reduzierten CPE aufweisen. Dieser muss auf positive Eigenschaften der Mutation des Fctr48z zurückgeführt werden.

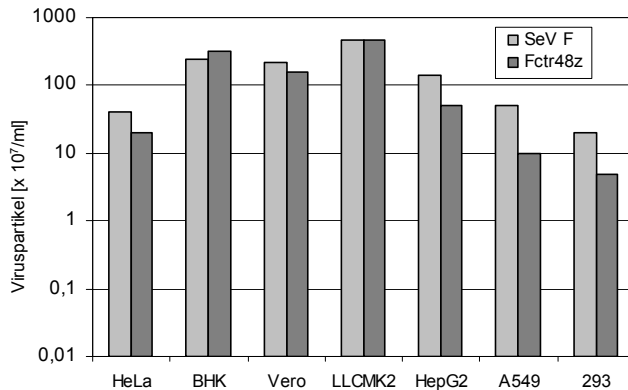


Abbildung 39: Anzahl an freigesetzten Viruspartikeln von SeV F und Fctr48z aus sieben Zelllinien. Von 1-4 d p.i. wurden alle 24 h die Partikelanzahl im Zellkulturüberstand mittels HA-Test bestimmt.

Nachdem Infektionen mit Fctr48z Zelltyp-spezifisch einen unterschiedlich starken CPE auslösten und die Mutante eine Chimäre aus dem Stämmen Z und F darstellt, soll im Folgenden geklärt werden, ob eventuell stammspezifische Eigenheiten von SeV Z und SeV F zur Auslösung eines unterschiedlich starken CPE beitragen können.

3.4.2. Vergleich der Zytopathogenität von SeV-Stamm F und Z

Die unter 3.4.1 beschriebenen Infektionsversuche mit der Mutante Fctr48z zeigten einen Zelltyp-abhängigen reduzierten CPE im Vergleich zu Infektionen mit SeV F. Da der mutierte *leader*-Bereich von Fctr48z der Sequenz aus dem Stamm Z entspricht, der restliche genomische Anteil (*backbone*) von 15 336 Nt aber der Sequenz von Stamm F (Abb. 37), könnten stammspezifische Unterschiede zwischen F und Z für die Zytopathogenität des viralen Vektors eine Rolle spielen. Möglicherweise könnte die zellschädigende Wirkung eines Vektors durch Verwendung der Sequenz des Z-Stamms für den *backbone* weiter reduziert werden.

Um das zytopathische Potenzial von SeV F- und SeV Z-Wildtyp-Viren zu bestimmen, wurden mit diesen jeweils drei verschiedene Zelllinien (Vero, BHK und LLC-MK₂) mit *moi* 3 infiziert. Während der Beobachtung des Infektionsverlaufs anhand der Zellmorphologie über drei Tage, konnte bereits nach 24 h eine starke Schädigung der Zellen durch SeV F festgestellt werden. Die mit

SeV Z infizierten Zellen zeigten nach drei Tagen zwar einen deutlichen CPE, doch lebten noch ca. 50% der Zellen. Alle mit SeV F infizierten Zellen waren nach drei Tagen abgestorben (Abb. 40). Zelltyp-spezifische Unterschiede konnten bei diesen Infektionen nicht ausgemacht werden.

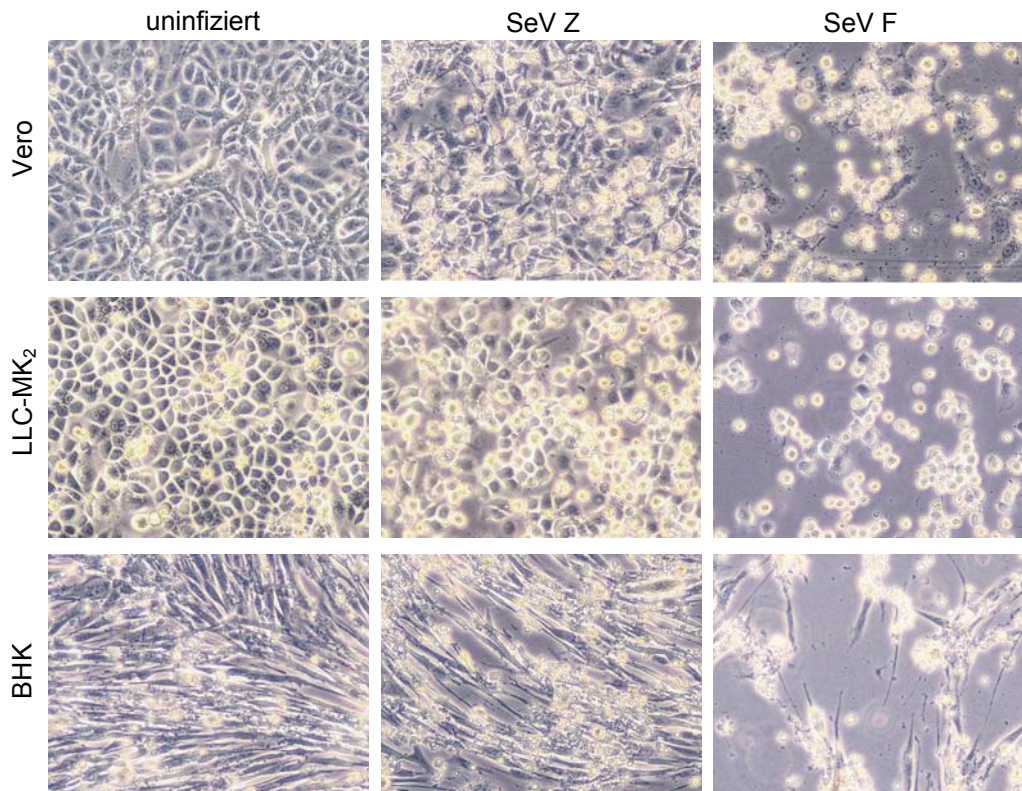


Abbildung 40: Vergleich der zytopathischen Wirkung von Infektionen mit SeV Z und SeV F. Vero-, LLC-MK₂- und BHK-Zellen wurden mit SeV Z oder SeV F infiziert (*moi* 3) und 3 d p.i. ihre Morphologie verglichen. Als Negativkontrolle dienten jeweils uninfizierte Zellen.

Als nächstes sollten diese mikroskopischen Beobachtungen des CPE mit Hilfe eines Vitalitätstests (MTT-Assay) verifiziert und die zellschädigende Wirkung der beiden Sendai Stämme quantifiziert werden. Stellvertretend für alle drei Zelllinien wurden nun Vero-Zellen wiederum mit beiden Virusstämmen mit *moi* 3 infiziert. Nach einem, nach zwei und nach drei Tagen wurde jeweils die Vitalität der infizierten Zellen über den MTT-Assay ausgewertet. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte Zellen, als Positivkontrolle Zellen, die mit einem schwach konzentrierten Detergens inkubiert wurden. Wie in Abbildung 41 dargestellt, nahm die Zellvitalität ab 2 d p.i. bei den Infektionen mit beiden Virusstämmen rapide ab, jedoch während SeV F-Infektionen deutlich schneller. Während nach drei Tagen fast alle Zellen der SeV F-Infektion abgestorben waren, lebte zu diesem Zeitpunkt noch ca. die Hälfte der mit SeV Z infizierten Zellen. Sowohl die Heftigkeit als auch das Tempo einer CPE-Entwicklung zeigten sich für SeV Z reduziert. Die uninfizierten Zellen

bewahrten eine konstante Vitalität über drei Tage. Alle Zellen der Positivkontrolle waren bereits nach 24 h abgestorben.

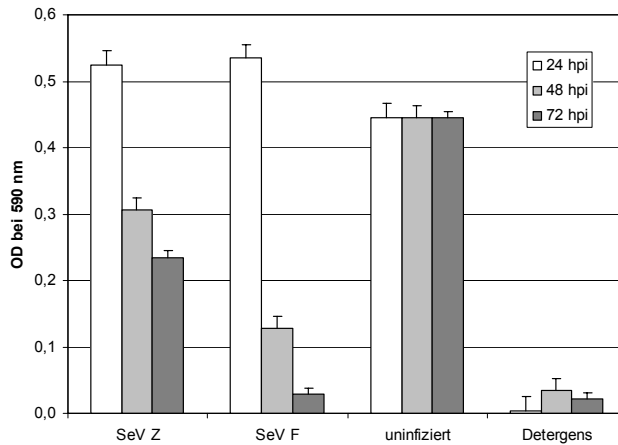


Abbildung 41: Vergleich der Vitalität von Vero-Zellen infiziert mit SeV Z oder SeV F. Parallel mit SeV F und SeV Z infizierte Vero-Zellen (*moi* 3) wurden bis 72 h p.i. alle 24 h auf ihre Vitalität im Vergleich zu uninfizierten (Negativkontrolle) und mit einem stark zellschädigendem Detergens (Positivkontrolle) untersucht. Die Zellvitalität konnte mit Hilfe des MTT-Assays quantifiziert werden.

Als nächstes wurde überprüft ob die höhere Belastung der mit SeV F infizierten Zellen auf eine stärkere Produktion an Nachkommenviren zurückzuführen war. Dazu wurden Vero-Zellen mit SeV F oder SeV Z (*moi* 3) infiziert und alle 24 h bis 4 d p.i. die freigesetzten Nachkommenpartikel durch den HA-Test bestimmt. Ein Vergleich der von beiden Infektionsansätzen hergestellten Mengen an VP offenbarte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 42). Obwohl die Nachkommenproduktion bei der SeV F-Infektion etwas schneller begann, stellten beide Virusstämme bis 4 d p.i. vergleichbar viele Nachkommenpartikel her. Der Faktor der „Zellbelastung“ durch eine verschieden hohe Herstellung und Ausschleusung von VP durch SeV F und SeV Z konnte also als Ursache für den unterschiedlich starken CPE ausgeschlossen werden.

Anscheinend tragen andere stammspezifische Charakteristika zu dem bei Infektionen mit SeV F beobachteten stärkeren CPE bei. Daher sollte die Fokussierung auf den Auslösemechanismus der Zellschädigung zu einer Aufklärung beitragen.

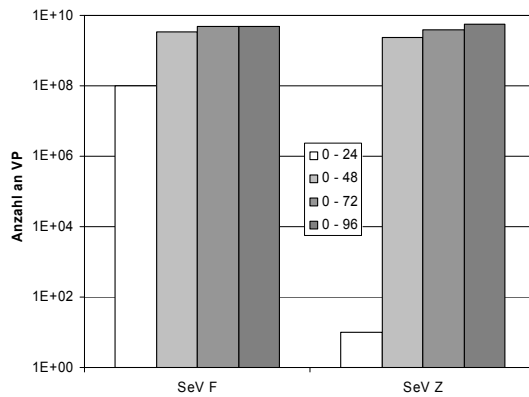


Abbildung 42: Vergleich der Nachkommenproduktion während Infektionen mit SeV Z und SeV F. Vero-Zellen wurden mit SeV Z und SeV F infiziert (*moi* 3). Alle 24 h wurden aus den Kulturüberständen mit Hilfe des HA-Tests die Anzahl freigesetzter VP bestimmt und bis 4 d p.i. addiert.

3.4.3. Induktion von Apoptose durch SeV-Stamm F über verschiedene Mechanismen

Nachdem für SeV F im Vergleich zu SeV Z eine stärkere zellschädigende Wirkung festgestellt worden war, sollte eine Untersuchung von Auslösemechanismen des CPE durch den SeV F-Stamm zu einem besseren Verständnis und in der Folge zu einer möglichen Reduzierung des CPE beitragen. Bereits seit langem ist bekannt, dass SeV-Infektionen Apoptose induzieren. Eine Beteiligung von Caspasen an Auslösung und Ablauf der Apoptose wurde mehrfach gezeigt. Vor kurzem wurde allerdings eine weitere Wechselwirkung zwischen dem zellulären Protein TIAR und Transkripten der SeV *trailer*-RNA des Z-Stamms gefunden (Iseni et al., 2002). Eine verstärkte Herstellung dieser *trailer*-Transkripte über eine Virusmutante resultierte in Infektionen, die keinen Zelltod mehr auslösten. Diese *trailer*-Sequenz befindet sich in unserer Mutante Fctr48z an der Stelle des *leaders*, der zu Beginn jeder viralen mRNA-Synthese transkribiert wird. Die entstandenen Transkripte sollten während Infektionen mit Fctr48z eine Apoptose-Antwort der Zelle über eine Wechselwirkung mit TIAR, wie für die Mutante des Z-Stamms berichtet, unterdrücken. Wie unter 3.4.1 allerdings gezeigt, induzieren Fctr48z-Infektionen weiterhin Apoptose, wenngleich in reduziertem Ausmaß. Daher wurde die Frage gestellt ob die Reduktion mit der Abschaltung einer Komponente, die zu einer Apoptoseantwort beiträgt, zusammenhängt, wobei gleichzeitig noch weitere Komponenten Apoptose auslösen können, d.h. Apoptose kann während der SeV F-Infektion möglicherweise auf verschiedene Arten induziert werden.

Um sich einer Bestätigung dieser Hypothese zu nähern sollte während Infektionen mit dem SeV F und der Mutante Fctr48z eine Caspase-induzierte Antwort durch die Verwendung des Pancaspase-Inhibitors (z-VAD-fmk) unterdrückt werden. Als Zelllinien wurden zum einen HeLa ausgewählt, für die gezeigt werden konnte, dass Infektionen mit Fctr48z einen im Vergleich zu SeV F verminderten CPE herbeiführen ohne die Zellen vollkommen zu schützen. Zum anderen wurden LLC-MK₂-Zellen

verwendet, die eine Fctr48z-Infektion ohne nennenswerte Beeinträchtigung überlebten, durch SeV F jedoch stark geschädigt wurden (Wiegand, 2003).

Die Zellen wurden mit SeV F und Fctr48z jeweils mit *moi* 3 infiziert und anschließend mit und ohne z-VAD-fmk (50 μ M) inkubiert. Als Positivkontrolle dienten mit UV-C-Licht bestrahlte Zellen und als Negativkontrolle uninanzierte Zellen. Nachdem über die Dauer von drei Tagen alle 24 h das Medium erneuert worden war, wobei jedes Mal frisches z-VAD-fmk zugegeben worden war, wurde von allen Ansätzen die Zellvitalität mit Hilfe des MTT-Assay bestimmt (Fig. 43). Die SeV F-Infektion führte bei HeLa-Zellen zu einem fast vollständigen Absterben der Kultur und bei LLC-MK₂-Zellen zu einer Reduzierung der Vitalität um ca. ein Drittel im Vergleich zu uninanzierten Zellen. Wurden diese Kulturen jedoch in Gegenwart z-VAD-fmk kultiviert, wiesen sie eine deutlich höhere Vitalität auf. Die Vitalität von HeLa-Zellen war nur noch um ein Drittel reduziert und die der LLC-MK₂-Zellen nur noch um ein Fünftel. Wenngleich die SeV F-Infektion die Zellen noch schädigte, war das Ausmaß durch Inhibition der Caspasen deutlich geringer als vorher.

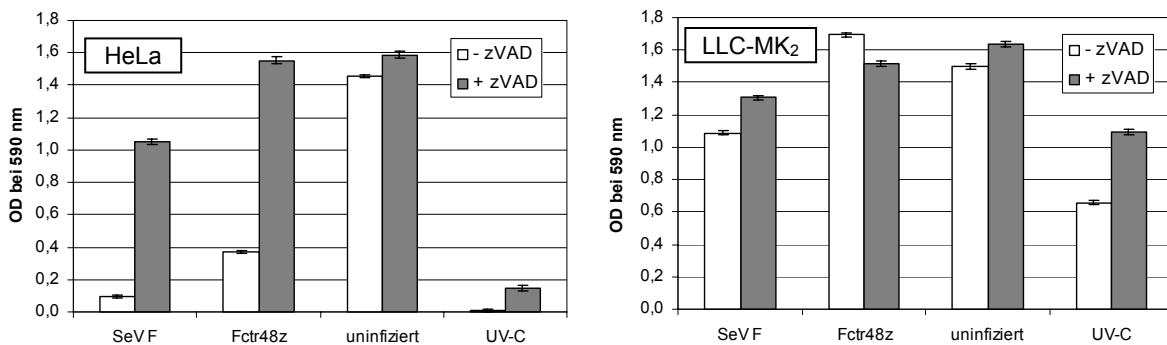


Abbildung 43: Wirkung von Caspasen-Inhibition auf Vitalität von HeLa und LLC-MK₂-Zellen während Infektionen mit SeV F und Fctr48z. Die infizierten Zellen (*moi* 3) wurden in Gegenwart oder Abwesenheit des Pancaspase-Inhibitors z-VAD-fmk (50 μ M) für 3 d inkubiert, wobei alle 24 h das Medium erneuert wurde. Anschließend wurde mit Hilfe des MTT-Tests die Zellvitalität bestimmt. Als Positivkontrolle dienten mit UV-C-Licht (40 Jm⁻²) bestrahlte, als Negativkontrolle uninanzierte Zellen.

Eine interessante Entwicklung konnte bei den Fctr48z-Infektionen entdeckt werden. Wie schon früher beobachtet entwickeln LLC-MK₂-Zellen, die mit der Mutante Fctr48z infiziert wurden keinen CPE. Das konnte hier ein weiteres Mal bestätigt werden. Deshalb konnte die Zugabe von z-VAD-fmk keinen weiteren positiven Effekt bewirken. Sowohl mit als auch ohne z-VAD-fmk wiesen LLC-MK₂-Zellen ihre volle Vitalität auf. Für HeLa-Zellen zeigte sich ein anderes Bild. HeLa-Zellen, die kein z-VAD-fmk zugesetzt bekommen hatten, zeigten durch die Fctr48z-Infektion eine starke Zellschädigung, die allerdings deutlich geringer war als bei der Infektion mit SeV F. War dem Medium allerdings z-VAD-fmk zugesetzt worden, besaßen die HeLa-Zellen nach drei Tagen die gleiche Vitalität wie uninanzierte Zellen, d.h. die Auslösung von Zelltod wurde vollständig

aufgehoben. Da nur die Kombination von Caspase-Inhibition mit der Infektion mit Fctr48z die volle Vitalität von HeLa-Zellen erhält, scheinen bei dieser Unterdrückung eines CPE sich ergänzende Mechanismen beteiligt zu sein. Gleichzeitig müsste das bedeuten, dass während der Infektion mit SeV F mindestens zwei Mechanismen an der Auslösung einer Zellschädigung beteiligt sind. Einer lässt sich durch Inhibierung von Caspasen außer Kraft setzen, der andere während der Infektion mit Fctr48z, bei der *trailer*-RNA synthetisiert wird, die mit dem zellulären Protein TIAR wechselwirkt und so eine Apoptose-Induktion verhindert.

Das zellschädigende Potenzial von SeV F scheint auf eine Beteiligung verschiedener Mechanismen an der CPE-Auslösung zurückzuführen zu sein, wovon einer ohne eine Beteiligung von Caspasen funktioniert. SeV Z auf der anderen Seite scheint seine zytopathische Wirkung primär über die Involvierung von TIAR auszuüben, da ja gezeigt werden konnte, dass der Einsatz von *trailer*-RNA, die mit TIAR wechselwirkt, ausreicht, um einen CPE zu verhindern.

Zusammenfassend lassen sich aus diesen Ergebnissen folgende Schlüsse für die Entwicklung eines Vektors mit vermindertem zytopathischen Effekt ziehen. Der Austausch der ersten 48 Nt des SeV F-Genoms gegen die äquivalente Sequenz des Antigenoms von Stamm Z, verwirklicht in der Mutante Fctr48z, bewirkt eine Reduzierung der Zellschädigung während Infektionen. Das Ausmaß dieser Reduktion hängt stark von dem infizierten Zelltyp ab. Dabei reicht die Spanne von einer CPE-Entwicklung, die nur geringfügig geringer ist als bei Infektionen mit dem SeV F, wie z.B. bei HeLa-Zellen, über Zellen, die nur mittelmäßig geschädigt werden, wie die Vero-Zellen, bis zu einer vollständigen Unterdrückung eines CPE, wie es Infektionen von LLC-MK₂-Zellen zeigen.

Darüber hinaus konnte für die beiden SeV Stämme Z und F ein unterschiedliches zytopathisches Potenzial festgestellt werden. Der durch den F-Stamm induzierte, stärkere CPE konnte auf die Beteiligung verschiedener Mechanismen oder Wege an der Auslösung eines CPE zurückgeführt werden konnte.

Aus diesen Studien können folgende Konsequenzen für die Entwicklung eines SeV-Vektor mit geringem zellschädigendem Potenzial gezogen werden: Der Austausch der ersten 48 Nt gegen den äquivalenten Anteil der Mutante Fctr48z führt zu einer deutlich reduzierten Schädigung vieler Zelllinien und kann sogar Zelltyp-spezifisch eine vollständige Aufhebung einer Zellschädigung bewirken. Dazu können weitere Austausche der F-Stamm-Sequenz des Vektors gegen die des Z-Stamms erwogen werden, da für den Z-Stamm eine geringere zytopathische Wirkung im Vergleich zum F-Stamm nachgewiesen werden konnte.

4. Diskussion

Das Sendai Virus (SeV) verfügt über ein einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Orientierung und gilt als ein nicht-humanpathogener Vertreter der Paramyxoviren. Die Möglichkeit SeV rekombinant herzustellen und dabei gezielte Mutationen in infektiösen Viruspartikeln zu manifestieren, macht das SeV zu einem vielseitigen molekularen Werkzeug. Darüber hinaus besitzt das SeV zahlreiche Eigenschaften, die es zu einem interessanten Kandidaten für einen Gentransfer-Vektor mit medizinisch-therapeutischem Anwendungsspektrum machen.

Zwar existieren noch keine als Gentransfer-Arzneimittel zugelassenen viralen Vektoren, doch wird dieser Technik ein großes Potenzial für eine wirkungsvolle Behandlung vieler unheilbarer und lebensbedrohlicher Krankheiten eingeräumt. In ersten klinischen Studien konnten vielversprechende Entwicklungen demonstriert werden, wobei auch Rückschläge in Kauf genommen werden mussten. Nachdem die Forschung intensiviert und verbreitert wurde, werden mittlerweile verschiedenste Viren als mögliche Gentransfer-Vektoren untersucht. Voraussetzung dafür sind bestimmte virale Eigenschaften bzw. die Möglichkeit Viren so manipulieren zu können, dass sie als Vektoren fungieren können. Zu Beginn muss dem Vektor ein therapeutisches Gen gezielt in das Genom stabil inseriert werden. Danach muss der Vektor in der Lage sein bestimmte, zu therapierende Zellen in einem Gewebe spezifisch zu erreichen und zu infizieren. Nach einer erfolgreichen Infektion sollte das therapeutische Gen seine Wirkung entfalten, wozu eine effiziente und ausreichend lange Expression erforderlich ist. An dieser Stelle treten in der gegenwärtigen Forschung die größten Probleme auf. Da Viren körperfremd sind werden sie häufig schnell vom Immunsystem erkannt und bekämpft. Darüber hinaus verfügen Viren vielfach selbst über ein pathogenes Potenzial, so dass sie die von ihnen infizierten Zellen stark schädigen. Beide Punkte wirken sich kontraproduktiv auf eine wirkungsvolle Anwendung von Viren als Gentransfer-Vektoren aus. Eine optimaler Kandidat konnte bisher noch nicht gefunden werden, da auch bei den stark beforschten Virusarten immer wieder negative Eigenschaften auftreten. Das Beispiel der Retroviren zeigt, dass die Insertion eines Transgens zwar eine lang andauernde Expression bewirken kann; allerdings kann durch Insertionsmutagenese eine Entartung der Zielzelle entstehen. Die ebenfalls als Vektoren eingesetzten Herpesviren zeigen vielfach eine starke zytotoxische Wirkung, so dass ein therapeutischer Effekt gar nicht zum tragen kommt. Eine ähnliche Problematik taucht bei Vektoren auf Basis von Adeno- oder Adeno-assoziierten-Viren auf, die oft durch eine im Empfängerorganismus bereits bestehende zelluläre und humorale Immunantwort eliminiert werden. Die Entwicklung von Gentransfer-Vektoren auf Basis von Sendai Viren stellt im Vergleich zu anderen Viren eine vorteilhafte Alternative dar. In verschiedenen Versuchen mit ersten SeV-Vektoren mit einer Fremdgeninsertion konnte in Zellen unterschiedlichster Gewebearten eine starke

und z.T. lang andauernde Expression *in vitro* und *in vivo* festgestellt werden (Bitzer et al., 2003, Ferrari et al., 2004, Shiotani et al., 2001, Yonemitsu et al., 2000). Eine schädliche Wechselwirkung des viralen Genoms oder viraler Transkriptionsprodukte mit dem zellulären Genom ist für das SeV auszuschließen, da sich SeV nur im Zytoplasma von Zellen befinden. Da homologe Rekombinationsereignisse aufgrund der Verpackung des RNA-Genoms mit N-Proteinen nicht stattfinden, ist die genomische Stabilität von SeV-Vektoren gewährleistet. Mit Hilfe von SeV-Vektoren könnten eine Vielzahl verschiedener Zelltypen erreicht werden, da das Oberflächen-Glykoprotein HN an Sialinsäure-haltige Ganglioside bindet, die ubiquitär auf Säugerzellen vorkommen. Darüber hinaus laufen SeV-Infektionen unabhängig vom Zellzyklus ab, womit auch sich nicht teilende Zellen ein Ziel darstellen.

Aufgrund dieser Eigenschaften des SeV, die es als einen sehr interessanten Kandidaten für einen Gentransfer-Vektor qualifizieren, scheint eine Weiterentwicklung bereits bestehender SeV-Vektoren sehr aussichtsreich.

Obwohl bereits mehrfach für SeV-Vektoren eine effiziente Fremdgenexpression *in vivo* nachgewiesen werden konnte, löst das SeV eine Immunreaktion mit einer starken CTL (zytotoxische T-Lymphozyten)-Antwort aus. Eine dadurch bedingte Eliminierung des Vektors könnte die Effizienz eines Vektors deutlich einschränken. Daher wäre es wünschenswert eine Immunreaktion zu verhindern oder deutlich zu reduzieren. Interessanterweise konnte für SeV-Infektionen ein kleines Epitop des N-Proteins als hauptverantwortliche virale Komponente für die Auslösung der T-Zellantwort entdeckt werden (Kast et al., 1991). Würde dieser Bereich aus einem Vektorkonstrukt entfernt werden ohne dabei dessen Wirkung nachhaltig einzuschränken, würde möglicherweise keine wirkungsvolle Immunreaktion während Anwendungen dieses Vektors auftreten.

Ein weiterer Entwicklungsschritt in Richtung Anwendungssicherheit eines SeV-Vektors könnte mit dem Effekt einer reduzierten Immunreaktion kombiniert werden. Um eine unkontrollierte und dadurch möglicherweise schädigende Immunreaktion in zu therapierenden Organismen zu verhindern, soll das verwendete Vektorkonstrukt eine Replikationsinkompetenz aufweisen. Das könnte durch die Eliminierung eines Gens, das für eine Komponente des Replikationskomplexes kodiert, erreicht werden. Würde dem Vektorgenom das N-Gen entfernt werden, sollte keine Replikation mehr stattfinden können. Gleichzeitig wäre damit die eben erwähnte antigene, immundominante Domäne des N-Proteins entfernt.

Als weiterer potenziell nachteiliger Effekt eines Vektors könnte sich eine durch SeV ausgelöste Apoptoseantwort (Bitzer et al., 1999, Tropea et al., 1995) in Zielzellen erweisen. Bei der Untersuchung auf welche Weise SeV Apoptose induzieren, konnte die Aktivierung von Caspasen (Bitzer et al., 2002) und eine Beteiligung des zellulären Proteins TIAR (Iseni et al., 2002) festgestellt werden. Interessanterweise konnte ein modulierender Einfluss von SeV *leader-*

Transkripten auf die pro-apoptotische Aktivität von TIAR gezeigt werden (Garcin et al., 1998, Iseni et al., 2002). Für das gezielte Design eines Vektors mit möglichst geringem zytopathischem Potenzial wäre ein genaueres Verständnis der Mechanismen, die zu einer Zellschädigung führen von Vorteil. Möglicherweise kann durch Modifikationen die Zytopathogenität des Vektors reduziert werden, wodurch eine lange und effiziente Fremdgenexpression unterstützt würde.

4.1. Induktion von Apoptose durch SeV-Mutante Fctr48z

In vitro-Infektionsstudien mit der SeV-Mutante Fctr48z zeigten einen deutlich reduzierten Zytopathischen Effekt (CPE) im Vergleich zu wt-Infektionen. Dabei variierte die CPE-Stärke abhängig vom Zelltyp. Von sieben untersuchten Zelllinien wiesen drei einen nur schwach reduzierten (BHK-21, A549, HeLa) und zwei einen mittelstark reduzierten CPE auf (293, Hep G2), während Vero- fast keine und LLC-MK₂-Zellen keine Anzeichen einer Schädigung zeigten.

Da die einzelnen Zellen ebenfalls eine unterschiedliche Vermehrung der Mutante zeigten, wurde die Frage untersucht ob möglicherweise eine Korrelation zwischen der Belastung der Zellen durch die virale Nachkommenproduktion und der Stärke des beobachteten CPE vorliegt. Da aber aus LLC-MK₂- und Vero-Zellen die meisten Viruspartikel (VP) freigesetzt wurden und diese beiden Zelllinien gleichzeitig keinen bzw. einen stark reduzierten CPE aufwiesen, konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden (Wiegand, 2003). Ebenso konnte für 293- und A549-Zellen, die im Vergleich wenig VP herstellten, nur ein schwach reduzierter CPE bei Infektionen mit der Mutante Fctr48z festgestellt werden. Der Grund für das Ausbleiben oder der Verminderung von einer Zellschädigung während Fctr48z-Infektionen muss also auf anderen Eigenschaften beruhen.

Eine weitere mögliche Quelle könnten defektive interferierende Partikel (DIP) sein. DIP sind nicht-infektiöse, meist verkürzte VP, die während SeV-Infektionen oft in großer Anzahl entstehen (Leppert et al., 1977, Tuffereau & Roux, 1988). Durch die Herstellung solcher DIP kann es zu einer Störung und Beeinträchtigung der wt-Replikation kommen, da die DIP aufgrund ihrer verkürzten Genome schneller und effektiver repliziert werden. Als Konsequenz stehen weniger Ressourcen für die Vermehrung von wt-Genomen zur Verfügung, wodurch diese nach und nach abgereichert werden. Eine genaue Betrachtung der hier vorgestellten Ergebnisse kann aber eine vergleichbare Situation für Fctr48z-Infektionen ausschließen. Zwar konnte eine geringere Produktion an Nachkommenpartikel für Fctr48z-Infektionen im Vergleich zum wt festgestellt werden, jedoch nur um das Zwei- bis Fünffache. Charakteristisch für Infektionen mit DIP ist allerdings eine Verringerung um das Hundertfache (Tuffereau & Roux, 1988). Darüber hinaus variierte die Reduktion des CPE bei Infektionen mit Fctr48z je nach Zelllinie. HeLa-, 293- und A549-Zellen entwickelten bei einer Infektion mit Fctr48z einen CPE, der nur wenig verringert gegenüber einer wt-Infektion war. Vero- und LLC-MK₂-Zellen entwickelten dagegen nur einen schwachen oder

sogar keinen dauerhaften CPE durch Fctr48z. Typische DIP-Infektionen vermitteln allerdings unabhängig vom Zelltyp eine deutlich verringerte Zellschädigung, die meist mit einer persistenten Infektion der Zellen einhergeht (Perrault, 1981, Roux & Waldvogel, 1981). Letzteres konnte einzig für LLC-MK₂-Zellen festgestellt werden, die über den Zeitraum von 13 Zellpassagen eine konstante Produktion von Fctr48z-Partikel aufwiesen.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass Fctr48z-Infektionen keine Situationen in den infizierten Zellen herbeiführen, die mit DIP-Infektionen vergleichbar sind.

Auf der weiteren Suche nach den Gründen für eine Zelltyp-spezifische Reduzierung des CPE während Fctr48z-Infektionen sollte nun der Fokus auf potenzielle SeV stammspezifische Unterschiede gerichtet werden.

Für eine SeV-Mutante mit der gleichen Mutation wie Fctr48z allerdings in Kombination mit dem restlichen Genom des SeV Z-Stamms, im Gegensatz zu Stamm F bei Fctr48z, wurde eine vollkommene Aufhebung des CPE während Infektionen verschiedener Zelllinien nachgewiesen (Garcin et al., 1998, Iseni et al., 2002). Ein vergleichbarer Effekt trat bei Infektionen mit Fctr48z nur in einer von sieben getesteten Zelllinien auf. Nachdem sich beide Mutanten ab Nukleotid 49 nur in stammspezifischen Mutationen ihrer Genome unterscheiden, wurde ein Vergleich des zytopathischen Potenzials der beiden SeV-Stämme Z und F durchgeführt.

Drei verschiedene Zelllinien (Vero, BHK, LLC-MK₂) wurden exemplarisch mit dem SeV Stamm F (SeV F) und SeV Stamm Z (SeV Z) parallel infiziert. Während die mit SeV F infizierten Zellen bereits nach 24 h einen deutlichen CPE aufwiesen, Zelltyp-unabhängig in der Ausprägung, entwickelten die mit SeV Z infizierten Zellen erst im Verlauf von drei Tagen einen vergleichbaren CPE. Eine quantitative Bestimmung der Vitalität von Vero-Zellen bestätigte diese Beobachtungen. SeV F hatte nach drei Tagen alle infizierten Zellen abgetötet. Zum gleichen Zeitpunkt lebten noch ca. 50 % der Zellen, die mit SeV Z infiziert worden waren. Die Zytopathogenität von SeV F konnte also als eindeutig höher nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis überraschte, denn bisher waren so deutliche Unterschiede bei SeV nur von Vergleichen zwischen pathogenen Feldisolaten (Stämme Hamamatsu und Ohita) und Laborstämmen (Stämme Z, F, Harris) bekannt (Fujii et al., 2001, Itoh et al., 1997, Sakaguchi et al., 1994), nicht aber von Laborstämmen untereinander, deren Nukleotidsequenz zu 99% übereinstimmt. Ein Sequenzvergleich der Stämme Z und F ergab 44 unterschiedliche Nukleotide, die einen Aminosäureaustausch zur Folge haben. Möglicherweise stellen diese Sequenzunterschiede die genetische Basis der verschiedenen Virulenz der beiden Stämme dar. Eine Analyse der unterschiedlichen As konnte innerhalb des HN-Proteins einen As-Austausch aufdecken, der als möglicher Virulenzfaktor einzustufen ist. Anstelle von Lysin an Position 461 bei Stamm Z befindet sich bei Stamm F Glutaminsäure (Glu). Glu an dieser Position

wurde als Stabilisationsfaktor der Neuraminidase beschrieben (Fujii et al., 2002, Takahashi et al., 1992) und könnte somit zu einer effektiveren Infektion von SeV des F-Stamms beitragen. Von den restlichen As-Austauschen sind noch keine Auswirkungen bekannt, doch wäre ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren zur Ausbildung der höheren Zytopathogenität von Stamm F denkbar.

Eine genauere Untersuchung auf welchen Wegen SeV F CPE auslöst führte zu einer interessanten Entdeckung.

Nachdem früher bereits die Induktion von Apoptose durch Caspasen für Infektionen von MCF-7- und CV-1-Zellen mit SeV F gezeigt wurde (Bitzer et al., 2002, Bitzer et al., 1999), sollten nun mit Hilfe des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk die Zellen vor dem programmierten Zelltod bewahrt werden. Mit SeV F infizierte HeLa- und LLC-MK₂-Zellen wurden durch z-VAD-fmk jedoch nicht vollständig vor einer Schädigung bewahrt. Diese Entdeckung war ein klares Indiz dafür, dass SeV F Apoptose nicht ausschließlich über einen Mechanismus induziert der Caspasen involviert.

Wurde Apoptose früher noch untrennbar mit den Apoptose-einleitenden und -ausführenden Caspase-Enzymen verstanden, findet man nun immer mehr Berichte, die eine Caspase-unabhängige Apoptose-Induktion nachweisen. Als ein möglicher Induktor wurde der *mitochondrial apoptosis-inducing factor* identifiziert (Jozsa et al., 2001, Susin et al., 1999), der eine Schädigung der Mitochondrienmembran durch eine Serin-Protease anregt (Egger et al., 2003) oder zu einer Aktivierung der Calcium-abhängigen Proteinase Calpain führt, die Zytoskelettproteine zerlegt oder das pro-apoptotische Protein Bax aktiviert (Vanags et al., 1996, Wolf et al., 1999). An welcher Stelle diese Komponenten während des Apoptose-Ablaufs eingreifen ist allerdings noch nicht genau geklärt. Ebenso konnte für Infektionen mit unterschiedlichsten Viren wie HIV-1, Coxsackie B3 und HSV-1, eine Apoptose-Induktion in Gegenwart von Caspase-Inhibitoren festgestellt werden (Carthy et al., 1998, Galvan et al., 1999, Roumier et al., 2002). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, dass z-VAD-fmk eine durch SeV F-induzierte Apoptose nicht vollständig blockieren kann, in Verbindung mit der Entdeckung, dass Caspase 9 zwar geschnitten (Bitzer et al., 2002) aber anschließend nicht aktiviert ist (Wolf et al., 1999), liefern Unterstützung für die Existenz einer Caspase-unabhängigen Apoptose-Induktion während SeV F-Infektionen.

Ein weiterer Faktor, der mit einer Apoptose-Antwort in Verbindung steht, konnte während Infektionen mit einer Mutante des SeV Z-Stamms gefunden werden. RNA-Transkripte, die während der Infektion von dem mutierten *leader*-Bereich hergestellt werden, binden an das zelluläre Protein TIAR, das an einer Apoptose-Induktion während SeV Z-Infektionen beteiligt sein soll (Garcin et al., 1998, Iseni et al., 2002). RNA-Bindung an TIAR scheint dessen Aktivität negativ zu beeinflussen, wodurch Infektionen mit dieser Mutante keinen CPE mehr verursachen.

Nachdem nun die in dieser Arbeit verwendete Mutante Fctr48z über die gleiche Mutation im *leader*-Bereich verfügt, von der RNA-Transkripte erstellt werden, die mit TIAR wechselwirken, sollte eine

vergleichbare CPE-Reduktion während Infektionen mit Fctr48z erwartet werden können. Allerdings konnte nur für eine von sieben getesteten Zelllinien eine vollständige Aufhebung eines CPE entdeckt werden (Wiegand, 2003). Alle anderen Zellen zeigten noch einen CPE, wenngleich dieser im Vergleich zu wt-Infektionen abgeschwächt war. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass eine CPE-Induktion während Fctr48z- Infektionen nicht ausschließlich über den durch TIAR-induzierten Mechanismus läuft.

Wie oben bereits erwähnt, konnte der durch SeV F-induzierte CPE nicht durch Caspase-Inhibitoren vollständig aufgehoben werden, was ebenfalls auf die Existenz von mehr als einem Apoptose-auslösenden Mechanismus deutet. Ähnliches wurde vor kurzem von Adenovirus-Infektionen berichtet (Zou et al., 2004) Eine Bestätigung für eine Apoptose-Induktion über mehr als einen Weg konnten Ergebnisse von HeLa-Infektionen mit Fctr48z liefern. Im Vergleich zu SeV F-Infektionen war der durch Fctr48z ausgelöste CPE reduziert. Wurde allerdings der Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk zugegeben konnte keine Beeinträchtigung der Zellvitalität mehr nachgewiesen werden. D.h. eine Apoptose-Induktion in HeLa-Zellen konnte durch die Kombination von Caspase-Inhibitor und Infektion mit Fctr48z, wodurch der mutierte *leader* transkribiert wird, verhindert werden. Dieses Ergebnis spricht für eine Apoptose-Induktion durch zwei additive Mechanismen (Abb. 44A).

Interessanterweise zeigten Fctr48z-Infektionen von LLC-MK₂-Zellen eine Art Interferenz zwischen diesen beiden Mechanismen. Während der Einsatz des Caspase-Inhibitors in SeV F-Infektionen eine Apoptose-Antwort von LLC-MK₂-Zellen nur verringern konnte, fand während Fctr48z-Infektionen auch ohne Zugabe von Caspase-Inhibitor keine Apoptose-Induktion mehr statt (Abb. 44B). Der Einsatz von Fctr48z und der damit verbundenen Herstellung von *leader*-Transkripten reichte aus um LLC-MK₂-Zellen vor dem Zelltod zu bewahren. Dem Anschein nach wurden in diesem Fall beiden Apoptose-induzierenden Mechanismen gleichzeitig inhibiert.

Aus diesen Daten lassen sich zwei mögliche Erklärungen ableiten. Während Infektionen von HeLa-Zellen kann Apoptose über zwei Mechanismen ausgelöst werden, wovon der eine durch z-VAD-fmk und der andere durch RNA-Transkripte des mutierten *leaders* von Fctr48z inhibiert werden können. Im Gegensatz dazu scheinen diese RNA-Transkripte in LLC-MK₂-Zellen beiden Apoptose-auslösenden Mechanismen gleichzeitig blockieren zu können, während z-VAD-fmk nur zu einer teilweisen Aufhebung von Apoptose beiträgt (Abb. 44C). In LLC-MK₂-Zellen scheint der Mechanismus, in das TIAR-Protein involviert ist, eine dominantere Rolle zu spielen als der mit Beteiligung von Caspasen.

Unterstützung für eine vollständige Inhibierung von Apoptose über einen Caspase-unabhängigen Mechanismus liefern Versuche mit Mutanten des SeV Z-Stamms. Für SeV Z konnte eine Apoptose-Induktion über den mit TIAR in Verbindung stehenden Mechanismus gezeigt werden (Iseni et al., 2002). Die einzigen bisher für TIAR beschriebenen Eigenschaften sind sein Vermögen an RNA zu

binden, die Translation von mRNA zu regulieren und eine Beteiligung an alternativen Spleißvorgängen (Forch & Valcarcel, 2001, Gueydan et al., 1999, Piecyk et al., 2000). Eine direkte intrazelluläre Interaktion von TIAR mit viralen RNA-Transkripten wurde während SeV- und West Nile Virus-Infektionen (Iseni et al., 2002, Li et al., 2002) dokumentiert.

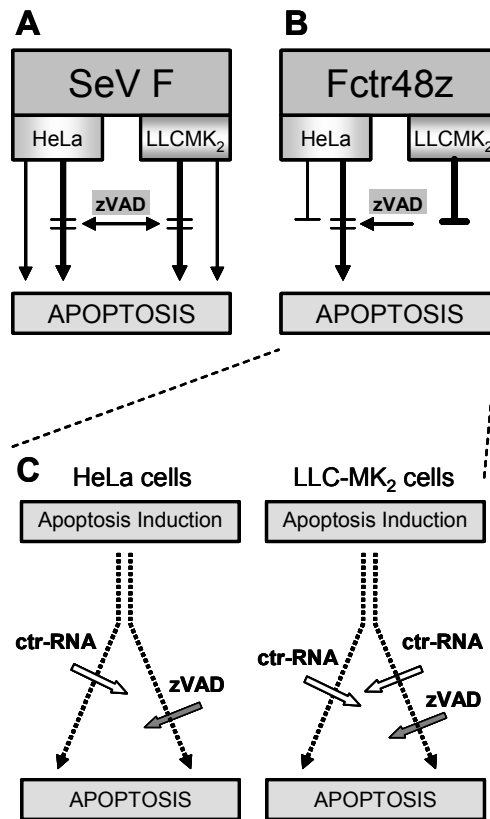


Abb. 44: Modell der Apoptose-Induktion in HeLa- und LLC-MK₂-Zellen während Infektionen mit SeV F und Fctr48z. Verschiedene Wege, die zur Apoptoseauslösung führen können sind durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet, deren Gewichtung durch die Linienstärke angedeutet sein soll. Das Wirkungsspektrum von Apoptose-Inhibitoren (zVAD & ctr RNA) ist durch waagrecht Pfeile markiert. (A) Während SeV F-Infektionen kann in HeLa- und LLC-MK₂-Zellen über zwei Wege Apoptose ausgelöst werden, wovon einer reversibel geblockt werden kann. (B) Während Fctr48z- Infektionen kann Apoptose in HeLa-Zellen durch zVAD verhindert werden, in LLC-MK₂-Zellen findet keine Apoptose statt. (C) Detaillierter Erklärungsvorschlag zur Apoptoseinhibition durch ctr-RNA und zVAD während Fctr48z-Infektionen.

Aus der Kombination früherer Experimente mit SeV Z und SeV F (Bitzer et al., 2002, Bitzer et al., 1999, Garcin et al., 1998, Iseni et al., 2002, Wiegand, 2003) und den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen können folgende Schlüsse gezogen werden:

- bislang unbekannte Virusstamm-spezifische Eigenschaften bestimmen welcher Mechanismus an der Auslösung von Apoptose durch SeV beteiligt ist und in welchem Umfang

- während SeV F-Infektionen findet u.a. eine Caspase-unabhängige Apoptose-Induktion statt
- während SeV F-Infektionen existieren verschiedene Apoptose-auslösende Mechanismen gleichzeitig

Wie die mit Mutante Fctr48z gezeigt hat, kann durch den Austausch der ersten 48 Nt des *leaders* von SeV F gegen den komplementären Bereich *trailers* des SeV Z-Stamms eine Zelltyp-abhängig verschieden starke Reduktion des CPE während SeV-Infektionen erreicht werden. Wie im Fall der LLC-MK₂-Zellen kann es dabei zu einer vollständigen Aufhebung der Zellschädigung kommen.

4.2. Bedingungen für eine Vermehrung von SeV Δ N

Als replikationsdefizienter Vektor auf Basis des SeV wurde in der vorliegenden Arbeit ein Konstrukt mit deletiertem N-Gen geschaffen. Das N-Protein war ausgewählt worden, da es während des viralen Replikationszyklus' verschiedene Funktionen erfüllt: Als Proteinkomponente des Nukleokapsids (NC) verpackt das N-Protein die genomische RNA, wobei genau sechs Nukleotidbausteine von einem N-Protein abgedeckt werden. Insgesamt werden daher für die Verpackung eines vollständigen Genoms 2 564 N-Proteine benötigt. Während der Replikation werden sowohl der antigenomische als auch der genomische RNA-Strang synchron zu ihrer Synthese mit N-Proteinen besetzt, wobei das N-Protein als N⁰-P-Komplex vorliegen muss, um vom Polymerasekomplex als Substrat verwendet werden zu können. Während des viralen Replikationszyklus' wird daher eine sehr große Menge an N-Proteinen benötigt, was auch durch die erste Position des N-Gens im viralen Genom und die entsprechend hohe Expression ausgedrückt wird.

Soll nun ein SeV ohne eigenes N-Gen (SeV Δ N) vermehrt werden, muss ausreichend N-Protein *in trans* bereitgestellt werden. Alle weiteren viralen Komponenten, die aktiv an der Replikation beteiligt sind, sind im SeV Δ N kodiert. Für deren Expression sind keine N-Proteine erforderlich. Ein üblicher Weg die fehlende Komponente – hier das N-Protein – zur Verfügung zu stellen, stellt die transiente oder stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen mit entsprechender Plasmid-DNA dar. In früheren Versuchen replikationsinkompetente SeV über zelluläre Transkomplementation herzustellen oder zu vermehren, hatte sich der erste Ansatz als funktionell erwiesen. Eine Helferzelllinie, die stabil die viralen M-, F- und HN-Gene exprimiert, konnte NC mit Deletionen der entsprechenden Gene erfolgreich zu vollständigen VP verpacken (Fischer, 1998). Über die Verwendung einer anderen Helferzelle, die die drei Proteinkomponenten des Replikationskomplexes (N-, P-, und L-Proteine) stabil synthetisiert, konnte eine Vermehrung von SeV-Mutanten mit vollständiger (Δ P) oder partieller (P Δ 2-77) P-Gendeletion erreicht werden (Schlecht, 2004).

Das in der vorliegenden Arbeit hergestellte SeV Δ N konnte mit Hilfe von Helferzellen aber nicht effizient vermehrt werden. Zunächst wurde versucht eine SeV Δ N-Vermehrung mit bereits

existierenden Helferzellen zu erreichen, die verschiedene Kombinationen von SeV-Transgenen stabil exprimierten. LTK⁻-394-Zellen synthetisierten ausschließlich das SeV N-Protein, LTK⁻-460-Zellen das N- und das P-Protein und H29-Zellen das N-, das P- und das L-Protein (Willenbrink, 1991, Willenbrink & Neubert, 1994). Keine dieser Zelllinien konnte jedoch initial hergestellte SeV Δ N-Partikel effizient amplifizieren. Zwar konnten in H29-Zellen während einer SeV Δ N-Infektion eine virale eGFP-Transgenexpression und eine sehr langsame Ausbreitung dieser grünen Fluoreszenz auf Nachbarzellen beobachtet werden, doch wurden keine Nachkommenpartikel in den Kulturüberstand freigesetzt. Die in H29-Zellen synthetisierten Proteinmengen N:P:L betragen 5:10: < 5% im Vergleich zu SeV-wt-infizierten CV-1-Zellen (Willenbrink & Neubert, 1994). Anscheinend reichte diese Menge an SeV N-Protein nicht aus um eine effiziente SeV Δ N- Vermehrung durch Transkomplementation zu erreichen. Bisher konnten H29-Zellen u.a. aber für eine effiziente Vermehrung der replikationsdefizienten Mutante SeV Δ P (ohne P-Gen) verwendet werden, wobei die Menge an amplifizierten SeV Δ P-Partikeln 40% der SeV-wt-Menge entsprach (Schlecht, 2004). Mit einer SeV P-Proteinmenge von 10% in H29-Zellen, verglichen mit SeV-wt-Infektionen, konnten so ca. 20×10^6 infektiöse SeV Δ P-Nachkommenviren produziert werden. Da die SeV N-Transgenexpression in H29-Zellen aber nur 5% verglichen zur SeV-wt-Infektion betrug und SeV Δ N mit Hilfe der H29-Zellen nicht vermehrt werden konnten, wurde diese Menge als nicht ausreichend für eine SeV Δ N-Vermehrung angesehen. Für die Bereitstellung einer größeren Menge an SeV N-Protein für eine SeV Δ N-Transkomplementierung sollten neue Helferzellen entwickelt werden. Um eine hohe SeV N-Transgenexpression in neuen Helferzellen zu erzielen wurden spezielle Regulatorelemente in Expressionsplasmiden kombiniert, die für die stabile Transfektion eingesetzt wurden. Trotz Selektion und anschließender Überprüfung von mehr als 500 stabil transfizierten Zellklonen konnten jedoch keine Zellen identifiziert werden, die eine effiziente SeV Δ N-Vermehrung erlauben. Vergleichende Western Blot-Analysen ergaben, dass die maximale Menge an synthetisiertem SeV N-Protein auch in diesen Helferzellen (VPN44) nur unwesentlich größer war als in H29-Helferzellen. Diese leicht gestiegene Menge an N-Protein äußerte sich in einer bereits 1 d p.i. sichtbaren eGFP-Transgenexpression und einer stärkeren Virusausbreitung über die Kultur. Darüber hinaus konnten die auf Vero-Zellen basierenden neuen Helferzellen (VPN-Zellen) auch deutlich länger während einer SeV- Δ N-Infektion kultiviert werden als H29-Zellen, die wenig robust waren und bereits ca. 7 d p.i. abstarben. Dennoch trat in den VPN-Zellen nur eine langsame Virusvermehrung auf, die maximal die Infektion von einigen benachbarten Zellen ermöglichte, aber so gering war, dass die Anzahl an freigesetzten Nachkommenpartikeln niedriger lag als die der initial aus dem *virus rescue* gewonnenen VP. Bedenkt man die Anzahl der während der vorliegenden Arbeit und in früheren Arbeiten getesteten Helferzellklone, die mit SeV N-Genkopien stabil transfiziert worden waren – ca. 500 VPN-Zellklone, ca. 500 LTK⁻-, HeLa- und

CV1-Zellklone (Willenbrink, 1991) und ca. 200 293-Zellklone (Willenbrink & Neubert, 1994) – so entsteht der Eindruck, dass durch stabil transfizierte Helferzellen keine größere Menge an SeV N-Protein synthetisiert werden kann, als die erreichten 5-10% verglichen mit SeV-wt-Infektionen. Möglicherweise ist die maximale Menge an N-Protein durch seine zytotoxische Wirkung limitiert. Wird das N-Protein ohne weitere SeV-Komponenten in Zellen synthetisiert wechselwirkt es unspezifisch mit vorhandenen, zellulären RNA-Molekülen (Buchholz et al., 1993), die dadurch ihre Funktion nicht weiter ausüben können. Werden auf diese Weise durch eine große Menge an N-Proteinen viele RNAs gebunden und damit für andere Funktionen inaktiv, könnte die Zelle zugrunde gehen. Helferzellklone, die so viel N-Protein synthetisieren, dass die Zelle überlastet ist, könnten nicht selektioniert und isoliert werden, da sie vorher absterben würden. Wird allerdings eine so große Menge an SeV N-Protein für eine Vermehrung von SeV Δ N benötigt, kann eine effiziente Transkomplementierung durch Helferzellen nicht erreicht werden.

Während SeV-Infektionen wird eine unspezifische Bindung von SeV N-Proteinen mit zellulärer RNA durch die Anwesenheit von SeV P-Protein verhindert, das mit dem N-Protein im N⁰-P-Komplex interagiert und dieses so löslich hält (Homann et al., 1991). Aus diesem Grund wurden die Helferzellen, zusätzlich zu N-Genkopien (pRE-N), mit P-Genkopien (pRE-P) transfiziert. Dabei wurden sogar zwei Strategien verfolgt, damit eine möglichst große Menge an N-Protein von den Zellen synthetisiert werden konnte. Einerseits wurde mit beiden Expressionsplasmiden, die die N- und P-Transgene trugen (pRE-N und pRE-P), gleichzeitig und in gleicher Menge transfiziert, um eine gleichgroße Anzahl beider Transgene im zellulären Genom verankern zu können. Andererseits wurden die Zellen zuerst nur mit pRE-P transfiziert und erst aus der Selektionsphase hervorgegangene Zellklone mit pRE-N nochmals transfiziert. Auf diese Weise sollten zunächst Zellen gewonnen werden, die bereits das SeV P-Protein stabil exprimierten und dadurch die Basis für eine starke N-Genexpression bildeten. Eine starke N-Genexpression würde sich nur in solchen Zellen erreichen lassen, die viel P-Protein synthetisierten, um mit N-Proteinen zum N⁰-P-Komplex zu interagieren und die Zelle dadurch möglichst wenig zu belasten.

Wie sich nach dem Auswahlprozess der stabil transfizierten Zellen herausstellte verkörperten die drei effektivsten Helferzellklone interessanterweise drei verschiedene Szenarien. VPN11 bildete keine im Western Blot nachweisbare Menge an P-Protein (Abb. 17), konnte aber im Vergleich zu anderen Helferzellen Transkription und Replikation von SeV Δ N am effektivsten unterstützen. VPN44 bildete die größte Menge an N-Protein und nur eine kleine an P-Protein. Die Vermehrung von SeV Δ N förderte VPN44 etwas weniger als VPN11. VPN285 produzierte im Gegensatz zu VPN11 und VPN44 eine große Menge P-Protein, die nur etwas geringer war als die N-Proteinmenge; diese war fast so hoch war wie bei VPN44. Dadurch hätte man erwarten können, dass dieser Zellklon besonders viel N-Protein durch Interaktion mit dem P-Protein für eine SeV Δ N-

Replikation zur Verfügung stellen könnte. Die Vermehrung von SeV ΔN funktionierte in VPN285-Zellen jedoch weniger gut als in VPN44 und VPN11. In *in vitro*-Studien zur Replikation von SeV DIPs (*Defective Interfering Particles*) hatte sich herausgestellt, dass die Mengenverhältnisse der Proteinkomponenten des Replikationskomplexes zueinander besonders wichtig für eine hohe Ausbeute an Virusnachkommen sind (Horikami et al., 1992). Nach einer Monoklonalisierung des nach der ersten Selektionsphase noch inhomogenen VPN285-Zellklons, entstanden VPN285-Varianten, die unterschiedlich große Mengen an P-Protein synthetisierten (Abb. 18). Die N-Menge blieb dagegen konstant. Auf diese Weise waren praktisch alle möglichen Mengenverhältnisse von N- zu P-Protein gegeben. Überraschenderweise vermochte jedoch nach wie vor keiner der VPN285-Subklone SeV ΔN so effizient zu vermehren wie VPN11.

Die Tatsache, dass die SeV-Transkription und -Replikation von VPN11 ohne nachweisbare Synthese von SeV P-Protein am effizientesten unterstützt wurde, könnte damit erklärt werden, dass für die Interaktion mit den von der Helfierzelle produzierten N-Proteinen zum N⁰-P-Komplex ausreichend P-Protein durch das viruskodierte P-Gen während SeV ΔN -Infektionen bereitgestellt wird. Wenn keine Infektion der VPN11-Zellen vorliegt wird zwar nur das N-Protein synthetisiert, doch gehen die Zellen an dieser, relativ geringen, Menge von N-Protein offensichtlich nicht zugrunde.

Liegen SeV N-Proteine in Zellen zusammen mit P-Proteinen in N⁰-P-Komplexen vor, gilt die Zelltoxizität von N als gebannt. Daher dürfte einer SeV N-Genexpression, die über die 5-10% der während SeV-wt-Infektionen gebildeten Menge hinausgeht nichts im Wege stehen solange gleichzeitig genügend SeV P-Protein für N⁰-P-Komplexe vorhanden ist. Nachdem aber aus den beschriebenen Analysen der Helfierzellklone kein Klon resultierte, der eine größere N-Proteinmenge herstellte, wäre es vorstellbar, dass die Zellen mit der festgestellten Menge an stabil exprimierten SeV N- und P-Transgenen an eine Kapazitätsgrenze stoßen. Daher könnte es generell unmöglich sein, über den Weg der konstitutiven Transgenexpression eine ausreichende Menge an SeV N-Protein für eine effiziente Vermehrung von SeV ΔN bereitzustellen. Aus diesem Grund mussten andere Wege zur Synthese von ausreichend N-Protein für eine SeV ΔN -Vermehrung gefunden werden.

Eine Möglichkeit, eine größere Menge an SeV N-Protein für die Vermehrung von SeV ΔN bereitzustellen, würden Helferviren bieten. Durch Koinfektion von Vero-Zellen mit SeV ΔN und SeV-wt konnte bereits gezeigt werden, dass eine Vermehrung von SeV ΔN prinzipiell möglich ist. Die während einer SeV-wt-Infektion synthetisierten N-Proteine reichten dabei aus, um eine effiziente Vermehrung des SeV-wt und von SeV ΔN zu unterstützen. Für die Vermehrung eines SeV-Vektors auf Basis von SeV ΔN eignet sich dieses System natürlich nicht, da alle

Viruspräparationen neben SeV Δ N auch SeV-wt in großer Anzahl enthalten würden. Eine alternative Quelle für SeV N-Proteine könnten auch rekombinante Vaccinia-Viren (rVV) mit inseriertem SeV N-Transgen (rVV-N) darstellen, die in dieser Arbeitsgruppe bereits existierten (Graef, 1995). Mit Hilfe von rVV kann eine starke Transgenexpression in infizierten Zellen erzielt werden. Für Koinfektionen mit SeV Δ N wäre bei diesem System vorteilhaft, dass, ähnlich zur Koinfektion mit SeV-wt, durch Einsatz von ausreichend vielen Viruspartikeln (mindestens *moi* 3) alle vorhandenen Zellen erreicht werden könnten und sich dadurch SeV Δ N-Nachkommen gut ausbreiten könnten. Nachteilig würde sich allerdings auswirken, dass Vaccinia-Viren einen starken zytopathischen Effekt (CPE) auslösen, wodurch infizierte Zellen früh absterben (ca. 3-5 d p.i.). Darüber hinaus müsste nach Koinfektion von VV-N mit SeV Δ N versucht werden, Kulturüberstände mit den SeV Δ N-Nachkommenpartikeln frei von kontaminierenden VV-N zu erhalten. Dieses Unterfangen dürfte nicht besonders leicht sein, da sich eine Vermehrung von Vaccinia-Viren durch den Zusatz des Thymidinanalogs Cytosin-Arabinosid zum Kulturmedium zwar verringern lässt, jedoch eine Abreicherung aus den Kulturüberständen nur langsam abläuft und eine vollständige Eliminierung des kontaminierenden Virus nicht zu erreichen ist. Die Herstellung von SeV-Vektoren mit medizinischem Anwendungspotenzial über Koinfektion mit VV würde daher wohl kaum den hohen Sicherheitsanforderungen genügen.

Eine weitere Option, viel SeV N-Protein für eine SeV Δ N-Vermehrung anzubieten, könnten Koinfektionen von SeV Δ N und defektiven interferierenden SeV-Partikeln (DIPs), die nur das SeV N-Gen tragen (N-DIPs), darstellen. Würden N-DIPs in Zellen, die gleichzeitig mit SeV Δ N infiziert sind, vorliegen, könnte eine starke N-Proteinsynthese stattfinden. Nachteilig wäre dabei, dass, parallel zu SeV Δ N, auch die DIPs vermehrt werden würden und, da sie aufgrund ihrer kleineren Genome einen Replikationsvorteil haben, in größerer Menge als SeV Δ N produziert würden. Daher käme es über die Zeit zu einer DIP-Anreicherung. Darüber hinaus müssten für eine reine SeV Δ N-Präparation die im ÜS vorhandenen SeV Δ N-Partikeln von den DIPs getrennt werden. Aufgrund des Größenunterschieds zwischen DIPs und SeV Δ N könnte Ultrazentrifugation eine Methode dafür sein, jedoch wäre dabei wohl mit Verschleppungen von DIPs in der SeV Δ N-Fraktion zu rechnen. Diese beiden Beispiele (VV-N und N-DIPs) für den Einsatz von Helferviren zur Vermehrung von SeV Δ N machen deutlich, dass über diese Wege zwar mit einer großen Menge an SeV N-Protein zu rechnen wäre, jedoch die erhaltenen SeV-Vektorpräparationen aufgrund der schwer zu beseitigenden Helferviren kaum für eine medizinische Anwendung in Frage kämen.

Aus diesem Grund wurde versucht ein System, das auf der transienten Transfektion von Zellen beruht, für die Vermehrung von SeV Δ N zu etablieren. Durch den Einsatz der in dieser Arbeit optimierten Expressionsplasmide pRE-N und pRE-P konnte in BSR-T7-Zellen eine SeV N- und P-Proteinmenge erzeugt werden, die 50-100% der während SeV-wt-Infektionen produzierten Menge

entsprach. Dadurch wurde ausreichend N-Protein für eine effiziente Transkomplementierung von SeV ΔN zur Verfügung gestellt, so dass über diesen Weg ca. $0,5 \times 10^6$ *ciu/ml* SeV ΔN hergestellt werden konnten. Dabei stellte sich heraus, dass die Doppeltransfektion mit pRE-N und pRE-P eine deutlich gesteigerte Ausbeute an SeV ΔN -Nachkommenpartikeln bewirkte im Gegensatz zu nur mit pRE-N transfizierten Zellen. Entscheidenden Einfluss besaß das Mengenverhältnis, der beiden gemeinsam transfizierten Plasmide. Aus parallel durchgeführten Transfektionen zur Vermehrung von SeV ΔN wurde eine optimierte Menge an pRE-N-Plasmid-DNA mit halb soviel, gleichviel, anderthalbmal und doppelt soviel pRE-P-Plasmid-DNA transfiziert. Bei dem Verhältnis von gleichviel transfizierter Plasmid-DNA von pRE-N und pRE-P konnte eindeutig die schnellste und stärkste Virusausbreitung in der Kultur festgestellt werden. Anscheinend spielen die zuvor angesprochenen Mengenverhältnisse der Komponenten des SeV-Replikationskomplexes (N-, P-, und L-Proteine), wie in *in vitro*-Replikationsstudien analysiert (Horikami et al., 1992), tatsächlich auch in Zellkultur eine wichtige Rolle für eine effiziente SeV-Replikation. Dass dieser Effekt bei den zuvor beschriebenen Helferzellen nicht zum Tragen gekommen war könnte mit den deutlich geringeren Mengen an vorhandenen SeV-Proteinen zusammenhängen. D.h. je mehr SeV N-Protein in Zellen vorliegt, desto entscheidender ist eine angepasste SeV P-Proteinmenge, um die N-Proteine für eine Replikation verwendbar zu halten.

Als Gründe dafür, warum Helferzellen keine größeren Menge an SeV N-Protein stabil synthetisieren können, wurden im Falle einer ausschließlichen N-Proteinsynthese (wie bei VPN11) eine hohe Zytotoxizität des SeV N-Proteins angenommen, und bei einer Expression von N- und P-Proteinen eine Kapazitätsgrenze für die stabile Expression von Zell-fremden Proteinen. Die Tatsache, dass in transfizierten BSR-T7-Zellen eine deutlich größere Menge an N- und P-Protein herstellbar ist ohne dass die Zellen sofort zugrunde gehen, könnte auf mehreren Gründen beruhen. Zum einen haben die Zellen während einer transienten Transfektion, bei der die in die Zellen geschleusten Transgenkopien nicht ins zelluläre Genom integrieren, keine Möglichkeit kurzfristig deren Transkription zu verhindern. Da SeV N- und P-Proteine bei diesem Ansatz gleichzeitig hergestellt werden, sollte die zytotoxische Wirkung des N-Proteins nicht so stark zu Tage treten.

Die durch transiente Transfektion von BSR-T7-Zellen herstellbare Menge von $0,5 \times 10^6$ *ciu/ml* SeV ΔN PE F_{mut} reicht aus, um weitere vorklinische Studien durchführen zu können. Die SeV ΔN -Partikel konnten daher für die Analyse der viralen Transgenexpression von SeV ΔN in potenziellen Zielzellen eingesetzt werden.

4.3. Essentielle Komponenten der SeV-Transkription

Eine erfolgreiche Infektion einer Zelle durch das SeV beginnt mit der Anheftung des Viruspartikels über seine Hüllproteine an zelluläre Rezeptoren und die darauf folgende Fusion der viralen

Membran mit der zellulären. Das auf diese Weise ins Zytoplasma freigesetzte Nukleokapsid (NC) ist mit viralen P- und L-Proteinen besetzt – ca. 50 x L und 300 x P (Lamb et al., 1976), die miteinander komplexiert die virale Polymerase (RdRp) bilden. Diese „Grundausstattung“ genügt für die zu Beginn einer Infektion stattfindende Transkription, die hier als Primärtranskription bezeichnet wird. Die Primärtranskription dient dem Zweck die virale Nachkommenproduktion in Gang zu setzen. Die viralen mRNAs werden in Proteine übersetzt und diese unterstützen wiederum die Transkription und schließlich die Replikation (s. Einleitung).

Nach dem gegenwärtigem Modell läuft die virale Transkription so ab, dass die RdRp am 5'-Ende des mit N-Proteinen verpackten RNA-Genoms an Promotorsequenzen bindet, der Reihe nach den *leader* und darauf folgenden Gene abliest und in mRNAs übersetzt. Aus *in vitro*-Studien mit SeV-RNPs, einzig bestehend aus Genom-RNA und verpackenden N-Proteinen, ging hervor, dass nur die aus P- und L-Proteinen bestehende RdRp zu diesen RNP gegeben werden muss, damit eine Transkription feststellbar ist (Horikami et al., 1992).

Allerdings führten in der vorliegenden Arbeit mit der Mutante SeV ΔN PE F_{mut} (SeV ΔN) durchgeführte Zellinfektionen zu Ergebnissen, die diesem Transkriptionsmodell widersprechen. Im Gegensatz zu *in vitro*-Versuchen, die ein artifizielles System darstellen, wurde hier bei der Infektion von Zellen durch Virusmutanten die natürliche Situation einer Infektion untersucht.

Infektionen von Vero-Zellen mit SeV ΔN führten zu keiner über FACS-Analyse detektierbaren eGFP-Transgenexpression oder über Immunfluoreszenz feststellbaren Expression viraler Gene. Die Transkription durch die RdRp-Komplexe, die bei der Infektion in Assoziation mit dem Nukleokapsid in die Zellen gelangt waren, und während der Primärtranskription neu hergestellt wurden, reichte anscheinend nicht für einen Nachweis der Genexpression auf Protein-Ebene aus. Bei der Untersuchung der Genexpression wurde mit dem Nachweis viruskodierter Proteine ein Verfahren gewählt, das nur dann positive Ergebnisse liefert, wenn größere Mengen viraler Proteine, die eine Virusvermehrung ermöglichen, synthetisiert werden. Es wurde absichtlich kein hochsensitives Verfahren zum Nachweis viraler Transkriptionsprodukte eingesetzt, da sonst falsch-positive Ergebnisse, die jedoch keine Virusvermehrung widerspiegeln müssen, entstehen könnten.

Es sollte nun der Transkriptionskomplex näher betrachtet werden, um der Frage nachzugehen, ob eventuell zusätzliche virale Komponenten zu der RdRp und dem RNP für eine effiziente Transkription von Sendai Viren notwendig sind. Während einer SeV ΔN -Infektion werden das Nukleokapsid mit assoziierten P- und L-Proteinen in die Zelle eingeschleust. P- und L-Proteine können anschließend auch neu synthetisiert werden, da sie auf dem ΔN -Genom kodiert sind. Das *template* sollte aufgrund seiner Halbwertszeit von ca. 10 Tagen (Schlecht, 2004) ausreichend lange für eine effiziente Transkription in der Zelle zur Verfügung stehen. Einzig das N-Protein kann nicht

nachgeliefert werden, welches jedoch nach gegenwärtigem Kenntnisstand nur für die Genom-Replikation benötigt wird (Lamb & Kolakofsky, 2001).

Nachdem während SeV Δ N-Infektionen keine Synthese viraler Proteine gemessen werden konnte und die einzige fehlende virale Komponente das SeV N-Protein war, sollte überprüft werden ob zusätzlich bereitgestelltes N-Protein die Transkriptionsleistung wieder herbeiführen kann. Dazu wurden SeV N-Protein-synthetisierende Helferzellen (VPN11) oder BSR-T7-Zellen, die mit SeV N-Gen-tragenden Expressionsplasmiden (pRE-N) transient transfiziert wurden, mit SeV Δ N infiziert. In beiden Fällen konnte nun eine starke eGFP-Transgenexpression beobachtet werden.

Durch diese Transkomplementierung von SeV Δ N mit SeV N-Protein war allerdings auch eine Genomreplikation möglich geworden, wodurch sich die Anzahl an *templates* für eine eGFP-Expression erhöht haben konnte. Für eine andere, ebenfalls replikationsdefiziente SeV-Mutante, deren P-Gen deletiert worden war (SeV eGFP Δ P), konnte gezeigt werden, dass durch eine deutliche Erhöhung der Anzahl an *templates* in der infizierten Zelle, eine virale eGFP-Transgenexpression messbar wurde. Wird eine Zellinfektion mit SeV Δ P mit *moi* 1 durchgeführt, gelangt ca. ein Nukleokapsid in eine infizierte Zelle. Unter diesen Bedingungen war keine eGFP-Expression feststellbar. Wurde die *moi* jedoch um das Fünffache erhöht konnte in 0,01% der infizierten Zellen eine eGFP-Expression detektiert werden. Dieser Effekt wurde darauf zurückgeführt, dass sich in diesen wenigen Zellen, aufgrund der statistischen Verteilung, jeweils ca. 15 Nukleokapside befanden. Diese erhöhte Anzahl an *templates* in Verbindung mit den vorhandenen Polymerasekomplexen reichte aus, um die für eine Lichtreaktion erforderliche Menge von rund 10^6 eGFP-Molekülen pro Zelle herzustellen (Schlecht, 2004).

Um eindeutig unterscheiden zu können, welcher Anteil der gemessenen eGFP-Expression bei der SeV Δ N-Infektion von Helferzellen möglicherweise auf einer erhöhten *template*-Anzahl beruht, wurde eine weitere Virusmutante eingesetzt. SeV Δ N P Δ 2-77E F_{mut} verfügt zusätzlich zur Deletion des N-Gens und dazu über eine partielle Deletion des P-Gens: Dadurch ist ein P-Protein kodiert, das keine Genom-Replikation unterstützen kann. Auch wenn während Infektionen mit SeV Δ N P Δ 2-77E F_{mut} N-Protein *in trans* zur Verfügung gestellt wird, ist im Gegensatz zu SeV Δ N-Infektionen keine Genom-Replikation mehr möglich. Interessanterweise konnte eine eGFP-Transgenexpression während SeV Δ N P Δ 2-77E F_{mut}-Infektionen nur dann beobachtet werden, wenn zusätzliches N-Protein vorhanden war. Dieser Versuch zeigt eindeutig, dass zusätzliches, neu synthetisiertes N-Protein während SeV-Infektionen benötigt wird, um eine effiziente Transkription zu bewerkstelligen. Erste Hinweise auf eine Unterstützung der SeV-Transkription durch das N-Protein wurden bereits während früherer Versuche zur *in vitro*-SeV-Replikation entdeckt; allerdings wurden diese Beobachtungen aufgrund sich widersprechender Ergebnisse damals nicht weiter verfolgt (D. Kolakofsky – persönliche Kommunikation).

Die Diskrepanz zwischen den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen und dem früher beschriebenen, auf *in vitro*-Daten beruhenden, Transkriptionsmodell, lässt sich möglicherweise durch eine genaue Betrachtung der Versuchsbedingungen aufklären. Für die *in vitro*-Versuche werden zunächst RNPs und P-L-Komplexe (RdRp) aus Zellextrakten isoliert, konzentriert und aufgereinigt. In den *in vitro*-Transkriptionsversuchen wurden dann sehr große Mengen an *template* (10^{11} NC) und Proteinextrakten eingesetzt (Chandrika et al., 1995, Horikami et al., 1992). Anschließend wurden die entstandenen mRNA-Produkte gereinigt, konzentriert und über Northern Blot detektiert. Die, unter Einsatz sehr großer Mengen Ausgangsmaterial (*template* und Proteinextrakte) und sehr sensitiver Nachweisverfahren, detektierten Transkriptionsprodukte, beruhen möglicherweise nur auf einer geringen Transkriptionsleistung der RdRp. Diese könnte einer Primärtranskription entsprechen, die zu Beginn einer Infektion stattfindet, wenn nur das virale NC in der Zelle vorhanden ist und noch keine viralen Proteine synthetisiert worden sind. Diese ersten Transkriptionsschritte müssten auch in SeV Δ N-infizierten Zellen stattfinden. Doch ist ihre Leistung so gering, dass daraus entstandene virale Proteine nicht detektiert werden konnten. Eine effiziente virale Genexpression, mit messbaren Produkten, wird anscheinend erst möglich wenn neu synthetisiertes SeV N-Protein zur Verfügung steht. Der Zweck der Primärtranskription wäre daher, erste virale Proteine, die eine nachfolgende effiziente Transkription in Gang setzen, zu generieren.

Für das P-Protein konnte nachgewiesen werden, dass eine Beladung von gereinigten Nukleokapsiden mit weiteren P-Proteinen zu einer Leistungssteigerung der SeV-Transkription führt. In *in vitro*-Transkriptionsstudien bewirkte die fünf- bis zehnfachen Menge an P-Protein einen Anstieg der Transkription um mehr als das Vierfache (Curran, 1996).

Bei Infektionsversuchen mit entsprechenden Virusmutanten konnte der Bedarf an neu synthetisiertem P-Protein für eine effiziente virale Transkription gezeigt werden. Infektionen von Vero-Zellen mit SeV eGFP Δ P (*moi* 1) führten zu keiner über Western Blot- oder FACS-Analyse feststellbaren eGFP-Transgenexpression. Wurden die Infektionen jedoch mit dem ebenfalls replikationsdefizienten SeV eGFP P Δ 2-77 durchgeführt, das für ein N-terminal verkürztes P-Protein kodiert, konnte eine eindeutige eGFP-Expression festgestellt werden. Erst die Synthese des P-Proteins, in diesem Fall des verkürzten P-Proteins P Δ 2-77, ermöglichte eine effiziente SeV-Transkription. Nebenbei ist zu festzuhalten, dass während SeV eGFP P Δ 2-77-Infektionen das für eine effiziente Transkription benötigte SeV N-Protein synthetisiert wird.

Da im Falle von SeV P Δ 2-77-Infektionen ein partiell deletiertes P-Protein ausreicht, um die SeV-Transkription zu unterstützen, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob für das SeV N-Protein eine analoge Situation herbeigeführt werden könnte, bei der ein teilweise deletiertes N-Protein die SeV-Transkription unterstützt aber nicht die Replikation. Da das N-Protein während der Genom-Replikation nur in Form von N⁰-P-Komplexen von der RdRp als Substrat verwendet werden

kann, sollte eine Deletion des Bereichs des N-Proteins, der die Wechselwirkung mit dem P-Protein im N⁰-P-Komplex eingeht, für eine Replikationsdefizienz ausreichen. Dieser Bereich konnte in *in vitro*- und *in vivo*-Replikationsstudien auf die As472-491 eingegrenzt werden (Cevik et al., 2004). Aufgrund dessen wurden zwei SeV-Mutanten hergestellt, die Deletionen des für diese As kodierenden Bereichs aufwiesen und ein eGFP-Transgen kodierten. SeV NΔ472-91 PE besaß eine interne Deletion von 60 Nt und SeV NΔ472-524 PE verfügte über eine C-terminale Deletion ab den für die As472 des N-Proteins kodierenden Nt. Mutante SeV NΔ472-91 PE wurde hergestellt, um nur die minimal notwendige Deletion für eine Replikationsdefizienz des N-Proteins vornehmen zu müssen. Es stellte sich jedoch heraus, dass während der Herstellung von SeV NΔ472-524 PE im *virus rescue* teilweise Revertanten mit der SeV-wt-Sequenz auftraten. Anscheinend kann es während des *rescue*-Prozesses auf DNA-Ebene zu Rekombinationsereignissen kommen, wobei die 60 Nt große Deletion innerhalb des N-Gens gegen die wt-Sequenz ersetzt wurde; damit ist die Replikationsdefizienz von SeV NΔ472-91 PE nicht mehr sichergestellt. Im Folgenden konnte nur die Mutante SeV NΔ472-524 PE auf eine Unterstützung der SeV-Transkription untersucht werden. Während Infektionen von Vero-Zellen mit SeV NΔ472-524 PE konnte allerdings ebenfalls, wie während SeV ΔN-Infektionen, keine eGFP-Transgenexpression festgestellt werden. Um auszuschließen, dass dieser Befund nicht auf einer zu geringen Menge an exprimierten Rumpf-N-Proteinen (NΔ472-524) während SeV NΔ472-524-Infektionen beruhte, wurde eine stark erhöhte Menge an SeV NΔ472-524-Proteinen bereitgestellt: Dazu wurden BSR-T7-Zellen mit einem Expressionsplasmid, das für das NΔ472-524 kodierte (pRE-N471), transfiziert. Anschließend wurden diese transfizierten Zellen mit SeV ΔN infiziert. Über Immunfluoreszenz konnte sichergestellt werden, dass die Menge an NΔ472-524-Proteinen vergleichbar hoch war wie SeV N-Proteinmengen während wt-Infektionen. Eine eGFP-Transgenexpression wurde durch das C-terminal verkürzte N-Protein jedoch auch nicht unterstützt. Daraus kann geschlossen werden, dass der deletierte Bereich des N-Proteins für die Transkriptions-unterstützende Eigenschaft des N-Proteins bedeutend ist. Dass die Deletion in NΔ472-524 zu einer veränderten Konformation des N-Proteins führt, die eine Unterstützung der Transkription unmöglich macht, erscheint aus den Daten zum tryptischen Verdau von N-Protein unwahrscheinlich (Heggeness et al., 1981).

Nachfolgend soll ein Modell für eine die SeV-Transkription fördernde neue Aktivität des N-Proteins vorgestellt und diskutiert werden.

4.4. Neue Modellvorstellungen zum Polymerasekomplex

Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Transkription während einer SeV ΔN-Infektion nur dann effizient abläuft, wenn parallel eine Neusynthese von SeV N-Protein

stattfindet, soll nun eine mögliche, noch unbeschriebene Funktion des N-Proteins während der Transkription vorgestellt werden.

Zu Beginn der SeV-Infektion liegt ein einzelnes SeV-Nukleokapsid (NC) im Zytoplasma der infizierten Zelle vor, das über alle Informationen und die Funktionen für die virale Nachkommenproduktion verfügt. Diese virale „replikative Einheit“ konnte experimentell nachgewiesen werden, indem nach der Transfektion von Zellen mit NC eine Virusfreisetzung festgestellt wurde (Rozenblatt et al., 1979). Durch eine *in vitro*-Rekonstitution von SeV-NCs durch den Einsatz von Ribonukleoprotein-Komplexen (RNPs) in Verbindung mit in Zellen synthetisierten viralen Proteinen konnte gezeigt werden, dass für die virale Genom-Replikation die drei SeV-Proteine N, P und L erforderlich sind, während für die mRNA-Synthese die beiden Proteine P und L ausreichen (Curran et al., 1993, Horikami et al., 1992). Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die als Teil des NC initial in der infizierten Zelle vorhandenen ca. 30 Polymerasekomplexe (RdRp) die viralen Gene vielfach ablesen müssen, damit eine ausreichende Anzahl an SeV-Proteinen für die Herstellung nur eines neuen NC synthetisiert werden kann. Diese anfangs, noch ohne neu synthetisierte virale Proteine stattfindende Primärtranskription genügt daher sicherlich nicht für eine effiziente Virusreplikation. Darüber hinaus besitzen die RdRp-Komplexe sicherlich nur eine begrenzte Halbwertszeit, weshalb eine Neusynthese von P- und L-Proteinen erforderlich sein muss. Die Notwendigkeit der Mutante SeV PA Δ 2-77 zumindest ein verkürztes P-Protein für eine effiziente virale Transkription zu synthetisieren unterstützt bereits eine solche Vermutung (Schlecht, 2004). Die erst nach einer Neusynthese viraler Proteine ablaufende Sekundärtranskription weist ein deutlich größeres Leistungsvermögen als die primäre Transkription auf.

Doch welche Funktion könnte das in dieser Arbeit als essentielle Voraussetzung für die virale Transkription identifizierte, neu synthetisierte SeV N-Protein ausüben? Der RdRp-Komplex besteht nur aus P- und L-Proteinen, mRNA-Moleküle werden nicht mit N-Proteinen verpackt und in *in vitro*-Versuchen wurde für eine virale Transkription kein zusätzliches N-Protein benötigt. Allerdings wurden trotz der vielen Untersuchungen zu Funktion und Ablauf des viralen Replikationskomplexes bestimmte Fragestellungen noch nicht untersucht:

- 1) Unterscheidet sich die Primärtranskription, ohne Anwesenheit neu synthetisierter viraler Proteine, von der Sekundärtranskription, die in Anwesenheit neu synthetisierter Proteine stattfindet?
- 2) Wie finden die RdRp-Komplexe möglichst schnell und zielsicher das 3'-Ende des *templates*. Das könnte sowohl RdRp-Komplexe betreffen, die bereits eine Transkription durchgeführt haben und am Ende des *templates* angelangt sind, als auch neu im Zytoplasma gebildete RdRp-Komplexe. Im ersteren Fall stellt sich auch die Frage auf welche Weise eine mehrfache Transkription durch einen RdRp-Komplex effizient gesteuert wird. Da die RdRp-Komplexe neben der Transkription auch die

Genom-Replikation ausführen, bei der durch die „Rule of Six“ Nukleotid-genaue Genom-Kopien erstellt werden müssen, dürften solche Prozesse dafür ebenfalls eine wesentliche Rolle spielen.

Die im Folgenden exemplarisch für die Transkription beschriebene Funktion von neu synthetisierten SeV N-Proteinen unterstützt dabei die Initiations- und Terminationsvorgänge.

Während der zu Anfang einer Infektion stattfindenden Primärtranskription spielt eine Neusynthese von N-Protein wahrscheinlich keine Rolle (Abb. 45 – I), da die RdRp-Komplexe bereits in Assoziation mit dem RNP in die Zelle gelangt sind. Die RdRp liest der Reihe nach den *leader* und dann die einzelnen Gene ab, bis es spätestens nach dem L-Gen zur Termination der Transkription kommt. Nach jedem Gen „überspringt“ sie das intergene Triplet und beginnt am nächsten Genstart eine neue mRNA-Synthese. Bei diesem Prozess kann es passieren, dass die Polymerase die Transkription am nächsten Genstart nicht mehr aufnehmen kann, d.h. es kommt zu einer Termination der Transkription. Gemäß dem Transkriptionsgradienten bei der SeV-Transkription tritt dieser Transkriptionsabbruch umso häufiger auf, je weiter Gene vom Genomanfang entfernt liegen.

An dieser Stelle, d.h. nach Beendigung des ersten Transkriptions-Durchgangs, treten neu synthetisierte N-Proteine in Aktion. Am Ende des Gens, an dem die RdRp die RNA-Synthese beendet, lagern sich, analog zur Initiation, freie N-Proteine an das N^{NC} an (Abb. 45 – II). Sobald sich ein N-Protein an ein N^{NC}-Protein angelagert hat, kann sich die RdRp schrittweise auf dieses begeben. Sobald sich ausreichend N-Proteine zu einer neuen „Fähre“ angelagert haben, kann sich die RdRp vom NC entfernen und steht damit für weitere RNA-Synthesen zur Verfügung.

Für die Funktion der P-Proteine während der Termination gibt es zwei denkbare Varianten: Entweder wandert das L-Protein Stück für Stück auf die mit den freien N-Proteinen assoziierten P-Proteine und lässt so die P-Proteine, mit denen es auf dem *template* verbunden war, zurück. Dabei werden dann die zurückgebliebenen P-Proteine abgebaut (*turnover* an P-Protein). Oder die P-Proteine, die mit den neu angelagerten N-Proteinen assoziiert sind, werden während der Beladung der N-Proteine mit der RdRp freigesetzt und abgebaut. Dabei fallen die freigesetzten P-Proteine einem Proteinabbau anheim (P-Protein-*turnover*). Ein hoher P-Verbrauch wurde von verschiedenen Autoren beschrieben, ein Modell hierfür jedoch noch nicht aufgestellt (Curran, 1996, Lamb et al., 1976, Portner & Kingsbury, 1976).

Die nach der ersten Transkription für weitere Transkriptionsrunden wieder verfügbaren RdRp-Komplexe, aber auch die aus neu synthetisierten P- und L-Proteinen gebildeten RdRp-Komplexe müssen, um ihre Funktion ausführen zu können, möglichst effektiv den Beginn des *templates* (wieder)finden.

Während der Initiation der Transkription lagert sich die RdRp über ihre „Fähre“ aus SeV N-Proteinen am Anfang des Genoms über N-N^{NC}-Wechselwirkung an (Abb. 45 – III). Dabei ist die

RdRp über ihre P-Proteine jeweils mit einem N-Protein assoziiert (RdRp-N). Die N-Proteine dienen quasi als „Fähre“ im Zytoplasma, um den Genomanfang zu finden und dort „anzudocken“.

Wenn der erste Kontakt zwischen den N-Proteinen aus dem RdRp-N-Komplex und den N-Proteinen des NC stattgefunden hat ($N-N^{NC}$), wandert die RdRp von der „Fähre“ auf die N-Proteine des NC, interagiert mit den Promotersequenzen und kann am Anfang des Genoms mit der Transkription beginnen. Auf diese Weise findet die RdRp auch problemlos das 3'-Ende des Genoms. Die Interaktion der zurückgebliebenen N-Proteine verliert ohne die RdRp an Stabilität, so dass sie aufbricht oder die N-Proteine möglicherweise dem Proteinabbau zum Opfer fallen, wodurch ein *turnover* an N-Protein auftreten würde. Dadurch könnte ebenfalls ein zusätzlicher Bedarf an neu synthetisiertem N-Protein entstehen.

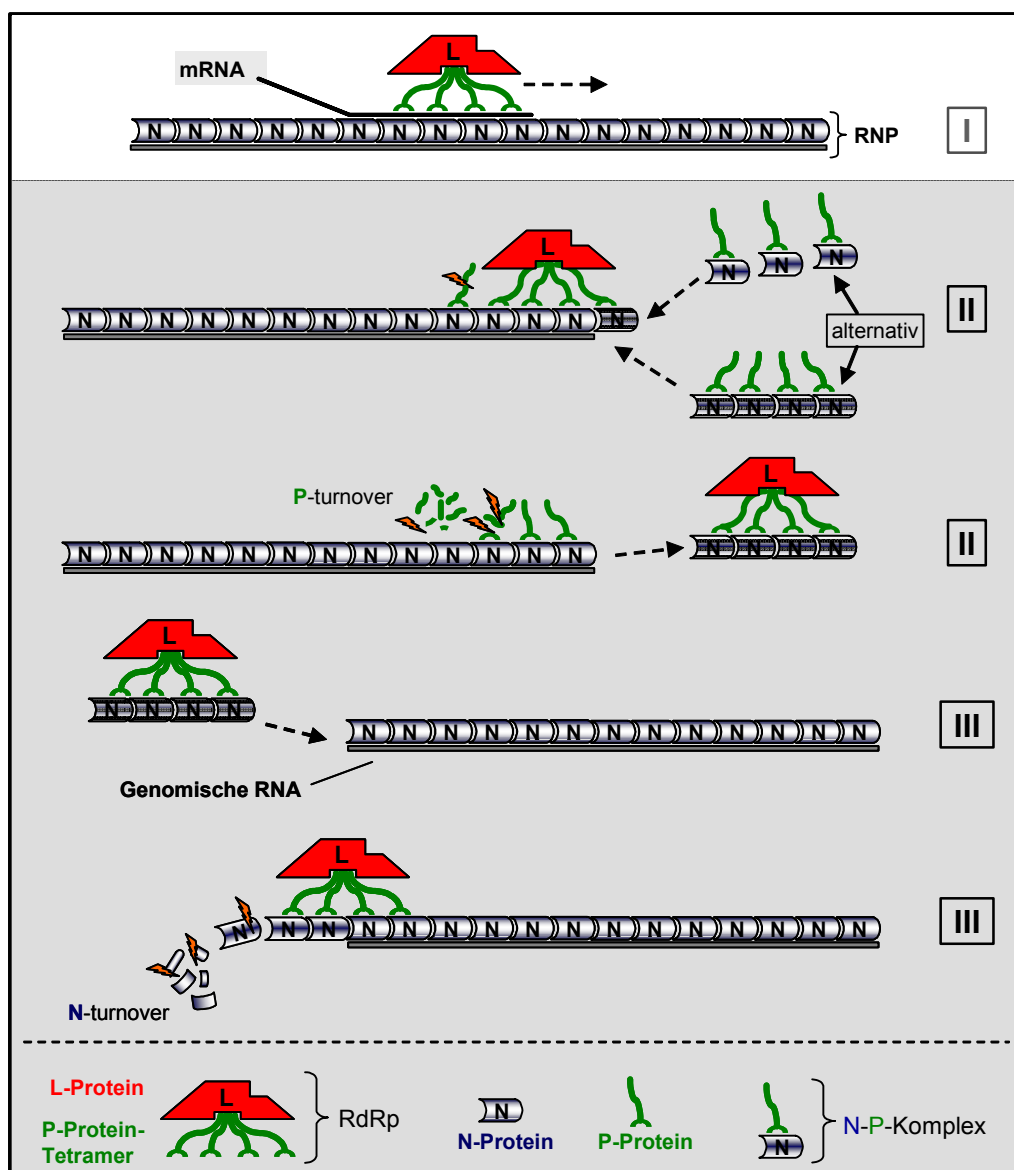


Abbildung 45: Modellvorstellung zur Unterstützung der SeV Transkription durch zusätzliche SeV N- und P-Proteine.

Die hier beschriebenen Funktionen von N- und P-Proteinen bei Initiation und Termination der Transkription finden bei der SeV-Replikation von Genom und Antigenom genauso statt. Da Replikationsvorgänge im Vergleich zur Transkription jedoch deutlich seltener ablaufen, ist der Bedarf an zusätzlichem N-Protein für die Replikation wesentlich geringer. Eine Abschätzung der während einer SeV-Infektion ablaufenden großen Anzahl an Transkriptionsereignisse, beispielhaft für einen *steady state* über eine Stunde, soll den Sinn eines Mechanismus' verdeutlichen, der den Ablauf von Transkription koordinieren und dadurch beschleunigen kann. Werden die während einer Stunde in Form von VP, infektiösen und defektiven, aus einer infizierten Zelle ausgeschleusten N-Proteine, die die viralen Genome im NC komplexieren, unter Einbeziehung einer geschätzten mRNA-Translationsrate zusammengerechnet, müssten allein in dieser Zeit ca. 2564×10^6 N-Gen-Transkripte hergestellt werden. In dieser Zahl noch nicht integriert sind alle Transkriptionsereignisse, die zu einem Überschuss an viralen Proteinen in der Zelle führen, die zu nicht funktionellen Proteinen führen und die Anzahl Genom- und Antigenomreplikationen, die ebenfalls wie die Transkription auf einer koordinierten Initiation und einer Termination beruhen.

Die in dem Modell vorgestellten viralen Komponenten befinden sich im Zytoplasma, wo sie bereits teilweise miteinander interagieren. Die N-Proteine liegen im Zytoplasma assoziiert mit P-Proteinen vor, da sie sonst unspezifisch zelluläre RNA-Stränge komplexieren würden (Buchholz et al., 1993). Die Wechselwirkung zwischen N- und P-Protein kann dabei nicht der aus N^0 -P-Komplexen entsprechen, da angenommen wird, dass N^0 -P-Komplexe mit dem L-Protein der RdRp nur als singuläre Einheiten bei der Genom-Replikation interagieren (Curran et al., 1995, Horikami et al., 1996). Wahrscheinlicher erscheint eine N^{NC} -P-Wechselwirkung, die auch während Transkription und Replikation auftritt, wenn die RdRp mit den N-Proteinen des RNP interagiert (Buchholz et al., 1994, Curran, 1996).

Eine Assoziation von P- und L-Proteinen zur RdRp findet ebenfalls bereits im Zytoplasma, vor der Anlagerung an das *template*, statt (Horikami et al., 1992). Dabei bilden die in der RdRp vorkommenden P-Proteine ein Homotetramer (Tarbouriech et al., 2000). Die während SeV-Infektionen in deutlich größerer Menge als L-Protein vorkommenden N- und P-Proteine interagieren oft ohne eine Beteiligung von L-Protein miteinander. Neben den für die Replikation als Substrat benötigten N^0 -P-Komplexen, aus je einem N- und P-Protein, entstehen auch Oligomere aus N- und P-Proteinen. Eine Assoziation der einzelnen N-P-Einheiten könnte dabei durch Wechselwirkung zwischen den N-Proteinen zustande kommen, die, ebenso wie im NC in Verbindung mit RNA, auch ohne RNA Struktur gebend miteinander interagieren können. Möglicherweise verfügt diese Bindung ohne RNA nicht über eine dauerhafte Stabilität, was aber auch nicht notwendig ist um den Zweck einer „Fähre“ zu erfüllen. Zusätzlich wäre auch eine Wechselwirkung zwischen den einzelnen P-

Proteinen der N-P-Untereinheiten denkbar. Diese bilden ja in Verbindung mit dem L-Protein ein Tetramer und verfügen dazu über einen Bereich, über den sie miteinander wechselwirken können (Curran et al., 1995). Oligomere aus N-P-Einheiten ohne L-Protein bilden „leere Fähren“, die womöglich ausschließlich ihren Zweck bei den Terminationsereignissen erfüllen, da sie einen RdRp-Komplex aufnehmen können. Da die hier postulierten „Fähren“ nie mit zwei L-Proteinen gleichzeitig beladen werden können, können Fähren, die mit einer RdRp beladen sind, nur am Anfang des Genoms wirksam werden. Auf diese Weise sind die „Fähren“ je nach Beladungszustand für Initiation oder Termination determiniert. Interessanterweise konnten aus Zellen, die mit Vesikular Stomatitis Viren – ebenfalls zu den *Mononegavirales* gehörend – infiziert waren, Komplexe isoliert werden, die gleichzeitig aus N- P- und L-Proteinen bestanden (Gupta et al., 2003) und somit einer beladenen „Fähre“ entsprechen könnten. Leider konnte das stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Proteine in diesen Komplexen noch nicht bestimmt werden. Untersuchungen ob solche Komplexe bei SeV, neben den bereits nachgewiesenen N-P- und P-L-Komplexen, ebenfalls existieren, könnten zu einer weiteren Aufklärung über weitgehend noch unbekanntem molekularem Ablauf von Initiation und Termination der SeV-Transkription und -Replikation beitragen.

Die Initiation der Transkription stellt sowohl bei Eukaryonten als auch bei Prokaryonten einen entscheidenden Regulationspunkt dar, da hierbei ein koordiniertes Zusammenspiel verschiedener Komponenten zu einem aktiven Transkriptionskomplex auftreten muss (Sawadogo & Sentenac, 1990). Für SeV sind bisher nur wenige Komponenten für die Entstehung dieses Komplexes beschrieben. Neben dem viralen Polymerasekomplex (RdRp), aus einem L-Protein und einem P-Proteintetramer, könnte nach dem vorgestellten Modell auch neu synthetisiertes N-Protein beteiligt sein. Als zelluläre Komponente konnte eine noch nicht genau beschriebene Beteiligung von Tubulin an der Entstehung des SeV-Transkriptionskomplexes festgestellt werden (Takagi et al., 1995). Dabei wäre eine Interaktion von SeV N-Proteinen mit Tubulin denkbar, wodurch die NC, aber auch die „Fähren“, an Tubulin assoziiert vorliegen und dadurch eine Wechselwirkung zwischen beiden zielgerichteter stattfinden könnte als wenn alle NC und „Fähren“ „lose“ im Zytoplasma vorlägen.

In dem bisher einzigen vorgeschlagenen Modell zum Auffinden des Startpunktes der SeV-Polymerase bei der SeV-Transkription und -Replikation wurde ein *scanning*-Mechanismus vorgeschlagen (Kolakovsky et al., 2004). Dabei lagert sich die RdRp an einer unbestimmten Stelle auf dem NC an und läuft dieses, in die eine oder andere Richtung, bis eine Promotersequenz gefunden wurde entlang. Allerdings bleiben bei diesem Modell einige Fragestellungen ungeklärt. Durch einen nicht vorbestimmten Anlagerungspunkt der RdRp an das NC müsste die RdRp möglicherweise eine große Strecke bis zum Promoterbereich mittels *scanning* zurücklegen. Der Verbrauch einer dafür benötigten Energie, die aus Dephosphorylierungsvorgängen des N-Proteins

resultieren könnte, könnte eine wenig ökonomische Wirkungsweise der SeV-Transkription und -Replikation darstellen, was untypisch für biologische Systeme ist. Darüber hinaus bietet dieses Modell keine Lösung für einen möglichen „Zusammenstoß“ von zwei RdRp-Molekülen auf dem *template*. Transkribiert beispielsweise eine RdRp gerade während eine andere auf der Suche nach dem Promoter ist, könnten sie sich blockieren und eine der beiden RdRp möglicherweise ihre Funktion nicht mehr ausführen. Da davon ausgegangen werden kann, dass sich während des viralen Replikationszyklus' zur gleichen Zeit viele aktive RdRp-Moleküle auf dem RNP befinden, wäre dieser Vorgang sehr ineffektiv. Das hier neu vorgestellte Modell mit einer gezielten Anlagerung der RdRp am 3'-Ende des viralen Genoms würde die beiden angesprochenen Problemfälle ausschließen und eine zirkulär geordnete Transkription und Replikation erlauben.

Für die Funktion des *scanning*-Mechanismus bei der Termination der Transkription aller SeV-Gene oder der Replikation wird vorgeschlagen, dass die RdRp nach Beendigung der Polymerisierung auf dem NC einfach „weiterläuft“, wodurch sie am Ende des Genoms vom *template* abfällt (Kolakofsky et al., 2004). Wie die RdRp allerdings im Falle einer vor dem L-Gen abgebrochenen Transkription dadurch vom *template* dissoziiert, kann so nur schwer erklärt werden. Im Falle einer vorzeitig beendeten Transkription müsste die RdRp dann einfach ohne weiteres *scanning* vom *template* abfallen, d.h. es gäbe insgesamt zwei Mechanismen für eine Termination der Transkription. Wenngleich dieser Vorgang denkbar wäre, würde das Fahren-Modell einen effektiveren Ansatz für eine möglichst schnelle Wiederverwendung der RdRp bieten und es lässt sich auch auf eine nur partielle Transkription der SeV-Gene anwenden.

Um herauszufinden in welchem Ausmaß zusätzlich vorhandenes N- und P-Protein eine SeV-Transkription unterstützen kann, könnten Zellinfektionen mit replikationsdefizienten SeV-Partikeln in Gegenwart von RdRp-Komplexen mit oder ohne zusätzlichen SeV N- und P Δ 2-77-Proteinen durchgeführt werden. Als replikationsdefiziente Genome würden sich stark verkürzte defektive SeV-Partikel (DIP) gut eignen, die nur ein Gen kodieren, dessen Transkriptionsprodukt sich leicht messen ließe, wie z.B. eGFP. Durch die zusätzliche Gabe von N- und P Δ 2-77-Proteinen wäre eine Transkriptionsunterstützung gewährleistet ohne eine Replikation zu ermöglichen (Schlecht, 2004), wodurch die Anzahl an *templates* in den Zellen dem Input durch die Infektion entsprechen würde. Dadurch würde sich eine gesteigerte Transkriptionsleistung zuverlässig nachweisen lassen und könnte nicht auf eine parallel zur Transkriptionsleistung gestiegene *template*-Menge zurückgeführt werden.

Nachdem die in früheren *in vitro*-Studien zur SeV-Transkription identifizierten Transkriptionsprodukte in den in dieser Arbeit durchgeführten Studien während SeV-Infektionen ohne parallel stattfindende SeV N-Proteinsynthese nicht nachgewiesen werden konnten, sollen weitere Untersuchungen Aufschluss über die tatsächliche Leistung einer Primärtranskription im

Gegensatz zur Sekundärtranskription geben. Das *in vitro*-System stellt im Vergleich zu SeV-Zellinfektionen ein relativ artifizielles System dar und es wurden bereits öfter divergierende Ergebnisse von Fragestellungen gefunden, die mit beiden Systemen untersucht worden waren (s. Einleitung). Deshalb werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt die für die *in vitro*-Studien eingesetzten, sehr sensitiven Techniken zum Nachweis von Transkriptionsprodukten bei Infektionen mit SeV ΔN angewandt. Bei diesen von Valery Grdzlishvili (*University of North Carolina at Charlotte*) durchgeführten Experimenten werden die während SeV-Zellinfektionen auftretenden Transkriptionsprodukte in Gegenwart und Abwesenheit einer SeV N-Proteinneusynthese gemessen. Auf diese Weise soll Klarheit darüber gewonnen werden, wie leistungsfähig eine Primärtranskription während SeV-Infektionen ist, die ohne neu synthetisiertes N-Protein stattfindet. Lassen sich jedoch bei einer gleichzeitiger N-Proteinsynthese deutlich mehr Transkriptionsprodukte nachweisen (= Sekundärtranskription), kann von einer notwendigen Zusatzfunktion von SeV-N-Proteinen für die SeV-Transkription ausgegangen werden.

Um weitere qualitative und quantitative Aussagen über den Aufbau von „Fähren“ im Zytoplasma treffen zu können, wäre es interessant etwas über die Stabilität einer Wechselwirkung zwischen SeV N-Proteinen ohne RNA-Komplexierung zu erfahren. Nachdem solchen „Fähren“ in dem vorgeschlagenen Modell oft auf- und abgebaut werden (N- und P-*turnover*) und solche Fähren in den bisherigen *in vitro*-Untersuchungen noch nicht festgestellt werden konnten, dürfte nur eine geringe Stabilität der N-N-Wechselwirkung ohne RNA-Komplexierung zu erwarten sein.

Könnte durch weitere Untersuchungen die Existenz des hier vorgestellten oder eines ähnlichen Modells zur Unterstützung der SeV-Transkription durch zusätzliches N- und P-Protein bestätigt werden, würde sich das Modell sicherlich nicht nur auf SeV beschränken lassen sondern für alle Vertreter der Paramyxoviren gelten. Die bisherigen Vorstellungen zu Ablauf und beteiligten Komponenten der Transkription und Replikation von Paramyxoviren konnten als allgemeingültig für alle verschiedenen Arten bestimmt werden (Lamb & Kolakofsky, 2001). Eine Erweiterung des bestehenden Modells wäre demnach ein essentieller Beitrag zur viralen Grundlagenforschung.

Daraus ergeben sich natürlich Folgen für die Entwicklung von viralen Vektorkonstrukten, die darauf aufbauen bestimmte Transgene in Zielzellen zu exprimieren. Je besser die Vorgänge der viralen Transkription verstanden werden, desto gezielter lassen sich Vektoren entwickeln, die eine Expression von Transgenen in einer gewünschten Stärke erfüllen.

5. Material und Methoden

5.1. Material und Bezugsquellen

5.1.1. Chemikalien & Lösungsmittel

Agarose (high EEO)	Biomol
Borsäure	Merck
Chloroform	Riedel de Haën
Desinfektionsmittel Icepure	Interchem Zug
Desinfektionsmittel Intersporol	Inter Hygiene
Desoxynukleotide	Roche Diagnostics
Didecyldimethylammoniumbromid (DDAB)	Sigma-Aldrich
Dioleoylthphosphatidylethanolamin (DOPE)	Sigma-Aldrich
3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)	Sigma-Aldrich
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL
Ethanol (absolut)	Riedel de Haën
Ethidiumbromid	Biomol
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glycerin	Merck
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Pharmacia
Methanol	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Phenol (pH 7,5 - 8)	Roth
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Titriplex III (EDTA)	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel de Haën
Trypanblau (0,5% in physiolog. Kochsalzlg.)	Sigma-Aldrich
X-Gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid)	Roche Diagnostics

5.1.2. Enzyme

Alkalische Phosphatase, Shrimp (SAP)	Roche Diagnostics
Expand High Fidelity (DNA-Polymerase)	Roche Diagnostics
Expand Long Template (DNA-Polymerase)	Roche Diagnostics
Pfu Turbo Hotstart (DNA-Polymerase)	Stratagene
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics
	MBI-Fermentas
	New England Bioloabs
	Amersham
Ribonuklease H	Amersham
SuperScript III (Reverse Transkriptase)	Invitrogen
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics
Taq DNA-Polymerase	Roche Diagnostics

5.1.3. Nukleinsäuren und Plasmide

DNA-Marker 1 kb-Leiter	MBI-Fermentas
DNA-Marker 100 bp-Leiter	Roche Diagnostics
dNTPs	Roche Diagnostics
	MBI-Fermentas
Oligonukleotide	MWG-Biotech
Plasmid pcDI18-L	AG Neubert
pcDNA5/TO	Invitrogen
Plasmid pTM1	B. Moss (Bethesda, USA)
Plasmid pUC29	Stratagene
Plasmid pUC19	Stratagene
Plasmid pTM-DsRed2	AG Neubert
Plasmid pTM-eGFP	AG Neubert
Plasmid pCMVSL3	Z. Xu (Tokyo, Japan)
Plasmid pGEM-N439	S. Moyer (Florida, USA)
Plasmid pGEM-N461	S. Moyer (Florida, USA)
Plasmid pGEM-N471	S. Moyer (Florida, USA)
Plasmid pTM-N (Sendai Virus)	AG Neubert
Plasmid pTM-P/C ⁻ (Sendai Virus)	AG Neubert
Plasmid pTM-L (Sendai Virus)	AG Neubert
Plasmid pTM-M (Sendai Virus)	AG Neubert

Plasmid pRS-Ide F _{mut}	AG Neubert
Plasmid pTM-eGFP	AG Neubert
Plasmid pTM-DsRed2	AG Neubert
Plasmid pPRECISE-DsRed	AG Neubert
Plasmid pRS-3G	AG Neubert
Plasmid pRS-3Gg	AG Neubert

5.1.4. Kompetente Bakterienstämme

E.coli XL-2 Blue MRF ⁺	Stratagene
E.coli XL10-Gold	Stratagene
E.coli GM2163	New England Biolabs
E.coli NEB 5 α C2991H	New England Biolabs

5.1.5. Medien und Zusätze für Prokaryonten

Ampicillin	Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Hefeextrakt	Difco

5.1.6. Zelllinien

293 (transformierte (Ad5) humane Nierenepithelzellen)	ATCC:CRL-1573
A549 (humane Lungenkarzinomzellen)	ATCC:CCL-185
BHK-21 (Hamsternierenzellen)	ATCC:CCL-10
CHO-K1 (Hamsteroarzellen)	ATCC:CCL-61
CV-1 (Affennierenzellen)	ATCC:CCL-70
HeLa (humane Cervixkarzinomzellen)	ATCC:CCL-2
HepG2 (humane Leberkarzinomzellen)	ATCC:HB-8065
LLC-MK ₂ (Affennierenzellen)	ATCC:CCL-7
Vero (Affennierenzellen)	ATCC:CCL-81
BSR-T7 (stabil T7-RNA-Polymerase produzierend)	K. Conzelmann (München)
H29 (stabil SeV N-, P, und L-Protein produzierend)	AG Neubert
LTK ⁻ -394 (stabil SeV N-Protein produzierend)	AG Neubert
LTK ⁻ -460 (stabil SeV N- und P-Protein produzierend)	AG Neubert

5.1.7. Medien und Zusätze für Eukaryonten

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL
OptiMEM	Gibco BRL
Ham's F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modifikation	Gibco BRL
Medium 199	Gibco BRL
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco BRL
→ 30 min bei 56°C Komplement inaktiviert	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Geneticin G418	Gibco BRL
Hygromycin B	PAA
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Puromycin	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% /0,53 mM)	Gibco BRL
Nocodazole	Sigma-Aldrich

5.1.8. Antikörper

Anti-SeV-N-Protein (rabbit) (polyklonal)	AG Neubert
Anti-SeV-Serum (rabbit) (polyklonal)	AG Neubert
Anti-rabbit Ig (POD-konjugiert)	Dako
Alexa Fluor®568 goat anti-mouse IgG (konjugiert)	Molecular Probes
Alexa Fluor®568 goat anti-rabbit IgG (konjugiert)	Molecular Probes

5.1.9. Transfektionsreagenzien

Effectene	Qiagen
FuGENE 6	Roche Diagnostics
FuGENE HD	Roche Diagnostics
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Metafectene	Biontex
Roti-Fect	Roth
SuperFect	Qiagen

5.1.10. Präparations- und Nachweissysteme

Expand High Fidelity PCR-Kit	Roche Diagnostics
Plasmid-Mini-Präparationskit	Qiagen

Plasmid-Midi-Präparationskit	Promega
Plasmid-Maxi-Präparationskit	Qiagen
Roti [®] -Elutions-Kit	Roth
QIAquick Gel Extraction-Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification-Kit	Qiagen
RNeasy Mini-Kit	Qiagen
BCA Protein Assay-Kit	Novagen
ECL Western Blotting Reagents	Amersham

5.1.11. Viren

Sendai Virus, Stamm Fushimi (D52)	ATCC:VR-105
Sendai Virus, Stamm Z	AG Neubert
Vaccinia Virus MVA-T7	G. Sutter (München)

5.1.12. Verwendete Geräte

Durchflußzytometer „FACS-Calibur“	Becton Dickinson
Einfriermaschine für Zellen „Cryson TRA5“	Cryoson
ELISA-Reader „MR7000“	Dynatech
Eppendorf Zentrifuge „5417R“	Eppendorf
Feinwaage Mettler „AE100“	Mettler-Toledo
Geldokumentationsanlage „Image Master“ VDS	Amersham
Heiz-Schüttel-Block „Thermomixer 5436“	Eppendorf
Spectrophotometer „DU 640“	Beckmann
Quarzküvette	Hellma
Schüttelinkubator „Innova 4200“	New Brunswick
Ultraschallgerät „Sonifier Cell Disruptor B15“	Branson
UV-Leuchtschirm „IL-200-M“	Bachofer
Wasserbad „Thermomix 1441“	Braun Melsungen

5.1.13. Sonstiges

Erythrozyten	AG Neubert
Filterpapier 3MM	Whatmann
Hyperfilm-ECL (Röntgenfilm)	Amersham
Kryoröhrchen	Nunc
Mineralöl	Sigma-Aldrich

Polaroidfilm Iso 3000/36 °	Polaroid
Polypropylenröhrchen (10 ml, 50 ml)	Falcon
Proteinmolekulargewichtsmarker	Amersham
PVDF-Membran	Immobilon
Reaktionsgefäße Safe Lock (1.5 ml, 2.0 ml)	Eppendorf
Zellkulturflaschen (T75, T25)	TPP
Zellkulturschalen 6-, 12-, 24-, 96-well	Corning, Nunc

5.2. Methoden

5.2.1. Zellbiologische Methoden

5.2.1.1. Allgemeine Zellkulturmethoden

Die Kultivierung von adhärenenten Säugerzelllinien wurde in Kunststoff-Rouxflaschen mit DMEM^{+FKS} (Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS)), in 5% CO₂-Atmosphäre und 89% relativer Luftfeuchtigkeit bei 37 °C durchgeführt. Bei Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit Trypsin/EDTA gewaschen und mit Trypsin/EDTA passagiert, d.h. abgelöst und verdünnt neu ausgesät.

Trypsin/EDTA:

0,5% Trypsin

0,2% EDTA

5.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl in Suspension

Die Bestimmung der Zellzahl in Suspension erfolgt durch Anfärben der toten Zellen und anschließendes Auszählen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu wird eine homogenisierte Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt und nach 5 min mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es gibt 4 Sektoren mit jeweils 16 Quadraten, die ausgezählt werden können. Anschließend wird der Mittelwert gebildet. Dieser wird dann mit 2 (wegen der 1:1-Verdünnung mit Trypanblau) und mit 10⁴ (Volumen der Zählkammer zu 1 ml) multipliziert. Die Formel lautet also: Mittelwert x 2 x 10⁴ = Zellzahl pro ml.

5.2.1.3. Transfektion von eukaryontischen Zellen

Transfektion mit Effectene, FuGENE 6 & HD, Lipofectamine 2000, Metafectene, SuperFect

Die Transfektion der Zellen erfolgte bei diesen Reagenzien durch die Methode der Lipofektion, die einen sehr effizienten Nukleinsäure-Transfer über Liposomen (kationische Lipide) ermöglicht.

Dabei wird die zu transfizierende Plasmid-DNA an positiv geladene Lipide gebunden, die sich zu Liposomen zusammenlagern. Diese Liposomen können leicht mit der Zellmembran verschmelzen und auf diese Weise DNA ins Zellinnere freisetzen. Die verwendeten Mengen und der Ablauf der Transfektion richteten sich nach den Angaben der Hersteller.

5.2.1.4. Transfektion mit LipofectACE

Zur Herstellung des Lipofektionsreagenzes wurden 10 mg DOPE und 4,2 mg DDAB in 1 ml Ethanol gelöst (20 x-Stammlösung). Die Stammlösung wurde in sterilen H₂O unter kräftigem Mischen 1:20 verdünnt.

In einem 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß (ERG) wurde zunächst die DNA vorgelegt. Nach Zugabe von 600 µl OptiMEM und Mischen konnte das Lipofektationsreagenz zugegeben werden. Die Menge des eingesetzten Lipofektationsreagenzes richtete sich nach der Menge der eingesetzten DNA (5 µg DNA = 15 µl LipofektACE). Nach nochmaligem Mischen wurde der Ansatz 15 - 20 min bei Raumtemperatur (Rt) inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Liposomen-Mix auf die vorher mit DMEM^{-FKS} gewaschenen Zellen gegeben. Die Zellen sollten zu 50% konfluent sein. Nach Zugabe von 1 ml OptiMEM erfolgte eine 15 - 16-stündige Inkubation bei 33 °C. Danach wurde der Transfektionsmix abgenommen, die Zellen 2 x mit DMEM^{-FKS} gewaschen und frisches Medium ohne FKS zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 24 – 48 h bei 33 °C inkubiert.

5.2.1.5. Isolierung von stabil transfizierten, eukaryontischen Zellklonen

Finden im Zellkern Rekombinationsereignisse statt, die zum Einbau der Plasmide ins Genom der Zelle führen, spricht man von einer stabil transfizierten Zelllinie. Stabil transfizierte Zellklone können durch ein geeignetes, auf dem Expressionsplasmid lokalisiertes Antibiotikum selektioniert werden. Resistente Zellklone wurden mit 15 µl Trypsin/EDTA inkubiert, indem diese mit der Pipettenspitze auf den Bereich des Zellklons der Kultur beschränkt aufgetragen wurden und nach kurzer Inkubation zusammen mit einigen Zellen wieder aufgesogen wurden. Diese Zellen konnten dann in eine gesonderte Kulturschale gegeben werden.

5.2.1.6. Monoklonalisierung von transfizierten Zellen

Um homogene Kulturen von stabil transfizierten Zelllinien zu erhalten, wurden diese subkloniert. Dazu wurden je 100 µl der Zellsuspension eines Zellklons auf 96-well-Mikrotiterplatten so ausgelegt, dass eine Dichte von 0,5 Zellen/100 µl vorlag. Nach 7 – 10 d Inkubation unter Selektionsbedingungen wurden die *wells* markiert, die genau eine Subklon-Kultur aufwiesen. nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellklone in größere Kulturschalen passagiert und für eine funktionelle Analyse des Zellklons eingesetzt.

5.2.1.7. Synchronisation des Zellzyklus mit Nocodazole

Eine Synchronisation des Zellzyklus mit Nocodazole bewirkt ein Anhalten an der Grenze der G2-Phase zur Mitose, da die Ausbildung von Mikrotubuli unterdrückt wird. Um Zellen an der Stelle zu arretieren, wurden diese subkonfluent ausgesät und, im Fall von Vero-Zellen, mit 400 ng Nocodazole pro ml Medium für 12 – 18 h inkubiert. Im *mitotic shake off* werden dann alle Zellen, die an der G2/M-Grenze angelangt sind und sich abgekugelt haben, in den Kulturüberstand gelöst. Diese Zellen werden dann in einem Zentrifugationsschritt von dem Nocodazole-haltigem Medium getrennt und in normalem Medium neu ausgesät. Ab diesem Zeitpunkt beginnen alle Zellen mit der Mitosephase des Zellzyklus.

5.2.1.8. MTT-Assay

Als Nachweisverfahren für die Vitalität von Zellen in Zellkultur wurde der MTT-Assay durchgeführt. Dabei wurde kolorimetrisch der Grad der Färbung von gelbem MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-Salz) zu violetter Formazan gemessen. In metabolisch aktiven Zellen wird das Tetrazolium-Salz mit Beteiligung der Kofaktoren NADH und NADPH zu Formazan reduziert. In metabolisch aktiven, also vitalen Zellen kommt es zu einer stärkeren Violett-Färbung als in geschädigten.

Das pulverförmige MTT wurde in PBS zu 5 mg/ml gelöst und anschließend steril filtriert (45 µm-Filter). Zu den jeweiligen angeführten Zeitpunkten wurden 10 µl MTT-Lösung pro 100 µl Medium zu den Zellen gegeben. Die Platten wurden bei 37 °C und 5% CO₂ für 3,5 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in saurer Isopropanol-Lösung (0,04 N HCl in Isopropanol) resuspendiert bis die entstandenen violetten Kristalle vollständig gelöst waren und das Medium homogen war.

Die Proben wurden mit einem ELISA-Reader (Dynatech MR7000) bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Die Referenz-Wellenlänge betrug 750 nm. Die Proben sollten innerhalb einer Stunde nach Zugabe des Isopropanols gemessen werden.

5.2.1.9. *In situ*-Immunfluoreszenz

Um in Zellen exprimierte Proteine über Antikörper nachzuweisen, wurden diese zunächst mit Methanol (eiskalt) 10 min fixiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS, wurde der erste Antikörper, in PBS^{+3%BSA}, zugegeben. Nach der einstündigen Inkubation bei Rt wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend der zweite Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, zugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde abermals dreimal gewaschen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops.

5.2.1.10. FACS-Analyse

Die Expressionsstärke des viral exprimierten Fluoreszenzproteins *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) [Emissionsmax: 508 nm, Extinktion: 489 nm] wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Calibur Gerätes bestimmt. Hierzu wurden infizierte oder transfizierte Zellen untersucht, die zunächst für die FACS-Analyse vorbereitet wurden. Dazu wurden die Zellen Trypsin/EDTA vom *well*-Boden abgelöst, in ein 10 ml-Kulturröhrchen gegeben und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach einmaligem Waschen 300 µl PBS aufgenommen und in ein FACS-Analyseröhrchen überführt. Die Zellkonzentration betrug mindestens 1×10^6 Zellen/ml. In dem FACS-Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit. In diese Trägerflüssigkeit wird die Probe eingebracht. Durch die höhere Strömungsfeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen vereinzelt und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt. Das Argon-Laserlicht führt zu einer Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Die Auswertung der erfassten Rohdaten erfolgte mit dem Computerprogramm „Cellquest“.

5.2.1.11. RNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von RNA aus Viruspartikeln wurde mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.2.2. Virologische Methoden

5.2.2.1. Herstellung rekombinanter Sendai Viren im *virus rescue*

5.2.2.1.1. *Virus rescue* mit MVA-T7-System

60 - 80% konfluente HeLa-Zellen im 6-*well* wurden zweimal mit DMEM^{-FKS} gewaschen und mit rekombinantem Vakzinia-Virus MVA-T7 mit einer *moi* (*multiplicity of infection*) von 10 für 1 h bei 33 °C infiziert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Transfektion der Zellen mit den Plasmiden pTM-N (5,4 µg), pTM-P (2,9 µg), pTM-L (0,26 µg) und dem SeV cDNA-Konstrukt (15 µg). Als Transfektionsreagenz wurden 47 µl eines selbst hergestellten Reagenzes (LipofectACETM) eingesetzt (5.2.1.4). Der Transfektionsansatz wurde 15 – 16 h bei 33 °C inkubiert. Dann wurde der Über-stand abgenommen, die Zellen zweimal mit DMEM^{-FKS} gewaschen und für weitere 24 – 48 h bei 33 °C inkubiert.

Während der Inkubation sollten rekombinante Sendai Viren aus den transfizierten HeLa-Zellen ins Medium abgegeben worden sein. Um diese nachzuweisen, wurden Vero- oder, im Fall der Herstellung mancher SeV-Mutanten, Helferzellen als Indikatorzellen mit den Zellkulturüberständen

infiziert. Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion ist allerdings die Aktivierung des F- Proteins an der Oberfläche der Viruspartikel durch die Proteolyse mit Trypsin. Deshalb muss auch nach der Erstinfektion weiterhin Trypsin im Medium (4 µg/ml) anwesend sein, um neu entstandene Sendai-Viren zu aktivieren und dadurch die Ausbreitung der Infektion zu ermöglichen. Bei der Verwendung einer SeV-Mutante mit modifiziertem F-Protein (SeV F_{mut}), ist eine Aktivierung der Viren und Zugabe von Trypsin nicht notwendig.

Mit einem Zellschaber wurden die infizierten und transfizierten HeLa-Zellen vom Boden der Kulturschale abgelöst und mit dem Medium zusammen in ein steriles 2,0 ml ERG überführt. Der Überstand wurde für 5 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Jeder HeLa-Überstand wurde in ein neues ERG gegeben und 4 µl Acetyl-Trypsin-Lösung (1 µg/µl) wurden zugefügt. Dieser Ansatz wurde bei Rt 1 h inkubiert. Dieser Schritt entfiel bei der Verwendung von SeV mit modifiziertem F-Protein (SeV F_{mut}).

5.2.2.1.2. Virus rescue mit BSR-T7-System

Zu 50% konfluente BSR-T7-Zellen im 6-well wurden zweimal mit DMEM^{-FKS} gewaschen. Danach wurden 1,4 ml DMEM^{10%FKS} zugegeben. Dann erfolgte die Transfektion der Zellen mit den Plasmiden pTM-N (0,25 µg), pTM-P (0,15 µg), pTM-L (0,05 µg) und dem SeV cDNA Konstrukt (5,0 oder 7,5 µg). Von dem Transfektionsreagenz wurde die zweifache Menge der DNA an FuGENE 6 oder FuGENE HD eingesetzt (z.B. 5,55 µg DNA → 11 µl FuGENE 6).

Der Transfektionsansatz wurde auf die BSR-T7-Zellen getropft und bis zu 6 Tagen bei 33 °C inkubiert. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel mit DMEM^{2%FKS}.

Die durch die täglichen Medienwechsel erhaltenen Überstände wurden in neue ERG überführt. Während der Inkubation sollten rekombinante Sendai Viren aus den transfizierten BSR-T7-Zellen ins Medium abgegeben worden sein. Diese sollten durch Infektion von Indikatorzellen nachgewiesen werden.

5.2.2.2. Infektion von Zellen

Zur Infektion von Zellen mit rekombinanten Sendai Viren wurden diese zweimal mit FKS-freiem Medium (DMEM^{-FKS}) gewaschen und anschließend 1 h mit einem die Zellen gerade benetzenden Volumen an Virussuspension bei 37 °C inkubiert (= Adsorption). Um eine gleichmäßige Adsorption an Viruspartikeln zu erreichen, wurde die Zellkulturschale alle 15 min leicht geschwenkt. Nach Adsorption der Viren wurde der Überstand abgenommen, die Zellen zweimal mit DMEM^{-FKS} gewaschen und dann mit Medium bei 33 °C inkubiert.

5.2.2.3. Hämadsorptionstest (HAD)

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

Alsever's Lösung (Lagerung der Erythrozyten):

0,42 % NaCl

0,8 % Natriumcitrat

2,05 % Glucose

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

1%ige Suspension von Erythrozyten:

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

ad 10 ml mit Medium

5.2.2.4. Hämagglutinationstest (HA)

Der HA-Test beruht auf der Fähigkeit des HN-Proteins in der Virushülle, an Erythrozyten zu binden. Bei ausreichender Anzahl von Viren erfolgt dadurch eine Vernetzung der Erythrozyten. Der Test wurde in Mikrotiterplatten mit konkavem Boden durchgeführt. Es wurden 25 µl einer Virusverdünnung (serielle Zweifach-Verdünnung in Medium) vorgelegt und mit jeweils 25 µl einer 1%igen Suspension von Erythrozyten (human, Blutgruppe 0) versetzt. Der Ansatz wurde mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Die durch die Viren verursachte Agglutination hemmt das Absinken der Erythrozyten in das Zentrum des konkaven Bodens. Eine hämagglutinierende Einheit (HA) entspricht derjenigen Verdünnung, bei der gerade noch eine vollständige Agglutination erfolgt. Eine HA-Einheit entspricht 1×10^7 Viruspartikeln.

5.2.2.5. Kulturinfektionsdosistest (KID)

Der KID-Test ist ein einfacher Test zur Quantifizierung infektiöser Einheiten in einer Virussuspension (Chanock & Johnson, 1964). Die Einheiten sind relativ und nur bei identischem Testaufbau untereinander vergleichbar. In einer Mikrotiterplatte mit konkavem Boden wurden 25 µl einer Virusverdünnung (serielle Zweifach-Verdünnung in Medium) vorgelegt und je $1,5 \times 10^4$ Vero-Zellen in 50 µl Medium mit 5% FKS zugegeben. Der Ansatz wurde 24 h bei 33 °C inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 25 µl einer 1%igen Erythrozytensuspension (human, Blutgruppe 0) wurde der

Test für mindestens 3 h bei 4 °C inkubiert. Im Falle einer erfolgreichen Infektion wird in den Zellen das HN-Protein synthetisiert. Die Erythrozyten werden an die Zellen adsorbiert und können sich nicht mehr im Zentrum der konkaven Vertiefung sammeln.

Die Virusverdünnung, bei der gerade noch eine Adsorption zu beobachten ist, enthält definitionsgemäß eine KID-Einheit. Eine KID-Einheit entspricht etwa 5×10^4 *ciu*.

5.2.2.6. Zellinfektionsdosistest (ZID)

Der ZID-Test wurde zur Quantifizierung infektiöser Viruspartikel, die die einfach zu messenden Reporterproteine „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP) oder DsRed kodieren, etabliert. Durch Anregung des zu untersuchenden Präparates mit Licht im entsprechenden nm-Bereich kommt es in eGFP- oder DsRed-exprimierenden Zellen zur Emission von grünem bzw. rotem Licht, welches im Fluoreszenzmikroskop einfach und schnell detektiert werden kann. Auf diesen Eigenschaften basiert der ZID-Test. In einer 96-*well*-Mikrotiterplatte mit konvexem Boden wurden 25 µl einer Virusverdünnung (serielle vierfach- oder Zweifach-Verdünnung in Medium) vorgelegt und je 3×10^4 Zellen in 50 µl Medium mit 5% FKS zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 – 36 h bei 33 °C konnten die infizierten und somit fluoreszierenden Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops detektiert werden und, unter Einbeziehung der entsprechenden Verdünnungsstufe, der Titer der Virussuspension pro ml ermittelt werden.

5.2.3. Molekularbiologische Methoden

5.2.3.1. Transformation von *E.coli* XL2-Blue MRF⁺ und XL10-Gold

50 µl, auf Eis aufgetaute, kompetente *E.coli*-Zellen wurden mit 1 µl β-Mercaptoethanol versetzt und mit der Plasmid-DNA (10 - 100 ng) gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 30 s bei 42 °C. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden pro Ansatz 450 µl NZY⁺-Medium zugegeben. Zur Regeneration wurden die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 100 - 500 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.

Bei Verwendung eines Vektors mit einer Klonierungsstelle innerhalb des β-lac-Operons, dessen Genprodukte u.a. X-Gal umsetzen können, eignen sich LB-Agarplatten mit X-Gal und IPTG. Über die Färbung von transformierten Kolonien kann direkt festgestellt werden, ob ein Insert in den Vektor eingebaut wurde oder nicht. Blaue Kolonien bilden β-Galactosidase, die X-Gal umsetzen kann, wodurch sich die Kolonien blau färben. Wurde ein Insert in den Vektor eingesetzt, wurde dadurch das Gen für die β-Galactosidase zerstört, und die Kolonien bleiben weiß.

5.2.3.2. Transformation von *E.coli* NEB 5 α C2991H

50 μ l, auf Eis aufgetaute, kompetente *E.coli*-Zellen wurden mit der Plasmid-DNA (10 - 100 ng) gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden pro Ansatz 250 μ l SOC-Medium zugegeben. Zur Regeneration wurden die Zellen 20 - 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 75 - 300 μ l des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.

LB-Medium (Luria Bertani):

10	g	Bacto-Trypton
10	g	Hefeextrakt
5	g	NaCl

→ ad 1 l H₂O (bidest.), autoklavieren

LB_{Amp}-Agarplatten:

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

LB_{Amp}-X-Gal-IPTG-Agarplatten:

wie LB-Medium + 15 g Bacto-Agar
→ ad 1 l H₂O (bidest.), autoklavieren
nach Abkühlung (50 °C) Ampicillin (75 mg/l) + 2 ml X-Gal (40 mg/ml)
+ 500 μ l IPTG (1 M-Stammlösung) zugeben

NZY[±]-Medium:

10	g	NZ-Aminosäuren
5	g	Hefe-Extrakt
5	g	NaCl

→ mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
→ ad 1 l H₂O (bidest.), autoklavieren
12,5 ml 1 M MgCl₂
12,5 ml 1 M MgSO₄
20,0 ml 20% (w/ v) Glucose
→ steril filtrieren

SOC-Medium:

2%		Pepton
0.5%		Hefe-Extrakt
10	mM	NaCl
2.5	mM	KCl
10	mM	MgCl ₂
10	mM	MgSO ₄
20	mM	Glucose

5.2.3.3. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

In dieser Arbeit wurden alle benötigten Plasmide mit Plasmid-Präparations-Systemen (Qiagen) gewonnen: DNA Mini & DNA Maxi Prep-Kit (Qiagen), DNA Midi Prep-Kit (Promega). Das Protokoll wird vom Hersteller mitgeliefert.

5.2.3.4. Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen Nukleinsäurelösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die DNA-Lösung wurde dazu mit dem gleichen Volumen Phenol (puffergesättigt, pH 7,5 - 8) gemischt. Nach dem Zentrifugieren (Eppendorf-Tischzentrifuge, 4000 g, 10 min, Rt) wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues ERG überführt. Es wurde ein Volumen Phenol/Chloroform zugegeben, gut gemischt und abzentrifugiert (12 000 g, 5 min, Rt). Die wässrige Phase wurde wieder in ein frisches ERG gegeben und mit einem Volumen Chloroform gemischt und abzentrifugiert (12 000 g, 5 min, RT). Der Überstand der wässrigen Phase wurde in einem neuen ERG über eine Isopropanol/Ethanol-Fällung weiter gereinigt und aufkonzentriert.

5.2.3.5. Isopropanol/Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren

Die Probe mit der Nukleinsäure wurde mit 1/10-Volumen Kaliumacetat (3 M) gemischt und danach mit 0,7 Volumen Isopropanol (100 %) versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Rt wurde die DNA abzentrifugiert (14 000 g, 30 min, 4 °C). Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet mit 100 – 200 µl Ethanol (- 20 °C) gewaschen und abzentrifugiert (14000 g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde bei Rt getrocknet und in einem geeigneten Volumen EB-Puffer resuspendiert.

5.2.3.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt (Beckman-Photometer). Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht der Absorptionswert von 1.0 einer Konzentration von ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotiden (Sambrook & Russell, 2001).

5.2.3.7. Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

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

$$\text{Enzymmenge [U]} = \frac{\text{Schnittstellen in Plasmid - DNA}}{\text{Schnittstellen in } \lambda \text{ - DNA}} \cdot \frac{\text{kb } \lambda \text{ - DNA}}{\text{kb Plasmid - DNA}} \cdot \mu\text{gDNA}$$

5.2.3.8. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation der freien Enden eines geschnittenen Vektors zu verhindern, wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen abgespalten. Dazu wurde die DNA in 1 x Alkalische-Phosphatase-Puffer mit 1 µl Alkalische Shrimp Phosphatase (20 U) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Fragmente weiterverarbeitet.

5.2.3.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Gereinigte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des T4 Rapid DNA Ligation-Kit kovalent verknüpft. Für die Reaktion wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen. In einem Gesamtvolumen von 21 µl lagen 10 µl DNA in 1 x DNA-Dilutions-Puffer, 10 µl Ligations-Puffer und 1 µl Enzym vor. Der Ansatz wurde 10 – 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der anschließenden Transformation wurden 5 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

5.2.3.10. Agarose-Gelelektrophorese

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

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit 1 - 2% Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 65 °C in eine Elektrophoreseapparatur gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Die zu analysierenden Proben (20 - 500 ng je Fragment) wurden zu 1/6 ihres Volumens mit Auftragspuffer versetzt, in Geltaschen geladen und bei 5 - 10 V/cm aufgetrennt.

TBE-Puffer:

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

5.2.3.11. Nachweis von Nukleinsäuren im Agarosegel

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

5.2.3.12. Isolierung von DNA-Fragmenten < 10 kb aus Agarosegelen

DNA-Fragmente bis konnten aus Agarosegelen nach der elektrophoretischen Auftrennung isoliert werden. Dazu wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNA nach dem Protokoll des Qiaquick Gel Extraction-Kit (Qiagen) isoliert.

5.2.3.13. Isolierung von DNA-Fragmenten ≥ 10 kb aus Agarosegelen

DNA-Fragmente ab einer Größe von 10 kb wurden durch Elektro-Elution mit dem Roti[®]-Elutions-Kit aus dem Gel isoliert und anschließend mittels Isopropanol/Ethanol-Fällung (5.x.x.x) gereinigt und aufkonzentriert.

5.2.3.14. Reverse Transkription (RT)

Mit Hilfe der Reversen Transkription (RT) und anschließender PCR wurde genomische RNA aus Präparationen infizierter Zellen amplifiziert. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits aus den Zellen isoliert. Die cDNA-Synthesen wurden mit dem *Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für eine anschließende RT-PCR wurden 2 μ l des cDNA-Synthese-Ansatzes eingesetzt und mit *Expand Long Template* in 35 Zyklen amplifiziert.

5.2.3.15. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

PCR-Ansatz (50 μ l):

<i>template</i> DNA	10 – 100 ng
Puffer (10 x)	5 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	5 μ l

<i>primer</i> (30 pM)	jeweils 0,5 μ l
Enzym	1 μ l
H ₂ O (bidest.)	ad 50 μ l

Es wurden sowohl Taq-Polymerase und *Pfu Turbo Hotstart*, als auch *Expand High Fidelity* und *Expand Long Template* als Enzyme verwendet. Die Wahl der Polymerase hing von der geplanten Weiterverwendung und damit nötigen Genauigkeit, sowie von der Länge der PCR-Produkte ab.

PCR-Ablauf, 30 Zyklen:

Erste Denaturierung	2 min	94 °C	30 Zyklen
Denaturierung	45 s	94 °C	
Hybridisierung	45 s	T_m der <i>primer</i>	
Synthese	1 min/kb	72 °C	
Letzte Synthese	2 min	72 °C	

5.2.3.16. Verwendete DNA-Oligonukleotide/*primer*

Bezeichnung	Länge (Nt)	Sequenz 5' → 3'	T_m (°C)
3UTR-N Notfw	48	TGCTTTGCTGCCTAGCGGCCGCTGAGATCATACG AGGCTTCAAGGTAC	56
5UTR-N Notrv	45	TCGTATGATCTCAGCGGCCGCTAGGCAGCAAAGC AAAGGGTCTGG	58
AgeNfw	42	AAACCCACCGGTGCCACCATGGCCGGGTTGTTGA GCACCTTC	> 75
AgePC'(-)fw	40	ACTACTACCGGTGCCACCATGGATCAAGACGCCT TCATTC	75
dNPd2-77rv	47	ACCTGATCGATTATCTTGGGTCGACATGCGGTAA GTGTAGCCGAAGC	> 75
F-4871	20	AGCATATATCCAGAGGTCAC	58
IntrAfw	23	CAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCG	60
IREsrv	25	AAGCGGCTTCGGCCAGTAACGTTAG	66
ld-25	21	TGGAATATATAATGAAGTCAG	50
L-14668	19	AGACCTTACCATCAAGCAC	56
M13R	20	GGATAACAATTCACACAGG	56
M13R2	19	GGAAACAGCTATGACCATG	56

M-3872	18	GGGAGCGTATCTGACTTG	56
N-578	17	CCCTGACACACTCCTTC	54
N-1012	18	GCCTCATAGACACCTACC	56
N-1029(+)	18	GGTAGGTGTCTATGAGGC	56
Nd472-91fw	36	TAGAGGAGGAAACCCAAGAGGATTCTGCAACCC ATG	72
Nd472-91rv	34	CAGAATCCTCTTGGGTTTCCTCCTCTAACCGTTC	71
NotN471stop_rv	42	TACTACGCGGCCGCTTAGGTTTCCTCCTCTAACCG TTCAGCC	> 75
NotNfw	42	AAACCCGCGGCCGCCACCATGGCCGGGTTGTTGA GCACCTTC	> 75
NotNrv	41	TACTACGCGGCCGCTTACTAGATTCCTCCTATCCC AGCTAC	> 75
NotPrv	41	ATCATCGCGGCCGCTTACTAGTTGGTCAGTGACT CTATGTC	> 75
P1831	18	TACACTTACCCCATGGAT	48
P-2201	17	GGTACAAACTCTGTATC	48
P-2246(+)	21	CCGGAGTCTCCTCCATCGCCC	72
P2745 Sph(+)	36	ATCATCGCATGCTTGGCTGGACAATCTGAGACAG AG	72
P-2960(+)	18	CCGCATACATTGAATGTC	52
pcMCSfw	76	AAGCGAATTCACCGGTCTAGAGCGGCCGCTCGAG ATA TCGGATCCCAGACATGATAAGATACATTGATGAG TTTGG	> 75
pcS40rv	44	AAGCCCCACTACGTGCTAGCCTGTGGAATGTGTG TCAGTTAGGG	> 75
proSVrv	23	TTTCCACACCCTAACTGACACAC	61
SP6	18	ATTTAGGTGACACTATAG	48
T7	20	TAATACGACTCACTATAGGG	56
WPRErv	24	TCCACATAGCGTAAAAGGAGCAAC	61

Die Bezeichnung der *primer*, die komplementär zu Sequenzen aus dem SeV-Genom sind, leitet sich von der entsprechenden Region des Genoms ab (*leader* oder jeweiliges Gen), und von der

Anfangsposition im viralen Genom. Ein (+) in der Bezeichnung weist auf die reverse Orientierung des *primers* zur genomischen RNA hin.

5.2.3.17. Reinigung von PCR-Produkten

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

5.2.3.18. Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden in der *Core Facility* des MPI für Biochemie oder bei der Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt. Es wurden fertig editierte DNA-Sequenzen und die dazugehörigen Elektropherogramme geliefert.

5.2.4. Proteinchemische Methoden

5.2.4.1. Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen

Die infizierten Zellen werden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Zellyse im 12-*well* durch Zugabe von 300 µl kalten RIPA-Puffer. Nach kurzem vorsichtigem Resuspendieren wurde das Lysat in ein ERG überführt und direkt auf Eis gelagert.

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

RIPA-Puffer:

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

5.2.4.2. Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der isolierten Proben wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay-Kits (Novagen) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Proben wurden mit dem ELISA-*Reader* MR7000 (Dynatech) ausgewertet.

5.2.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

Sammelgel, 5 %:

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

Trenngel, 10 %:

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

Elektrophoresepuffer:

25	mM	Tris
150	mM	Glycin
0,1	%	SDS

Proteinprobenpuffer (2 x):

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

5.2.4.4. Western Blot

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

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

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

Transferpuffer:

20 mM Tris/HCl, pH 8,7

150 mM Glycin

5.2.4.5. Immunologischer Nachweis von Proteinen

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

Rotiblock-Lösung:

10 x-Konzentrat mit H₂O 1:10 verdünnen

TBST-Puffer:

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

ECL-Mix:

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

5.2.5. Computerprogramme

Zur analytischen Bearbeitung von Nukleinsäuresequenzen wurde das Programm DNA-Star (DNA-Star) verwendet.

Um Elektropherogramme von Sequenzierreaktionen lesen zu können, wurde das Programm Chromas (www.technelysium.com.au/chromas.html) verwendet.

Für die Anfertigung von Digitalbildern der Zellkultur wurde das Programm analySIS der Firma Soft Imaging System verwendet.

5.2.6. Sicherheitsbestimmungen

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

6. Literaturverzeichnis

- Bergmann, C. C., Tong, L., Cua, R., Sensintaffar, J. & Stohlman, S. (1994). Differential effects of flanking residues on presentation of epitopes from chimeric peptides. *J Virol* **68**, 5306-10.
- Bitzer, M., Armeanu, S., Prinz, F., Ungerechts, G., Wybranietz, W., Spiegel, M., Bernlohr, C., Cecconi, F., Gregor, M., Neubert, W. J., Schulze-Osthoff, K. & Lauer, U. M. (2002). Caspase-8 and Apaf-1-independent caspase-9 activation in Sendai virus-infected cells. *J Biol Chem* **277**, 29817-24.
- Bitzer, M., Prinz, F., Bauer, M., Spiegel, M., Neubert, W. J., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. & Lauer, U. (1999). Sendai virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (FLICE) and caspase-3 (CPP32). *J Virol* **73**, 702-8.
- 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**, 210-7.
- Blumberg, B. M., Rose, K., Simona, M. G., Roux, L., Giorgi, C. & Kolakofsky, D. (1984). Analysis of the Sendai virus M gene and protein. *J Virol* **52**, 656-63.
- Buchholz, C. J., Retzler, C., Homann, H. E. & Neubert, W. J. (1994). The carboxy-terminal domain of Sendai virus nucleocapsid protein is involved in complex formation between phosphoprotein and nucleocapsid-like particles. *Virology* **204**, 770-6.
- Buchholz, C. J., Spohner, D., Drillien, R., Neubert, W. J. & Homann, H. E. (1993). The conserved N-terminal region of Sendai virus nucleocapsid protein NP is required for nucleocapsid assembly. *J Virol* **67**, 5803-12.
- Byrne, J. A. & Oldstone, M. B. (1984). Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J Virol* **51**, 682-6.
- Calain, P. & Roux, L. (1993). The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* **67**, 4822-30.
- Carthy, C. M., Granville, D. J., Watson, K. A., Anderson, D. R., Wilson, J. E., Yang, D., Hunt, D. W. & McManus, B. M. (1998). Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J Virol* **72**, 7669-75.
- Cevik, B., Kaesberg, J., Smallwood, S., Feller, J. A. & Moyer, S. A. (2004). Mapping the phosphoprotein binding site on Sendai virus NP protein assembled into nucleocapsids. *Virology* **325**, 216-24.
- Chandrika, R., Horikami, S. M., Smallwood, S. & Moyer, S. A. (1995). Mutations in conserved domain I of the Sendai virus L polymerase protein uncouple transcription and replication. *Virology* **213**, 352-63.
- Chanock, R. M. & Johnson, K. M. (1964). Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases. In *Parainfluenza Viruses*, pp. 480 - 486. New York: American Public Health Association.
- Cole, G. A., Hogg, T. L. & Woodland, D. L. (1994). The MHC class I-restricted T cell response to Sendai virus infection in C57BL/6 mice: a single immunodominant epitope elicits an extremely diverse repertoire of T cells. *Int Immunol* **6**, 1767-75.

- Curran, J. (1996). Reexamination of the Sendai virus P protein domains required for RNA synthesis: a possible supplemental role for the P protein. *Virology* **221**, 130-40.
- Curran, J., Homann, H., Buchholz, C., Rochat, S., Neubert, W. & Kolakofsky, D. (1993). The hypervariable C-terminal tail of the Sendai paramyxovirus nucleocapsid protein is required for template function but not for RNA encapsidation. *J Virol* **67**, 4358-64.
- Curran, J. & Kolakofsky, D. (1988). Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C mRNA. *Embo J* **7**, 245-51.
- Curran, J. & Kolakofsky, D. (1989). Scanning independent ribosomal initiation of the Sendai virus Y proteins in vitro and in vivo. *Embo J* **8**, 521-6.
- Curran, J., Marq, J. B. & Kolakofsky, D. (1992). The Sendai virus nonstructural C proteins specifically inhibit viral mRNA synthesis. *Virology* **189**, 647-56.
- Curran, J., Marq, J. B. & Kolakofsky, D. (1995). An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J Virol* **69**, 849-55.
- Doms, R. W., Lamb, R. A., Rose, J. K. & Helenius, A. (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**, 545-62.
- Egger, L., Schneider, J., Rheme, C., Tapernoux, M., Hacki, J. & Borner, C. (2003). Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell Death Differ* **10**, 1188-203.
- Eisenlohr, L. C., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. (1992). Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **175**, 481-7.
- Ferrari, S., Griesenbach, U., Shiraki-Iida, T., Shu, T., Hironaka, T., Hou, X., Williams, J., Zhu, J., Jeffery, P. K., Geddes, D. M., Hasegawa, M. & Alton, E. W. (2004). A defective nontransmissible recombinant Sendai virus mediates efficient gene transfer to airway epithelium in vivo. *Gene Ther* **11**, 1659-64.
- Fischer, S. (1998). Herstellung von Verpackungszelllinien zur Trans-Komplementation der drei viralen Hüllproteine bei der Erzeugung rekombinanter replikationsdefizienter Sendai-Viren. Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Forch, P. & Valcarcel, J. (2001). Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1. *Apoptosis* **6**, 463-8.
- Fujii, Y., Kiyotani, K., Yoshida, T. & Sakaguchi, T. (2001). Conserved and non-conserved regions in the Sendai virus genome: evolution of a gene possessing overlapping reading frames. *Virus Genes* **22**, 47-52.
- Fujii, Y., Sakaguchi, T., Kiyotani, K., Huang, C., Fukuhara, N. & Yoshida, T. (2002). Identification of mutations associated with attenuation of virulence of a field Sendai virus isolate by egg passage. *Virus Genes* **25**, 189-93.
- Galvan, V., Brandimarti, R. & Roizman, B. (1999). Herpes simplex virus 1 blocks caspase-3-independent and caspase-dependent pathways to cell death. *J Virol* **73**, 3219-26.

- Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curran, J. & Kolakofsky, D. (1995). A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *Embo J* **14**, 6087-94.
- Garcin, D., Taylor, G., Tanebayashi, K., Compans, R. & Kolakofsky, D. (1998). The short Sendai virus leader region controls induction of programmed cell death. *Virology* **243**, 340-53.
- Glazier, K., Raghow, R. & Kingsbury, D. W. (1977). Regulation of Sendai virus transcription: evidence for a single promoter in vivo. *J Virol* **21**, 863-71.
- Gueydan, C., Droogmans, L., Chalon, P., Huez, G., Caput, D. & Kruys, V. (1999). Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor alpha mRNA. *J Biol Chem* **274**, 2322-6.
- Gupta, A. K., Shaji, D. & Banerjee, A. K. (2003). Identification of a novel tripartite complex involved in replication of vesicular stomatitis virus genome RNA. *J Virol* **77**, 732-8.
- 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**, 3829-41.
- He, B. & Lamb, R. A. (1999). Effect of inserting paramyxovirus simian virus 5 gene junctions at the HN/L gene junction: analysis of accumulation of mRNAs transcribed from rescued viable viruses. *J Virol* **73**, 6228-34.
- Heggeness, M. H., Scheid, A. & Choppin, P. W. (1981). the relationship of conformational changes in the Sendai virus nucleocapsid to proteolytic cleavage of the NP polypeptide. *Virology* **114**, 555-62.
- Heminaway, B. R., Yang, Y., Tanaka, Y., Panin, M., Huang, Y. T. & Galinski, M. S. (1995). Role of basic residues in the proteolytic activation of Sendai virus fusion glycoprotein. *Virus Res* **36**, 15-35.
- Homann, H. E., Hofschneider, P. H. & Neubert, W. J. (1990). Sendai virus gene expression in lytically and persistently infected cells. *Virology* **177**, 131-40.
- Homann, H. E., Willenbrink, W., Buchholz, C. J. & Neubert, W. J. (1991). Sendai virus protein-protein interactions studied by a protein-blotting protein-overlay technique: mapping of domains on NP protein required for binding to P protein. *J Virol* **65**, 1304-9.
- Horikami, S. M., Curran, J., Kolakofsky, D. & Moyer, S. A. (1992). Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* **66**, 4901-8.
- Horikami, S. M., Smallwood, S. & Moyer, S. A. (1996). The Sendai virus V protein interacts with the NP protein to regulate viral genome RNA replication. *Virology* **222**, 383-90.
- Iseni, F., Garcin, D., Nishio, M., Kedersha, N., Anderson, P. & Kolakofsky, D. (2002). Sendai virus trailer RNA binds TIAR, a cellular protein involved in virus-induced apoptosis. *Embo J* **21**, 5141-50.
- Itoh, M., Isegawa, Y., Hotta, H. & Homma, M. (1997). Isolation of an avirulent mutant of Sendai virus with two amino acid mutations from a highly virulent field strain through adaptation to LLC-MK2 cells. *J Gen Virol* **78**, 3207-15.

- Jensen, K. E., Minuse, E. & Ackermann, W. W. (1955). Serologic evidence of American experience with newborn pneumonitis virus (type Sendai). *J Immunol* **75**, 71-7.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G. & Penninger, J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-54.
- Kast, W. M., Bronkhorst, A. M., de Waal, L. P. & Melief, C. J. (1986). Cooperation between cytotoxic and helper T lymphocytes in protection against lethal Sendai virus infection. Protection by T cells is MHC-restricted and MHC-regulated; a model for MHC-disease associations. *J Exp Med* **164**, 723-38.
- Kast, W. M., Roux, L., Curren, J., Blom, H. J., Voordouw, A. C., Meloen, R. H., Kolakofsky, D. & Melief, C. J. (1991). Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2283-7.
- Kato, A., Kiyotani, K., Hasan, M. K., Shioda, T., Sakai, Y., Yoshida, T. & Nagai, Y. (1999). Sendai virus gene start signals are not equivalent in reinitiation capacity: moderation at the fusion protein gene. *J Virol* **73**, 9237-46.
- Kingsbury, D. W. & Darlington, R. W. (1968). Isolation and properties of Newcastle disease virus nucleocapsid. *J Virol* **2**, 248-55.
- Klenk, H. D. & Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* **2**, 39-43.
- Kolakofsky, D., Le Mercier, P., Iseni, F. & Garcin, D. (2004). Viral DNA polymerase scanning and the gymnastics of Sendai virus RNA synthesis. *Virology* **318**, 463-73.
- Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curran, J. & Roux, L. (1998). Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol* **72**, 891-9.
- Kuroya, M., Ishida, N. & Shiratori, T. (1953). Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. The isolation of a new virus. *Tohoku J Exp Med* **58**, 62.
- Lam, K. M. (1996). Newcastle disease virus-induced apoptosis in the peripheral blood mononuclear cells of chickens. *J Comp Pathol* **114**, 63-71.
- Lamb, R. A. & Kolakofsky, D. (2001). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In *Fields virology*, 4 edn, pp. 1305 - 1340. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lamb, R. A., Mahy, B. W. & Choppin, P. W. (1976). The synthesis of sendai virus polypeptides in infected cells. *Virology* **69**, 116-31.
- Leppert, M., Kort, L. & Kolakofsky, D. (1977). Further characterization of Sendai virus DI-RNAs: a model for their generation. *Cell* **12**, 539-52.
- Leyrer, S., Neubert, W. J. & Sedlmeier, R. (1998). Rapid and efficient recovery of Sendai virus from cDNA: factors influencing recombinant virus rescue. *J Virol Methods* **75**, 47-58.

- Li, W., Li, Y., Kedersha, N., Anderson, P., Emara, M., Swiderek, K. M., Moreno, G. T. & Brinton, M. A. (2002). Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J Virol* **76**, 11989-2000.
- Lin, Y. L. & Askonas, B. A. (1981). Biological properties of an influenza A virus-specific killer T cell clone. Inhibition of virus replication in vivo and induction of delayed-type hypersensitivity reactions. *J Exp Med* **154**, 225-34.
- Modrow, S., Falke, D. & Truyen, U. (2003). *Molekulare Virologie*, 2 edn. Heidelberg - Berlin: Spektrum Verlag.
- Myers, T. M. & Moyer, S. A. (1997). An amino-terminal domain of the Sendai virus nucleocapsid protein is required for template function in viral RNA synthesis. *J Virol* **71**, 918-24.
- Myers, T. M., Smallwood, S. & Moyer, S. A. (1999). Identification of nucleocapsid protein residues required for Sendai virus nucleocapsid formation and genome replication. *J Gen Virol* **80 (Pt 6)**, 1383-91.
- O'Donnell D, R., Milligan, L. & Stark, J. M. (1999). Induction of CD95 (Fas) and apoptosis in respiratory epithelial cell cultures following respiratory syncytial virus infection. *Virology* **257**, 198-207.
- Ohuchi, M. & Homma, M. (1976). Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. IV. Evidence for activation of sendai virus by cleavage of a glycoprotein. *J Virol* **18**, 1147-50.
- Perrault, J. (1981). Origin and replication of defective interfering particles. *Curr Top Microbiol Immunol* **93**, 151-207.
- Piecyk, M., Wax, S., Beck, A. R., Kedersha, N., Gupta, M., Maritim, B., Chen, S., Gueydan, C., Kruys, V., Streuli, M. & Anderson, P. (2000). TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *Embo J* **19**, 4154-63.
- Popa, I., Harris, M. E., Donello, J. E. & Hope, T. J. (2002). CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element. *Mol Cell Biol* **22**, 2057-67.
- Portner, A. & Kingsbury, D. W. (1976). Regulatory events in the synthesis of Sendai virus polypeptides and their assembly into virions. *Virology* **73**, 79-88.
- Roumier, T., Vieira, H. L., Castedo, M., Ferri, K. F., Boya, P., Andreau, K., Druillenec, S., Joza, N., Penninger, J. M., Roques, B. & Kroemer, G. (2002). The C-terminal moiety of HIV-1 Vpr induces cell death via a caspase-independent mitochondrial pathway. *Cell Death Differ* **9**, 1212-9.
- Roux, L. & Waldvogel, F. A. (1981). Establishment of Sendai virus persistent infection: biochemical analysis of the early phase of a standard plus defective interfering virus infection of BHK cells. *Virology* **112**, 400-10.
- Rozenblatt, S., Koch, T., Pinhasi, O. & Bratosin, S. (1979). Infective substructures of measles virus from acutely and persistently infected cells. *J Virol* **32**, 329-33.
- Sakaguchi, T., Kiyotani, K., Sakaki, M., Fujii, Y. & Yoshida, T. (1994). A field isolate of Sendai virus: its high virulence to mice and genetic divergence from prototype strains. *Arch Virol* **135**, 159-64.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3 edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanderson, C. M., McQueen, N. L. & Nayak, D. P. (1993). Sendai virus assembly: M protein binds to viral glycoproteins in transit through the secretory pathway. *J Virol* **67**, 651-63.
- Sawadogo, M. & Sentenac, A. (1990). RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Annu Rev Biochem* **59**, 711-54.
- Schlecht, S. (2004). Entwicklung eines anwendungssicheren Vakzine-Prototyps auf Basis replikations-defizienter Sendai-Viren zur simultanen Expression von Antigenen heterologer Viren. München: TU-München.
- Schurig, M. (2005). Etablierung eines helfervirusfreien Systems zur initialen Herstellung rekombinanter Sendai Viren. München: Technische Universität München.
- Servet-Delprat, C., Vidalain, P. O., Azocar, O., Le Deist, F., Fischer, A. & Rabourdin-Combe, C. (2000). Consequences of Fas-mediated human dendritic cell apoptosis induced by measles virus. *J Virol* **74**, 4387-93.
- Sethi, K. K., Omata, Y. & Schneeweis, K. E. (1983). Protection of mice from fatal herpes simplex virus type 1 infection by adoptive transfer of cloned virus-specific and H-2-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* **64 (Pt 2)**, 443-7.
- Shiotani, A., Fukumura, M., Maeda, M., Hou, X., Inoue, M., Kanamori, T., Komaba, S., Washizawa, K., Fujikawa, S., Yamamoto, T., Kadono, C., Watabe, K., Fukuda, H., Saito, K., Sakai, Y., Nagai, Y., Kanzaki, J. & Hasegawa, M. (2001). Skeletal muscle regeneration after insulin-like growth factor I gene transfer by recombinant Sendai virus vector. *Gene Ther* **8**, 1043-50.
- 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 (Pt 5)**, 1031-42.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. & Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-6.
- Takagi, T., Muroya, K., Iwama, M., Shioda, T., Tsukamoto, T. & Mizumoto, K. (1995). In vitro mRNA synthesis by Sendai virus: isolation and characterization of the transcription initiation complex. *J Biochem (Tokyo)* **118**, 390-6.
- Takahashi, T., Ryan, K. W. & Portner, A. (1992). Expression of cDNA encoding the Sendai virus hemagglutinin-neuraminidase gene: characterization of wild-type and mutant gene products. *Virology* **187**, 837-40.
- Tarbouriech, N., Curran, J., Ebel, C., Ruigrok, R. W. & Burmeister, W. P. (2000). On the domain structure and the polymerization state of the sendai virus P protein. *Virology* **266**, 99-109.
- Townsend, A. R., Rothbard, J., Gotch, F. M., Bahadur, G., Wraith, D. & McMichael, A. J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* **44**, 959-68.
- Tropea, F., Troiano, L., Monti, D., Lovato, E., Malorni, W., Rainaldi, G., Mattana, P., Viscomi, G., Ingletti, M. C., Portolani, M. & et al. (1995). Sendai virus and herpes virus type 1 induce apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Cell Res* **218**, 63-70.

- Tuffereau, C. & Roux, L. (1988). Direct adverse effects of Sendai virus DI particles on virus budding and on M protein fate and stability. *Virology* **162**, 417-26.
- Vanags, D. M., Porn-Ares, M. I., Coppola, S., Burgess, D. H. & Orrenius, S. (1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* **271**, 31075-85.
- Vidal, S., Curran, J. & Kolakofsky, D. (1990). A stuttering model for paramyxovirus P mRNA editing. *Embo J* **9**, 2017-22.
- Vidal, S. & Kolakofsky, D. (1989). Modified model for the switch from Sendai virus transcription to replication. *J Virol* **63**, 1951-8.
- Vulliamoz, D. & Roux, L. (2002). Given the opportunity, the Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase could as well enter its template internally. *J Virol* **76**, 7987-95.
- Waterson, A. P. (1962). Two kinds of myxovirus. *Nature* **193**, 1163-4.
- Wiegand, M. (2003). Herstellung und Charakterisierung von Sendai-Virus-Mutanten mit vermindertem zytopathischen Effekt. München: TU-München.
- Wiegand, M., Bossow, S. & Neubert, W. J. (2005). Sendai virus trailer RNA simultaneously blocks two apoptosis-inducing mechanisms in a cell type-dependent manner. *J Gen Virol* **86**, 2305-14.
- Willenbrink, W. (1991). Herstellung und Charakterisierung von Sendai Virus NP- und P-Protein exprimierenden Helferzellen. München: Ludwigs-Maximilians-Universität.
- Willenbrink, W. & Neubert, W. J. (1994). Long-term replication of Sendai virus defective interfering particle nucleocapsids in stable helper cell lines. *J Virol* **68**, 8413-7.
- Wolf, B. B., Goldstein, J. C., Stennicke, H. R., Beere, H., Amarante-Mendes, G. P., Salvesen, G. S. & Green, D. R. (1999). Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood* **94**, 1683-92.
- Xu, Z. L., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T. & Hayakawa, T. (2001). Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* **272**, 149-56.
- Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. (1992). Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv Immunol* **52**, 1-123.
- Yonemitsu, Y., Kitson, C., Ferrari, S., Farley, R., Griesenbach, U., Judd, D., Steel, R., Scheid, P., Zhu, J., Jeffery, P. K., Kato, A., Hasan, M. K., Nagai, Y., Masaki, I., Fukumura, M., Hasegawa, M., Geddes, D. M. & Alton, E. W. (2000). Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol* **18**, 970-3.
- Zou, A., Atencio, I., Huang, W. M., Horn, M. & Ramachandra, M. (2004). Overexpression of adenovirus E3-11.6K protein induces cell killing by both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Virology* **326**, 240-9.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AcT	Acetyl-Trypsin
AG	Antigenom
As	Aminosäure
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary</i> DNA
<i>ciu</i>	<i>cell infectious units</i>
CPE	Zytopathischer Effekt
d	Tage
DIP	<i>Defective Interfering Particles</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
d p.i.	<i>days post infection</i>
d p.t.	<i>days post transfection</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
F-Protein	Fusionsprotein
FKS	Fötale Kälberserum
FM	Fluoreszenzmikroskop
g	Gramm/Erdbeschleunigung
<i>goi</i>	<i>gene of interest</i>
h	Stunde
HAD-Test	Hämadsorptionstest
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidaseprotein
h p.i.	<i>hours post infection</i>
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
KID-Test	Kulturinfektionsdosistest
ld	<i>leader</i>
L-Protein	<i>Large</i> -Protein
M	Molar

M-Protein	Matrix-Protein
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
<i>moi</i>	<i>multiplicity of infection</i>
MVA	modifiziertes Vaccinia Virus Ankara
MVA-T7	MVA mit T7-Polymerase
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
NC	Nukleokapsid
N-Protein	Nukleokapsidprotein
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nt	Nukleotid
P-Protein	Phosphoprotein
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>Potentium Hydrogenii</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
Rt	Raumtemperatur
rVV	rekombinantes Vaccinia Virus
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SeV	Sendai Virus
T _m	Hybridisierungstemperatur
tr	<i>trailer</i>
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
ÜS	Überstand (Zellkulturüberstand)
V	Volt

VP

Viruspartikel

wt

Wildtyp

ZID

Zellinfektionsdosistest

ZR

Zellrasen

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Wolfgang J. Neubert und Herrn Professor Dr. Franz-Peter Fischer am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried), in der Abteilung für Molekulare Virologie angefertigt

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang J. Neubert für die bereitgestellten Mittel, sein großes Interesse an dem erfolgreichen Fortgang dieser Arbeit. Die vielen konstruktiven und motivierenden Gespräche trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Herrn Prof. Franz-Peter Fischer bedanke ich mich sehr herzlich für die Vertretung der Arbeit vor der Technischen Universität München.

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sascha Bossow, der während der Anfertigung dieser Arbeit ein hervorragender Kollege war. Seine technische und fachliche Unterstützung sowie der konstante wissenschaftliche Austausch waren während der Anfertigung dieser Arbeit eine große Hilfe.

Ein großer Dank gilt auch meinen Arbeitskollegen Frau Christine Baumann, Frau Tsagaan Gantumur, Frau Johanna Lampe, Frau Sabine Schlecht und Herrn Michael Schurig. Alle trugen stets zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre bei und waren durch praktische Ratschläge und große Hilfsbereitschaft eine große Unterstützung.

Ein weiterer Dank gilt den Praktikantinnen Frau Johanna Lampe, Frau Konstanze Pechloff und Frau Verena Schünemann. Sie alle haben zeitweise an dieser Arbeit mitgewirkt und mit großer Motivation und Fleiß zu einem erfolgreichen Fortgang beigetragen.