

**Entwicklung eines Komponenten-Impfstoffs
gegen das humane respiratorische
Syncytialvirus (HRSV)**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Brigitte Voges

geboren am 06.11.1973 in Langenhagen

2003

Referent: Prof. Dr. G. Herrler

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Tag der Promotion: 28.11.2003

Für meine große und laute Familie

... Feierabend!

Abstract

Human respiratory syncytial virus is a major cause of lower respiratory tract diseases in infants. Currently there is no licensed vaccine available. The fusion protein (F) is the main target of the protective immune response to respiratory syncytial virus infections. During viral replication proteolytic processing of the RSV fusion protein results in the generation of two disulfide-linked subunits F1 and F2 and in the release of a 27 aa peptide (pep27). This peptide is originally located between two furin cleavage sites. The function of this peptide has not been defined so far, but in analogy to BRSV it may have bioactivity.

We have analysed several peptides derived from the fusion protein for their ability to induce the production of neutralising antibodies against RSV. In order to elicit a strong immune response, the peptides were incorporated into the capsid protein of the bacteriophage T7. The capsid shell of the phage is composed entirely of the capsid protein, displaying 415 copies of the peptide on the surface. The modified phages were used to immunise mice. Some of the recombinant phages elicited a low amount of HRSV-neutralising antibodies, but they failed to protect against an HRSV challenge infection.

In the second part of this work recombinant Sendai viruses (SeV) were generated which express genes encoding different forms of the RSV fusion protein: (i) the authentic fusion protein, (ii) a soluble form without membrane anchor and cytoplasmic tail, and (iii) a membrane-bound deletion mutant lacking one furin cleavage site and pep27. The genes were expressed separately as additional genes in the recombinant viruses. All three proteins were detectable by Western blot analysis and in immunofluorescence assays using monoclonal antibodies directed against the RSV fusion protein. Mice immunised intranasally with recombinant SeV showed a high amount of HRSV-specific antibodies in their sera, detectable by immunofluorescence assays. Although no or only low amounts of neutralising antibodies were measurable in the sera, all mice were completely protected against an HRSV challenge infection.

recombinant viruses, respiratory syncytial virus, vaccines

Zusammenfassung

Das humane respiratorische Syncytialvirus (HRSV) ist der wichtigste virale Infektionserreger im unteren Respirationstrakt von Kleinkindern und Säuglingen. Zur Zeit gibt es keinen zugelassenen Impfstoff gegen das Virus. Bei einer natürlichen HRSV-Infektion ist das Fusionsprotein (F-Protein) das Hauptziel der protektiven Immunantwort. Das F-Protein wird während der Replikation als Vorläuferprotein F_0 synthetisiert, und während des Transportes durch das Trans-Golgi-Netzwerk wird F_0 proteolytisch in die beiden Untereinheiten F_1 und F_2 gespalten. Durch diese Spaltung wird ein 27 AS langes Peptid aus dem Vorläuferprotein entfernt, dessen Funktion noch unklar ist.

In zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen wurden Impfstoff-Kandidaten auf der Basis des F-Proteins entwickelt.

In einem ersten Ansatz (Totimpfstoff) wurden Peptide des RSV-F-Proteins auf ihre Fähigkeit untersucht, im Mausmodell die Bildung neutralisierender Antikörper zu induzieren und die Tiere vor einer anschließenden HRSV-Infektion zu schützen. Da Peptide alleine nur schwach immunogen wirken, wurden sie in das Kapsidprotein des T7-Phagen eingebaut. Der Kopf des T7-Phagen besteht aus 415 Kopien des Kapsidproteins, so dass auch die eingebauten Peptide in 415 Kopien auf der Partikeloberfläche präsentiert wurden. Mit den modifizierten Phagen wurden Balb/c Mäuse subkutan immunisiert. Einige der rekombinanten Phagen induzierten die Bildung HRSV-neutralisierender Antikörper, aber die immunisierten Tiere zeigten keinen Schutz vor einer anschließenden HRSV-Belastungsinfektion.

In einem zweiten Ansatz wurden Mäuse mit rekombinanten Sendai-Viren (Lebendimpfstoff) immunisiert. Diese Viren enthielten zusätzlich zu den Sendai-Genen, die Gene für: das HRSV-F-Protein, die Ektodomäne des HRSV-F-Proteins oder eine F-Deletionsmutante, der eine Furinspaltstelle und pep27 fehlte. Die Expression aller drei Formen konnte im Western Blot und in einem Immunfluoreszenztest nachgewiesen werden. Nach einer nasalen Immunisierung mit 10^4 PFU der rekombinanten Sendai-Viren konnten in den Seren der immunisierten Tiere, HRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Obwohl diese Antikörper *in vitro* keine nachweisbare Neutralisationseigenschaft zeigten, waren alle Tiere vor einer anschließenden HRSV-Infektion geschützt.

Schlagerworte: virale Vektoren, respiratorisches Syncytialvirus, Impfstoffe

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	15
Tabellenverzeichnis	17
Abkürzungsverzeichnis	19
Aminosäuren und ihre Abkürzungen	21
1. Einleitung	23
1.1 Das humane respiratorische Syncytialvirus (HRSV)	23
1.1.1 Taxonomie	23
1.1.2 Krankheitsbild	25
1.1.3 Virusaufbau und Genomorganisation	26
1.1.4 Epitope auf dem HRSV Fusionsprotein	30
1.2 Der T7-Phage	32
1.2.1 Taxonomie	32
1.2.2 Virusaufbau und Genomorganisation	32
1.2.3 Bakteriophagen als Impfstoffe	37
1.2.4 Das <i>T7SelectTM Phage Display System</i>	38
1.3 Das Sendai-Virus (SeV)	39
1.3.1 Taxonomie	40
1.3.2 Virusaufbau und Genomorganisation	40
1.3.3 Herstellung rekombinanter Sendai-Viren	41
2. Zielsetzung	45
3. Material	47
3.1 Zelllinien	47
3.2 Zellkulturmedien	47
3.3 Viren	48
3.4 Vektoren	48
3.5 Enzyme	48
3.5.1 Restriktionsenzyme	49

3.6	Kits	49
3.7	Primer	49
3.7.1	Primer für die Herstellung rekombinanter T7-Phagen	49
3.7.2	Primer für die Sequenzierung	50
3.8	Peroxidase-Substrate	50
3.9	Antikörper	50
3.9.1	Polyklonal	50
3.9.2	Monoklonal	51
3.10	Marker	51
3.10.1	Agarosegelelektrophorese	51
3.10.2	SDS-PAGE	51
3.11	Sonstiges	52
3.12	Chemikalien	52
3.13	Medien, Puffer, Lösungen	54
3.13.1	Medien für Bakterien, Phagen und Lungenhomogenate	54
3.13.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	55
3.13.3	Western Blot	56
3.13.4	Agarosegelelektrophorese	57
3.13.5	Zell-Lysate	57
3.13.6	SeV-Anzucht	58
3.13.7	Immunfluoreszenz	58
3.13.8	Immunoplaquetest	58
3.13.9	Sonstiges	59
3.14	Geräte und Gebrauchsgegenstände	59
4.	Methoden	63
4.1	Herstellung rekombinanter T7-Phagen	63
4.1.1	Amplifikation der HRSV-F-Epitope mittels PCR	63
4.1.2	Agarosegelelektrophorese	64
4.1.3	Reinigung der PRC-Produkte	64
4.1.4	Restriktionsverdau der PCR-Produkte	64
4.1.5	Restriktionsverdau des T7-Vektors	65

4.1.6	Dephosphorylierung linearer DNA.	66
4.1.7	Ligation.	66
4.1.8	<i>In Vitro</i> Verpackung der T7-DNA	67
4.1.9	Plaque-PCR.	67
4.1.10	Sequenzierung von PCR-Produkten	68
4.2	Zellkulturen.	68
4.2.1	Passagieren von Vero-Zellen	68
4.2.2	Passagieren von HBE-Zellen.	69
4.3	Bakterien.	69
4.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21	69
4.4	Virusanzucht.	69
4.4.1	Anzucht von HRSV	69
4.4.2	Anzucht von rekombinanten Sendai-Viren	70
4.4.3	Anzucht von rekombinanten T7-Bakteriophagen.	70
4.5	Virustitration	71
4.5.1	Bestimmung des HRSV-Titers im Immunoplaquetest	71
4.5.2	Bestimmung des SeV-Titers im Immunoplaquetest.	71
4.5.3	Bestimmung des T7-Titers mittels Plaquetest	72
4.5.4	Hämagglutinationstest	72
4.5.5	Endpunktverdünnungsmethode zur Infektiositätsmessung (Bestimmung einer KID ₅₀)	73
4.6	Virusreinigung.	73
4.6.1	Reinigung rekombinanter Sendai-Viren für die Immunisierung von Mäusen	73
4.6.2	Plaque-Reinigung rekombinanter T7-Phagen	74
4.6.3	Reinigung rekombinanter T7-Phagen mittels Dichtegradienten- zentrifugation.	74
4.7	Allgemeines	75
4.7.1	BCA-Test	75
4.7.2	DNA-Reinigung mittels Phenol-Chloroformextraktion	75
4.7.3	DNA-Fällung.	76
4.7.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	76

4.7.5	Coomassie-Färbung.	77
4.7.6	<i>Semi-dry</i> -Western Blot.	77
4.7.7	Immunchemische Detektion von Proteinen	78
4.7.8	ELISA.	78
4.7.9	Dot Blot	79
4.7.10	Immunfluoreszenztest	79
4.7.11	Präparation von Zell-Lysaten für eine anschließende Western Blot-Analyse.	80
4.7.12	Virusneutralisationstest	81
4.8	Tierversuche.	81
4.8.1	Immunisierung von Balb/c Mäusen mit rekombinanten T7-Phagen.	81
4.8.2	Immunisierung, bzw. Infektion von Mäusen mit rekombinanten Sendai-Viren	83
5.	Ergebnisse	85
5.1	Rekombinante T7-Phagen als HRSV-Impfstoff	85
5.1.1	Auswahl immunogener Epitope des HRSV-Fusionsproteins. .85	
5.1.2	Herstellung rekombinanter T7-Phagen	86
5.1.3	Charakterisierung der rekombinanten Phagen	87
5.1.3.1	Charakterisierung der rekombinanten Phagen im Western Blot	87
5.1.3.2	Charakterisierung der rekombinanten Phagen im Dot Blot	88
5.1.3.3	Charakterisierung der rekombinanten Phagen im ELISA	89
5.1.4	Reinigung der rekombinanten Phagen	90
5.1.5	Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten T7-Phagen . .92	
5.1.5.1	Nachweis T7- und HRSV-spezifischer Antikörper.	92
5.1.5.2	Nachweis HRSV-neutralisierender Antikörper.	94
5.1.5.3	HRSV- <i>Challenge</i>	95
5.2	Rekombinante Sendai-Viren als HRSV-Impfstoff.	96
5.2.1	Herstellung rekombinanter Sendai-Viren.	96

5.2.2	Expression des HRSV-F-Proteins mit Hilfe rekombinanter Sendai-Viren	96
5.2.3	Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Sendai-Viren	102
5.2.3.1	Optimierung der SeV-Dosis	102
5.2.3.2	Immunisierung gegen HRSV	106
5.2.3.3	Immunantwort.	108
5.2.3.4	HRSV- <i>Challenge</i>	111
6.	Diskussion	115
6.1	Klonierung und Stabilität der rekombinanten T7-Phagen.	117
6.2	Charakterisierung der rekombinanten T7-Phagen mit Hilfe monoklonaler Antikörper.	118
6.3	Immunantwort ausgelöst durch rekombinante T7-Phagen.	120
6.4	Unterschiede in der Expression von HRSV-F und HRSV-F-Del-pep27 in den rekombinanten Sendai-Viren	122
6.5	Interpretation des starken Gewichtsverlustes SeV-infizierter Balb/c Mäuse	123
6.6	Schutz vor einer HRSV-Infektion durch Immunisierung mit rekombinanten Sendai-Viren	124
6.7	Ausblick	126
	Literaturverzeichnis.	127
	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.	143

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung eines HRSV-Partikels	26
1.2	Anordnung der Gene auf dem HRSV-Genom	27
1.3	Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung des HRSV-F-Proteins.	28
1.4	Aminosäuresequenz des HRSV-F-Protein.	31
1.5	Schematische Darstellung eines T7-Phage.	34
1.6	Genkarte des Phagen T7.	35
1.7	Schematische Darstellung des Gens 10 im Wildtyp-Virus und im <i>T7Select 415-1</i> -System	39
1.8	Anordnung der Gene auf dem SeV-Genom.	41
1.9	Schematische Darstellung der Herstellung rekombinanter Sendai-Viren im MVA-T7-Helfersystem	42
5.1	Darstellung des chimären Proteins aus gp10 und F-2a im Western Blot, mit Hilfe HRSV-spezifischer monoklonaler Antikörper	88
5.2	Darstellung des F-2a-Peptides auf der Phagenoberfläche	89
5.3	Untersuchung des rekombinanten Phagen T7-F-2a mit unterschiedlichen RSV-spezifischen Antikörpern im ELISA	90
5.4	Darstellung gereinigter Phagen im SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung.	91
5.5	Nachweis T7-spezifischer Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse.	92
5.6	Unterschiedliche Formen des HRSV F-Proteins im Genom rekombinanter Sendai-Viren.	97
5.7	Expression der HRSV-F-Proteine mit Hilfe rekombinanter Sendai-Viren.	98
5.8	Nachweis des löslichen rekombinanten F-Proteins in Überstand infizierter Zellen	98
5.9	Expression der unterschiedlichen Formen des HRSV-F-Proteins	100
5.10	Intrazelluläre Immunfluoreszenz in SeV/HRSV-F-Del-TM-infizierten Zellen	101
5.11	Gewichtskurven der SeV/DsRed-infizierten Mäuse	103
5.12	Nachweis SeV-spezifischer Antikörper in Seren SeV/DsRed-infizierter Mäuse.	104

5.13	Gewichtskurven SeV-Infizierter (10^4 PFU/Dosis) und nicht infizierter 8 Wochen alter Balb/c Mäuse.	105
5.14	Gewichtskurven rSeV-infizierter Balb/c Mäuse, HRSV-Immunsierung . .	106
5.15 a	HRSV-spezifische Antikörper in den Seren rSeV-infizierter Mäuse	109
5.15 b	HRSV-spezifische Antikörper in den Seren rSeV-infizierter Mäuse	110
5.16	Vergleich der Konzentrationen von HRSV- und SeV-spezifischen Antikörpern im Serum SeV/HRSV-F-infizierter Mäuse	112

Tabellenverzeichnis

1.1	Taxonomie der <i>Paramyxoviridae</i>	24
1.2	Taxonomie der Bakteriophagen	33
4.1	Einteilung der verschiedenen T7-Konstrukte in 6 Immunisierungs- Gruppen	72
5.1	Ausgewählte Epitope auf dem RSV-Fusionsprotein.	85
5.2	Sequenzen der rekombinanten T7-Phagen mit fehlerhaften HRSV- Peptiden	87
5.3	HRSV-neutralisierende Antikörper in den Seren von Mäusen, immunisiert mit rekombinanten T7-Phagen	94
5.4	Nachweis einer HRSV-Infektion in Mäusen, immunisiert mit rekombinanten T7-Phagen.	95
5.5	Nachweis einer HRSV-Infektion in Mäusen, immunisiert mit rekombinanten Sendai-Viren.	114

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulfonat(6)]
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
BRSV	Bovines respiratorisches Syncytialvirus
BSA	Bovines Serumalbumin
DABCO	1,4-Diazobicyclo[2.2.2]octane
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EB	<i>Elution Buffer</i> , Elutionspuffer in QIAGEN Kits
ECL	Enzym-Chemolumineszenz
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
gp	Genprodukt
HA	Hämagglutination
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Peroxidase aus Meerrettich
HRSV	humanes respiratorisches Syncytialvirus

HSV	Herpes-simplex-Virus
H ₂ O	Reinstwasser
Ig	Immunglobulin
kDa	kilo-Dalton
KID ₅₀	Kultur infektiöse Dosis 50
mab	<i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
min	Minuten
m. o. i.	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVA	Modifiziertes Vakzinia Virus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSM	PBS ohne Calcium- und Magnesium-Salze
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PFP	<i>purified fusion (F) protein</i>
PFU	<i>plaque forming units</i> , Plaque-bildende Einheiten
PIV	Parainfluenzavirus
RNA	Ribonukleinsäure
r	rekombinant
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecyl-sulfate, Natriumdodecylsulfat
SeV	Sendai Virus
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
VSV	Virus der vesikulären Stomatitis
w / o	<i>without</i>

Aminosäuren und ihre Abkürzungen

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

Das humane respiratorische Syncytialvirus (HRSV) ist der wichtigste virale Infektionserreger im unteren Respirationstrakt von Kleinkindern. Es gibt keinen zugelassenen Impfstoff. In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante T7-Bakteriophagen und rekombinante Sendai-Viren (SeV) auf ihre Eignung als Impfstoff-Kandidaten untersucht.

1.1 Das humane respiratorische Syncytialvirus (HRSV)

Erstmals beschrieben wurde das respiratorische Syncytialvirus 1956. Es wurde aus Schimpansen mit schweren Erkrankungen der oberen Atemwege isoliert, und man bezeichnete es als *chimpanzee coryza agent* (Morris, et al. 1956). Ein solches Virus wurde ein Jahr später von Chanock *et al.* (1957) bei Menschen nachgewiesen und als respiratorisches Syncytialvirus (RSV) bezeichnet. Seinen Namen erhielt das Virus aufgrund seiner Eigenschaft, *in vitro* die Bildung mehrkerniger Riesenzellen, sogenannter Syncytien, zu verursachen.

Neben dem humanen RSV gibt es auch ein bovines RSV (BRSV). Beide Viren sind sich in Genom-Sequenz und Ausprägung der Krankheitssymptome sehr ähnlich. Die einzelnen HRSV-Stämme werden in 2 Subtypen (A und B) unterteilt, die sich vor allem in der Sequenz ihrer Glykoproteine (G-Proteine) unterscheiden.

1.1.1 Taxonomie

RSV gehört zur Familie *Paramyxoviridae*. Diese wird in zwei Unterfamilien eingeteilt: die *Paramyxovirinae* und die *Pneumovirinae*. Erstere umfasst die Genera *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Avulavirus*, *Morbillivirus* und *Henipavirus*. *Respiro-*, *Rubula-* und *Avulavirus* haben Neuraminidaseaktivität und können Erythrozyten agglutinieren. Morbilliviren besitzen ebenso die Fähigkeit zur Hämagglutination, sie verfügen jedoch über keine Neuraminidase. Die Unterfamilie *Pneumovirinae* umfasst zwei weitere Genera: *Pneumovirus* und *Metapneumovirus*. Zu den Pneumoviren gehört das respiratorische Syncytialvirus. Zu den Metapneumoviren zählt das humane Metapneumovirus, das erst im Jahre 2001 in den Niederlanden aus Kindern mit Atemwegserkrankungen isoliert wurde (Hoogen et al., 2001). Pneumoviren weisen weder Hämagglutinations- noch Neuraminidaseaktivität auf.

Zusammen mit den Familien *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* und *Bornaviridae* bilden die *Paramyxoviridae* die Ordnung *Mononegavirales*. Bei allen Vertretern handelt es sich um Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom mit negativer Polarität. Die Taxonomie der *Paramyxoviridae* ist in Tab. 1.1 dargestellt.

Unterfamilie	Genus	Erreger, Bsp.
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	Sendai-Virus (SeV)
		(= murines Parainfluenzavirus Typ 1)
		humanes Parainfluenzavirus Typ 1 und 3 bovines Parainfluenzavirus Typ 3
	<i>Rubulavirus</i>	Mumpsvirus
		humanes Parainfluenzavirus Typ 2 u. 4a, b
		canines Parainfluenzavirus Typ 2
	<i>Avulavirus</i>	Newcastle-Disease-Virus
		Vogelparamyxoviren Typen 2-9
	<i>Morbillivirus</i>	Masernvirus
		Hundestaupavirus
phocine Staupeviren (Robbenstaupen)		
Rinderpestvirus		
Peste-des-Pestis-Ruminants-Virus (PPRV)		
<i>Henipavirus</i>	Hendravirus (Mensch, Pferd)	
	Menanglevirus (Schwein)	
	Nipahvirus (Mensch, Hund, Schwein)	
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	HRSV
		BRSV
	<i>Metapneumovirus</i>	humanes Metapneumovirus Rhinotracheitisvirus der Pute

Tabelle 1.1: Taxonomie der *Paramyxoviridae*.

1.1.2 Krankheitsbild

Bei Säuglingen und Kleinkindern ist das humane respiratorische Syncytialvirus der wichtigste virale Infektionserreger im unteren Respirationstrakt. Säuglinge im Alter zwischen sechs Wochen und einem halben Jahr sind besonders gefährdet. Bei Kindern, die einer Risikogruppe angehören, wie z.B. Kinder mit bronchopulmonaler Dysplasie oder Herzfehlern, kann eine HRSV-Infektion lebensbedrohlich verlaufen. In den USA zählt man jährlich 85.000-144.000 hospitalisierte Kinder im Alter von unter einem Jahr (Shay et al., 1999). Über 80% aller Kinder besitzen bereits im Alter von vier Jahren Antikörper gegen das Virus.

Die Infektion mit HRSV beschränkt sich auf die Wintermonate und ist hochansteckend. Man findet bis zu 10^6 infektiöse Viruspartikel in einem Milliliter Speichel (Modrow und Falke, 2003). Die Inkubationszeit beträgt ca. 3-5 Tage. Die Erkrankung äußert sich durch grippale Infekte mit Fieber und Schnupfen. Häufig kommt es zu einer Entzündung der Rachen- (Pharyngitis) und Luftröhrenschleimhäute (Trachitis), sowie der Bronchien. Bis zu 40% der erkrankten Kinder entwickeln eine Bronchitis mit Cyanose und Lungenentzündung. Durch bakterielle Überinfektionen kann es zusätzlich zu Mittelohrentzündungen kommen. Schwere Erkrankungsformen sind häufig anzutreffen, wenn die Infektion in den ersten 6 Lebensmonaten stattfindet.

Eine HRSV-Infektion löst nur eine unzureichende Immunantwort aus. Bei allen Infizierten kann es zu Reinfektionen mit leichteren Erkrankungsformen kommen. Neben seiner Bedeutung in der Pädiatrie spielt HRSV auch bei älteren Menschen und bei Patienten nach Knochenmarkstransplantationen eine wichtige Rolle (Falsey et al., 1995; Whimbey et al., 1996).

Zur Zeit ist kein zugelassener Impfstoff gegen HRSV auf dem Markt. Es besteht besondere Sorgfaltspflicht, seit 1966 ein Totimpfstoff zugelassen wurde, bei dem die Viren mit Formalin inaktiviert worden waren. Dieser Totimpfstoff hatte nicht nur keinen ausreichenden Infektionsschutz, da das immunologisch wichtige Fusionsprotein durch die chemische Behandlung zerstört worden war, sondern bei nachfolgenden HRSV-Infektionen kam es sogar zu verstärkten Krankheitssymptomen und Todesfällen unter den immunisierten Kindern (Kapikian et al., 1969; Kim et al., 1969).

Die klinische Therapie der Patienten umfasst eine erhöhte Sauerstoffzufuhr. Bei Kindern mit einem besonders hohen Infektionsrisiko, z.B. bei früh geborenen

Kindern, kann im Winterhalbjahr eine monatliche passive Immunisierung mit einem humanisierten monoklonalen Antikörper erfolgen (Johnson et al., 1997; The IMPact-RSV Study Group, 1998).

1.1.3 Virusaufbau und Genomorganisation

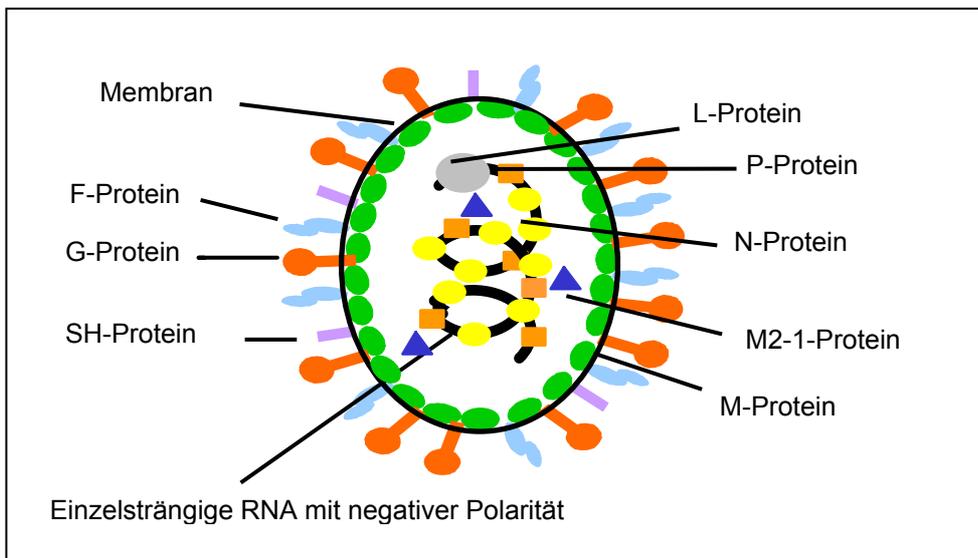


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines HRSV-Partikels.

Die infektiösen Viruspartikel (siehe Abb. 1.1) haben eine überwiegend sphärische Gestalt mit einem Durchmesser von ca. 150-300 nm. Gelegentlich finden sich auch filamentöse Formen mit einem Durchmesser von 60-100 nm und einer Länge von bis zu 10 µm (Collins et al., 2001).

Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit negativer Polarität (Huang und Wertz, 1982). Es hat eine Länge von 15.222 Basen und codiert für 9 Strukturproteine und die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2. Die Nichtstrukturproteine von BRSV wirken als Antagonisten gegen die alpha-/beta-Interferon-induzierte antivirale Immunantwort (Schlender et al., 2000).

Am 3'-Ende des Genoms befindet sich eine kurze als *Leader* bezeichnete Sequenzfolge, die zwar transkribiert wird, jedoch nicht für Aminosäuren codiert. Am 5'-Ende befindet sich ein nichttranskribierter Bereich, der als *Trailer* bezeichnet wird. Auch zwischen den einzelnen Genen befinden sich kurze, nichttranskribierte Sequenzfolgen (*intergenische Nukleotide*). An den Start- und Endpunkten der Gene

finden sich konservierte Sequenzfolgen, die für die geordnete Transkription der Genomabschnitte sorgen (Collins et al., 1986; Kuo et al. 1996/1997). Die Anordnung der Gene auf der Nukleinsäure ist in Abb. 1.2 dargestellt.

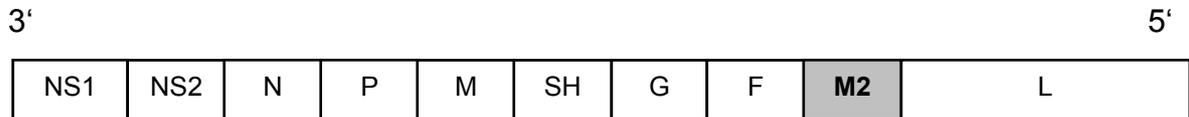


Abbildung 1.2: Anordnung der Gene auf dem HRSV-Genom.

Die M2 mRNA codiert für zwei überlappende offene Leseramen: M2-1 und M2-2 (Collins et al., 1990). NS1/NS2 = Nichtstrukturproteine, N = Nukleoprotein, P = Phosphoprotein, M = Matrixprotein, SH = *small hydrophobic protein*, G = Glykoprotein, F = Fusionsprotein, L = *large* Protein

Das Genom liegt im Komplex mit den N-, P-, M2-1- und L-Proteinen als helikales Nukleokapsid vor (Collins et al., 2001).

Das Nukleokapsidprotein N ist eng mit dem Genom assoziiert, dient zur Stabilisierung und schützt das Genom vor der Zerstörung durch Nukleasen. Ein N-Protein bindet 6 Basen. Es ist enzymatisch nicht aktiv. Ist die RNA jedoch nicht durch das N-Protein „verpackt“, kann sie durch die P- und L-Proteine nicht transkribiert werden. Das N-Protein hat ein Molekulargewicht von 43 kDa (Collins et al., 2001).

Das L-Protein (L=*large*) besitzt die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase und ist mit einem Molekulargewicht von 250 kDa das größte der RSV-Strukturproteine (Collins et al., 2001). Vermutlich ist es auch als Proteinkinase an der Phosphorylierung der P- und N-Proteine beteiligt. Die Sequenz der L-Proteine ist bei allen Paramyxoviren in hohem Maße konserviert.

Das Phosphoprotein P hat eine Größe von 27 kDa, und es ergänzt die Polymeraseaktivität des L-Proteins (Barik et al., 1995; Dupuy et al., 1999). Das P-Protein bindet an L- und N-Protein, und der Komplex aus L- und P-Protein ist verantwortlich für *Capping*- und Methylierungsreaktionen an den 5'-Enden der mRNA Moleküle und für die 3'-Polyadenylierung (Collins et al., 2001).

Das M2-1 Protein (22 kDa) weist ein Zi^{2+} -Ionen bindendes Motiv auf (Hardy und Wertz, 2000). Es wirkt als Antiterminator bei der viralen Transkription (Fearn und Collins, 1999; Hardy et al., 1999; Hardy und Wertz, 1998).

Das Nukleokapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, in die 3 Glykoproteine eingelagert sind: das SH-Protein (SH = *small hydrophobic*), das Fusionsprotein (F-Protein) und das Glykoprotein (G-Protein).

Die Funktion des SH-Proteins (7,5 kDa) ist noch unklar. Rekombinantes RSV, bei dem das Gen für SH deletiert ist, kann sich in Zellkultur gut vermehren (Bukreyev et al., 1997). Die Gegenwart des SH-Proteins kann jedoch die Fusionsaktivität des F-Proteins steigern (Heminway et al., 1994).

Bei dem G-Protein handelt es sich um ein Typ II-Membranprotein, d.h. es ist mit dem aminoterminalen Ende in der Membran verankert. Mit einem Molekulargewicht von 84-90 kDa, weist es einen hohen Gehalt an Zuckergruppen auf (etwa 64% des Molekulargewichtes), die N- und in besonderem Maße O-glykosidisch mit Serin- oder Threoninresten verbunden sind (Wertz et al., 1989). Das G-Protein ist für die spezifische Adsorption der Viruspartikel an die Zelloberfläche verantwortlich. Zelluläre Rezeptoren sind Heparin-ähnliche Strukturen auf der Zelloberfläche. Es liegt im Viruspartikel als Trimer oder Tetramer vor (Collins et al., 2001). Die Aminosäuresequenz der Ektodomäne des G-Proteins variiert zwischen unterschiedlichen RSV-Stämmen sehr stark.

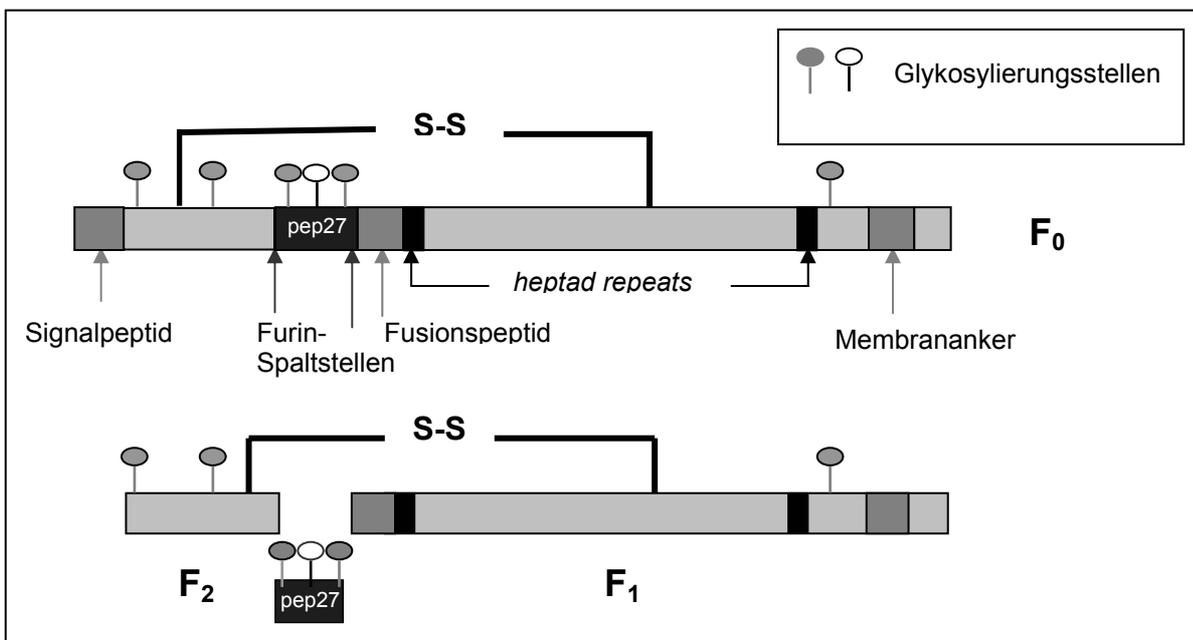


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung des HRSV-F-Proteins. 5 der 6 potentiellen Glykosylierungsstellen sind in unterschiedlichen HRSV-Stämmen konserviert (dunkelgraue Symbole) (Zimmer et al., 2001a).

Das Fusionsprotein (F-Protein) ist ein integrales Typ-I-Membranprotein, das im Viruspartikel als Trimer vorliegt (Calder et al., 2000). Es wird als Vorläuferprotein F_0 synthetisiert (siehe Abb. 1.3). Am aminoterminalen Ende besitzt es ein Signalpeptid für den Transport zur Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Nach Verankerung in der Membran und dem Beginn der Translokation von F_0 in das ER-Lumen wird das Signalpeptid abgespalten. Während des Transportes zur Plasmamembran wird das F-Protein in ER und Golgi-Apparat glykosyliert (Morrison, 1988). Direkt am carboxyterminalen Ende des Fusionspeptides und aminoterminal vom Membrananker liegen die Regionen der *heptad repeats* (Abb. 2.3) (Chambers et al., 1990), von denen erstere wahrscheinlich eine helikale Struktur annimmt (Lopez et al., 1998). Im Trans-Golgi-Netzwerk wird das F_0 -Protein durch die zelluläre Protease Furin in zwei Untereinheiten, F_1 und F_2 , gespalten. Die Spaltung erfolgt an den multibasischen Spaltstellen KKRKRR^{136} und RARR^{109} , so dass ein 27 AS langes Peptid (pep27) aus dem Protein entfernt wird (Zimmer et al., 2001; Gonzales-Reyes et al., 2001). Die Funktion dieses Peptides ist noch unklar. Bei BRSV trägt dieses Peptid ein Tachykininmotiv und hat entsprechend Signaltransduktionsaktivität. Die Untereinheiten F_1 und F_2 bleiben nach der Spaltung als heterodimerer Komplex über Disulfidbrücken miteinander verbunden, wobei der F_1 -Anteil mit dem carboxyterminalen Ende in der Membran verankert ist. Dieser Komplex induziert nach der Adsorption der Virus-Partikel an die Wirtszelle die Fusion von viraler und zellulärer Membran. Das Vorläuferprotein F_0 hat ein Molekulargewicht von 69 kDa, es ist glykosyliert und acetyliert. Nach der Spaltung beträgt das Molekulargewicht für F_1 50 kDa und für F_2 19 kDa (Gruber und Levine, 1985). Die Fusionsproteine der Pneumoviren besitzen sehr stark konservierte Sequenzen, auch innerhalb der beiden RSV-Subtypen A und B. Bei einer natürlichen RSV-Infektion ist das Fusionsprotein Hauptziel der humoralen Immunantwort.

Das Matrixprotein (M-Protein) hat ein Molekulargewicht von 29 kDa und ist nicht glykosyliert. Assoziiert an die Hüllmembran bildet es die sogenannte Matrixschicht an der Partikelinnenseite. Es trägt weder ein Signalpeptid, noch eine Transmembrandomäne, kann jedoch mit den im Zytoplasma lokalisierten Domänen der anderen viralen Glykoproteine und mit dem Nukleokapsid interagieren (Teng und Collins, 1998). Es spielt so eine wichtige Rollen beim Zusammenbau des Viruspartikels (*self assembly*).

Das M2-2 Protein (11 kDa) scheint ebenso wie das M2-1 Protein eine regulatorische Funktion bei der RNA-Synthese zu übernehmen (Collins et al., 2001; Collins und Murphy, 2002).

1.1.4 Epitope auf dem HRSV Fusionsprotein

In Abbildung 1.4 ist die Aminosäuresequenz des HRSV-F-Proteins (Stamm A2: Elango et al., 1985, und Stamm *Long*: Lopez et al., 1988) dargestellt.

Bis heute wurde eine Vielzahl antigener Domänen auf dem RSV-F-Protein identifiziert. Es wurden jedoch nur Epitope auf der F₁-Untereinheit des F-Proteins gefunden.

Das lineare Epitop Ser 173 – Ser 182 wurde im Jahre 1998 in einem *Pepscan* mit einem neutralisierenden Antikörper identifiziert (Langendijk et al., 1998). Diese Sequenz ist in allen bekannten BRSV- und HRSV-Stämmen konserviert.

Mit einem Anti-RSV Kaninchenserum konnte der Bereich Pro 205 – Gln 225 identifiziert werden. Ein synthetisches Peptid war in der Lage, die Bindung zum F-Protein und die neutralisierende Aktivität des Kaninchensersums zu inhibieren (Bourgeois et al., 1991). Gekoppelt an BSA war dieses Peptid in der Lage, im Tiermodell die Bildung RSV-neutralisierender Antikörper zu induzieren. Bei Viren vom Subtyp B liegt in diesem Bereich auch ein T-Zell-Epitop (Corvaisier et al., 1993). Ein Peptid des Bereiches 216 – 236 zeigte ebenfalls eine starke Reaktion mit einem neutralisierenden, monoklonalen Antikörper und war in der Lage, diesen in einem Plaque-Reduktions-Test zu inhibieren (Trudel et al., 1987). Mäuse, die mit dem KLH-gekoppelten Peptid Ile 221 – Phe 237 immunisiert wurden, bildeten zwar neutralisierende Antikörper, waren jedoch nicht vor einer anschließenden RSV-Infektion geschützt (Trudel et al., 1991).

Das Peptid Pro 265 – Lys 272 wurde ebenfalls von einem monoklonalen Antikörper erkannt (Lounsbach et al., 1993).

Wiederum mit synthetischen Peptiden (Paradiso et al., 1991) und mit in *E. coli* exprimierten Proteindomänen (Martin-Gallardo et al., 1991) wurde der Bereich Met 289 – Ala 298 als fusionsinhibierendes, virusneutralisierendes Epitop identifiziert. Mit Hilfe von HRSV-Mutanten, die nicht mehr in der Lage waren, mit verschiedenen F-spezifischen Antikörpern zu reagieren, wurde eine weitere Antikörperbindungsstelle identifiziert. Dieser Bereich befindet sich zwischen Gly 429 und Asp 447 (Lopez et al., 1998).

1 MELLILKANAITTILTAVTFASFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
 1 ----P-----A-----S-----

 56 VITIELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARR
 56 -----A-----

 110 ELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSSKKRKRFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEG
 110 -----T-----T-----

 163 EVNKIKSALL**STNKAVVSL**NGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLL**PIV**NK**QSCSISNI**
 163 -----R-----

 218 **ETVIEFQQKNNR**LLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITND**QKK**
 218 -----

 273 LMSNNVQIVRQQSYS**IMSIIKEEVL**AYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTK
 273 -----

 328 EGSNICLTRTRDGRWFCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSV
 328 -----Y-----

 380 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNR**GI**IKT
 380 -----

 434 **FSNGCDYVSNKGVD**TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSE
 434 -----A-----

 488 FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTIIIVILLSLIAVGLL
 488 -----H-----

 547 LYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI~~AFSN~~
 547 -----

Abbildung 1.4: Aminosäuresequenz des HRSV F-Proteins. Obere Reihe = Stamm A2 (Elango et al., 1985), untere Reihe = Stamm *Long* (Lopez et al., 1988). Beschriebene Epitope sind **fett** dargestellt.

1.2 Der T7-Phage

Beim T7-Phagen handelt es sich um einen lytischen Phagen. Pro infizierter Wirtszelle werden 100-200 Nachkommen freigesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante T7-Phagen als Träger für Epitope aus dem HRSV-Fusionsprotein verwendet. Mit diesen rekombinanten Phagen wurden Mäuse immunisiert und die Immunantwort dieser Tiere wurde untersucht.

1.2.1 Taxonomie

Bisher wurden etwa 2850 Phagen elektronenmikroskopisch untersucht und zum Teil klassifiziert (Ackermann, 1987). Die Einteilung in die einzelnen Virus-Familien ist in Tabelle 1.2 dargestellt. Zusammen mit den Phagen T1-T6 gehört der T7-Phage zur Gruppe der T-Phagen, die durch Demerec und Fano (1945) erstmals im Zusammenhang beschrieben worden waren. Die Phagen T7 und T3 gehören mit ihrer doppelsträngigen DNA und ihrem kurzen Schwanz zur Familie *Podoviridae*. Sie infizieren *Escherichia coli* und einige Stämme von *Shigella* und *Pasteurella*.

1.2.2 Virusaufbau und Genomorganisation

Der T7-Phage (siehe Abb. 1.5) besteht aus einem polyedrischen Kopf von 55 nm Durchmesser und einem kurzen, nichtkontraktilen Schwanz von 20 nm Länge. Jedes Virion enthält sechs Schwanzfasern, die wiederum aus je drei Proteinmolekülen (gp17) bestehen (Steven et al., 1988).

Der Phagenkopf trägt das lineare, doppelsträngige DNA-Genom mit einer Länge von 39.936 Basenpaaren. Der GC-Gehalt des Genoms beträgt wie der von *E. coli* etwa 50% (Klaus et al., 1992). Circa 92% der DNA codieren für Proteine. Etwa 25 Gene wurden bereits charakterisiert, wobei die Leserahmen für einige Gene überlappen (gp4, gp10). Eine Genkarte des T7-Phagen ist in Abb. 1.6 dargestellt.

Die Gene sind in drei Gruppen angeordnet: die frühen Gene (Klasse I) werden bereits 4-8 min nach der Infektion exprimiert. Sie sind für die Initial-Regulationen in der infizierten Zelle verantwortlich. Zu ihnen gehört unter anderem das Gen für die virale RNA-Polymerase (gp1).

Form	Nukleinsäuretyp	Familie	Besonderheit	Vertreter
mit Schwanz	dsDNA, L	<i>Myoviridae</i>	Schwanz kontraktile	T4
	dsDNA, L	<i>Siphoviridae</i>	Schwanz lang, nicht kontraktile	Lambda
	dsDNA, L	<i>Podoviridae</i>	Schwanz kurz	T7
kubisch	ssDNA, C	<i>Microviridae</i>	Kapsomeren, Fortsätze	φX174
	dsDNA, C, S	<i>Corticoviridae</i>	komplexer Bau, Lipide	PM2
	dsDNA, L	<i>Tectiviridae</i>	Doppelkapsid, Lipide, Pseudoschwanz	PRD1
	ssRNA, L	<i>Leviviridae</i>		MS2
filamentös	dsRNA, L, seg	<i>Cystoviridae</i>	innen Protein-, außen Lipidhülle	φ6
	ssDNA, C	<i>Inoviridae: Inovirus</i>	lange Filamente	fd
		<i>Plectovirus</i>	kurze Stäbchen	MVL1
	dsDNA, L	<i>Lipothrixviridae</i>	Hülle, Lipide	TTV1
pleomorph	dsDNA, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Hülle, Lipide, kein Capsid	MLV2

Tabelle 1.2: Taxonomie der Bakteriophagen. Eigenschaften der wichtigsten Phagengruppen (nach Ackermann 1987, modifiziert)
Abkürzungen: ds = doppelsträngig, ss = einzelsträngig, C = ringförmig, L = linear, S = superhelikal, seg = segmentiert

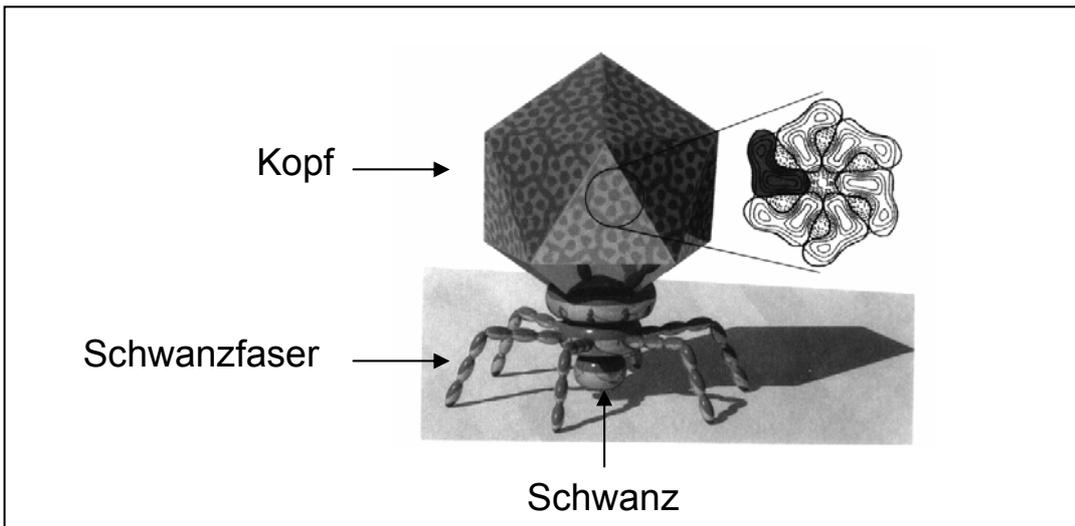


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung eines T7-Phagen (aus: Novagen, *T7Select[®] Phage Display System*)

Die späten Gene der Klasse II werden 6-15 min nach Infektion gebildet. Hier handelt es sich um Enzyme zur DNA-Replikation und Lyse der Wirtszelle. Späte Gene der Klasse III kodieren für Strukturproteine sowie für Regulationsproteine für Kapsid-Reifung und DNA-Verpackung. Ihre Expression erfolgt ab der 6. min nach Infektion bis zur Lyse der Wirtszelle.

Die Transkription der frühen Gene durch die *E. coli* – RNA-Polymerase startet an den starken Promotoren A1, A2 und A3. Der Phage besitzt mit diesen drei Promotoren eine besondere „Sicherung“ für seine Expression, da bereits einer dieser Promotoren für die normale Vermehrung ausreichend ist. Der Terminator für die frühe Transkription liegt hinter dem Gen für die DNA-Ligase (gp 1,3). Das Umschalten von früher zu später Transkription wird vor allem durch die Synthese der viralen RNA-Polymerase möglich. Zeitgleich erfolgt eine Hemmung der Wirts-RNA-Polymerase durch die virale Proteinkinase (gp 0,7) und, mit weitaus höherer Effizienz, durch das virale Inhibitorprotein gp2. Zwischen den Genen 10 und 11 liegt ein Terminator T_{ϕ} , der jedoch teilweise durchgelesen wird, damit die Gene 11 und 12, die keinen eigenen Promotor besitzen, ebenfalls transkribiert werden können. Die Konsensussequenzen der *E. coli*-Promotoren unterscheiden sich stark von denen, die durch die virale RNA-Polymerase erkannt werden. T7- und T3-RNA-Polymerasen können trotz großer Homologien in ihren Promotorsequenzen diese wechselseitig nur mit sehr geringer Effizienz nutzen. Diese hochspezifische Interaktion der T7-

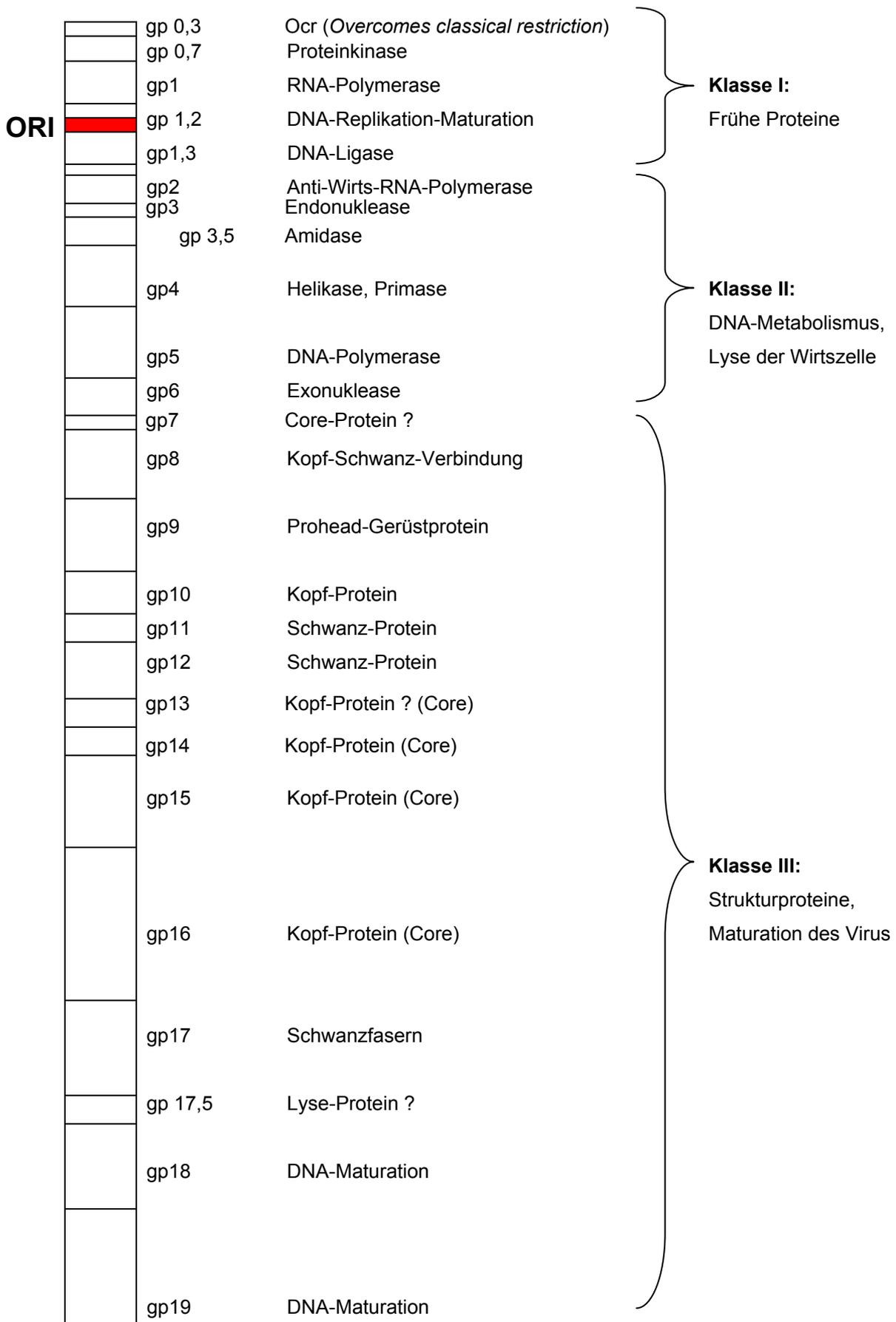


Abbildung 1.6: Genkarte des Phagen T7, Numerierung, ungefähre Größe und Funktion der Genprodukte (gp = Genprodukt); ORI = *origin of DNA replication*.

RNA-Polymerase mit ihrem Promotor ermöglichte die Entwicklung effektiver und spezifischer Expressionssysteme für die Gentechnologie. Ein solches Expressionssystem wurde auch in dieser Arbeit zur Herstellung rekombinanter Sendai Viren (siehe Einleitung 1.3.3) verwendet.

Der Kopf des Phagen besteht aus 5 unterschiedlichen Proteinen wobei das Kapsidprotein 10 (gp10) den größten Anteil ausmacht und an der Kapsidoberfläche exponiert ist.

Das Kapsidprotein wird in zwei unterschiedlichen Formen gebildet: 10A (gp10A) mit einer Länge von 344 AS und einem Molekulargewicht von 36,4 kDa und 10B (gp10B) mit einer Länge von 397 AS und einem Molekulargewicht von 41,8 kDa. Das Kapsidprotein 10B entsteht durch einen Leserastersprung an AS 341 von gp10A. Auf diese Weise kann das Protein bis zum nächsten Stopcodon noch um 53 AS verlängert werden. In einem natürlich vorkommenden Viruspartikel macht gp10B etwa 10% des Kapsids aus (Condron et al., 1991). Man kann jedoch funktionelle Kapside erzeugen, die entweder nur aus 10A oder 10B, oder aus 10A und 10B in unterschiedlichen Verhältnissen bestehen (siehe Novagen, *T7SelectTM Phage Display System*).

Gp14 (20,8 kDa), gp15 (84,2 kDa) und gp16 (143,8 kDa) bilden zusammen mit dem Genom das Core und sind somit ebenso wie gp8 (Kopf-Schwanz-Verbindung) Bestandteil des Phagenkopfes.

Die Schwanzfasern ermöglichen die Adsorption des Virus an die zellulären Rezeptoren. Diese bestehen aus Lipopolysaccharid-Anteilen der äußeren Wirtszellmembran. Jede Faser besteht aus mehreren Proteinmolekülen (gp17), von denen jedes ein Molekulargewicht von 61,4 kDa hat.

Nach erfolgreicher Adsorption des Phagen an die Wirtszelle erfolgt die Injektion des Genoms durch den nichtkontraktilen Schwanz des Phagen. Die Injektion beginnt dabei mit dem „linken“ Ende des Genoms (in Abb. 1.6 oben), das auch die Promotoren für die frühe Genexpression trägt.

Der Phagenschwanz besteht aus drei unterschiedlichen Proteinen: gp11 (22,3 kDa), gp12 (89,3 kDa) und der Kopf-Schwanz-Verbindung gp8 (59 kDa).

1.2.3 Bakteriophagen als Impfstoffe

Nachdem bereits mehrere Arbeitsgruppen beschrieben hatten, dass die Expression von Peptiden viraler Proteine mittels Phagen, in Mäusen eine spezifische Antikörperantwort induzieren kann (Willis et al., 1993; Veronese et al., 1994; Meola et al., 1995), konnten Grabowska und Mitarbeiter im Jahre 2000 erstmalig zeigen, dass diese rekombinanten Phagen in Mäusen einen Schutz vor einer anschließenden Virusinfektion induzieren können (Grabowska et al., 2000). Für diese Versuche wurde der modifizierte filamentöse Phage fd verwendet. Sein Hüllprotein pVIII kommt im Viruspartikel in 2.700 Kopien vor. Die N-terminalen 20 AS des pVIII werden an der Partikeloberfläche exponiert. Die Insertion von Fremdpeptiden ab einer Länge von 5 AS ist nur möglich, wenn im Phagengenom zwei Kopien des pVIII-Gens vorliegen: eine codiert für das ursprüngliche Protein, eine codiert für das Fusionsprotein aus pVIII und Peptid. Im rekombinanten Virion tragen so ca. 30% der pVIII-Untereinheiten das Fremdpeptid. Mit Hilfe einer Phagenbank und monoklonalen Antikörpern wurden mehrere Peptide identifiziert, die Epitopen auf dem Glykoprotein G des Herpes-Simplex-Virus-2 (HSV-2) entsprachen. Mäuse, die mit diesen rekombinanten Phagen (100 µg) subkutan und ohne die Zugabe eines Adjuvans immunisiert wurden, waren vor einer anschließenden HSV-2-Infektion geschützt.

Mit einem ähnlichen System führten Chen und Mitarbeiter (2001) Immunisierungsversuche gegen HIV-1 an Primaten durch. Mit Hilfe von Antikörpern aus HIV-infizierten Patienten wurde eine Phagenbank mit zufällig ausgewählten Peptiden durchgemustert. So wurden mehrere Peptide identifiziert, die Epitopen auf den HIV-Proteinen gp120 und gp41 entsprachen. Durch eine intramuskuläre Immunisierung von Rhesus-Affen mit den rekombinanten Phagen konnte eine anschließende Belastungsinfektion mit SHIV-89 zwar nicht verhindert werden, es kam bei den infizierten Tieren jedoch zu einer abgeschwächten Form der Virämie. Desweiteren konnte durch die vorangegangene Immunisierung der Ausbruch von AIDS-ähnlichen Symptomen verhindert werden.

De Berardinis und Mitarbeiter (2000) beschrieben, wiederum mit dem rekombinanten Phagen fd, die Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort, ausgelöst durch ein zytotoxisches T-Zell-Epitop und ein T-Helferzellen-Epitop von HIV-1.

Aufbauend auf diese Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit ein kommerziell erhältliches System zu Herstellung rekombinanter T7-Phagen verwendet, um ausgewählte Epitope des HRSV-Fusionsproteins hinsichtlich ihrer immunogenen

bzw. protektiven Eigenschaften als Teil rekombinanter T7-Phagen zu charakterisieren.

1.2.4 Das *T7Select*TM Phage Display System

Dieses System wurde von der Firma Novagen entwickelt, um mittels *Phage Display* Peptide oder Proteine auf ihre besonderen Bindungseigenschaften zu untersuchen. Die DNA, die für das zu untersuchende Peptid oder Protein codiert, wird dafür so in das Genom des T7-Phagen eingebaut, dass bei der Expression ein Fusionsprotein mit dem viralen Kapsidprotein (gp10) entsteht. Die eingebauten Peptide bzw. Proteine werden an der Oberfläche des Phagenpartikels präsentiert (Smith und Scott, 1993). Es gibt unterschiedliche Vektorsysteme, die einen Einbau von Peptiden und Proteinen unterschiedlicher Länge (50-1200 AS) und in unterschiedlicher Häufigkeit (0,1 - 415 Kopien pro Phagenpartikel) ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit beziehe ich mich auf den Vektor *T7Select415-1*. Dieser ermöglicht den Einbau von Peptiden bis zu einer Länge von 50 AS.

Das Kapsid des T7-Phagen enthält 415 Kopien des Kapsidproteins gp10. In das Kapsid eines rekombinanten Phagen werden so ebenfalls 415 Kopien des chimären Kapsidproteins eingebaut. In einem Wildtypvirus kommt das Kapsidprotein in zwei unterschiedlichen Formen vor (10A, 344 AS und 10B, 397 AS), wobei gp10B durch einen Leserastersprung an AS 341 von gp10A entsteht. Das hier erwähnte System macht sich diese natürliche Variante zu Nutze. Im Vektor *T7Select415-1* wurde an Position 348 im Gen von gp10B eine *multiple cloning site* eingefügt, so dass die chimären Proteine der rekombinanten Viren aus einer verkürzten Form des gp10B (AS1-348) und weiteren bis zu 50 AS bestehen (siehe Abb. 1.7).

Der Laborwirt des T7-Phagen ist *Escherichia coli* (Stamm BL21). Die Phagen vermehren sich sehr schnell. So sind die Zellen einer infizierten Bakterienkultur bereits 1-2 Std. nach Infektion vollständig lysiert. Pro infizierte Zelle werden 100-200 neue Viren freigesetzt, d.h. die Viren wachsen zu sehr hohen Titern (10^{11} - 10^{12} PFU/ml). Da die neuen Viren durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt werden, müssen die eingebauten Peptide nicht, wie beispielsweise bei filamentösen Phagen durch die Membran der Wirtszelle sezerniert werden (Russel, 1991). Die Phagen sind sehr robust und lassen sich ohne Titerverlust über mehrere Monate bei 4°C lagern. Mit Hilfe eines Cäsiumchloridgradienten kann man sie leicht reinigen. T7-

Phagen lassen sich also schnell, in großen Mengen und kostengünstig produzieren und reinigen, was auch bei der Impfstoffentwicklung eine wesentliche Rolle spielt.

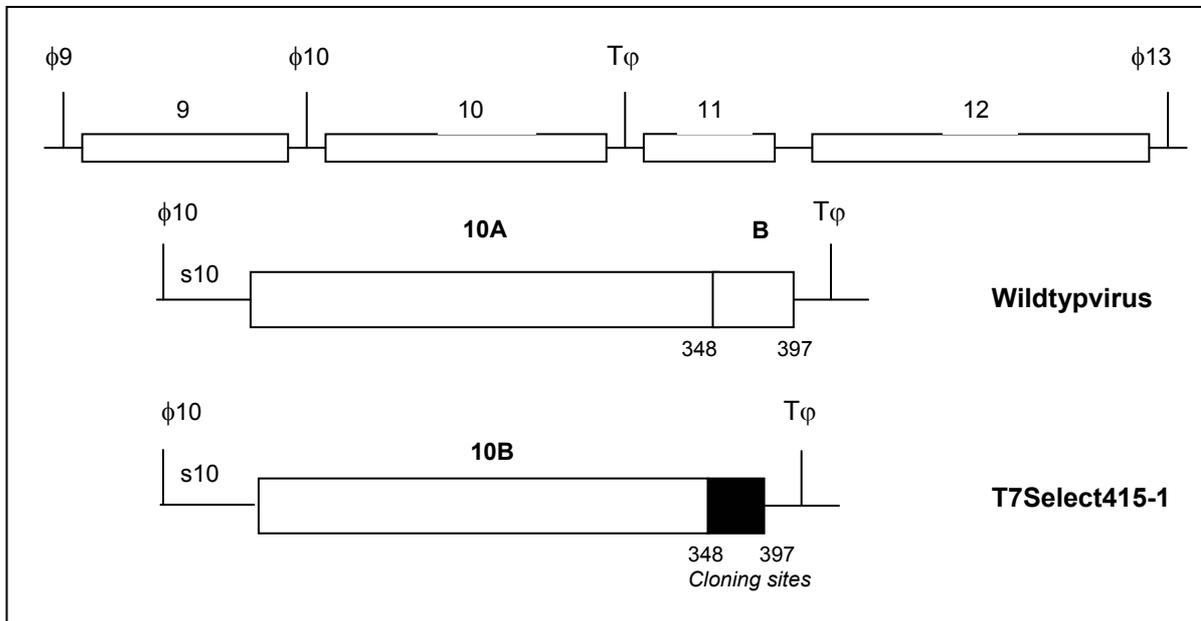


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Gens 10 im Wildtyp-Virus und im *T7Select415-1*-System. Der Vektor *T7Select415-1* trägt den selben Promotor ($\phi 10$), Terminator ($T\phi$) und das selbe Translations-Initiations-Signal ($s10$) wie das Wildtypvirus.

1.3 Das Sendai-Virus (SeV)

Das Sendai-Virus (SeV) wurde 1952 von N. Kuroya und Mitarbeitern in der japanischen Stadt Sendai entdeckt, als sie Mäuse mit Gewebeproben eines an Lungenentzündung verstorbenen Kindes infizierten (Kuroya et al., 1953). Aufgrund der Tatsache, dass der Erreger aus einem Menschen isoliert wurde, hielt man das Virus zunächst für humanpathogen. Später stellte sich jedoch heraus, dass das Virus Mäuse infiziert. Man bezeichnet das Sendai-Virus daher auch als murines Parainfluenzavirus-Typ-1.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein rekombinantes SeV zur Expression des Fusionsproteins des humanen respiratorischen Syncytialvirus (HRSV) eingesetzt. Immunisierungsversuche mit diesen rekombinanten Viren sollten bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen HRSV neue Erkenntnisse bringen.

1.3.1 Taxonomie

Wie auch das respiratorische Syncytialvirus gehört das Sendai-Virus zur Familie *Paramyxoviridae*, deren Taxonomie in Tabelle 1.1 dargestellt ist. Innerhalb der Unterfamilie *Paramyxovirinae* gehört SeV zum Genus *Respirovirus*. Es ist im Gegensatz zu RSV in der Lage, Erythrozyten zu agglutinieren und besitzt Neuraminidaseaktivität.

1.3.2 Virusaufbau und Genomorganisation

Die durchschnittliche Größe eines SeV-Partikels beträgt 150 nm (Lamb und Kolakofsky, 2001). Der Aufbau ist ähnlich dem eines RSV-Partikels (Siehe Abb. 1.1). Wesentliche Unterschiede sind das Vorkommen des HN-Proteins (Hämagglutinin-Neuraminidase) in der Virusmembran anstelle des HRSV-G-Proteins und das Fehlen von SH- und M2-Protein.

Das HN-Protein hat ein Molekulargewicht von 69-72 kDa und liegt als Oligomer vor, wobei die einzelnen Komponenten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Beim HN-Protein handelt es sich um ein Typ-II-Membranprotein. Es vermittelt die Adsorption der Viruspartikel an die Wirtszelle, indem es an Sialinsäure-haltige Rezeptoren an der Zelloberfläche bindet. Es hat die enzymatische Aktivität einer Neuraminidase und kann so nach der Freisetzung neuer Viren aus der infizierten Zelle endständige N-Acetyl-Neuraminsäurereste (Sialinsäuren) von den Rezeptormolekülen abspalten (Scheid und Chopin, 1974a und b). So werden die neugebildeten Viruspartikel von der Zelloberfläche abgelöst und können sich in neuen Zielzellen ausbreiten. Aufgrund seiner Sialinsäure-bindenden Eigenschaft ist das HN-Protein in der Lage, Erythrozyten zu binden und zu agglutinieren. Diese Fähigkeit kann für den Nachweis einer SeV-Infektion ausgenutzt werden (siehe Hämagglutinationstest, Methoden 4.5.4). Das HN-Protein spielt außerdem eine Rolle bei der F-Protein-vermittelten Zell-Zell-Fusion (Bousse et al., 1994).

Das einzelsträngige RNA-Genom hat eine Länge von 15.384 Basen und liegt im Komplex mit 2564 Nukleokapsidproteinen (N) als linksorientierte Helix vor (Calain und Roux, 1993). Für die Herstellung rekombinanter Viren muss beachtet werden, dass eine effiziente Replikation des Genoms nur möglich ist, wenn die Anzahl an Nukleotiden einem Vielfachen von sechs entspricht (Calain und Roux, 1993). Diese

sogenannte „rule of six“, beruht auf der Tatsache, dass immer genau sechs Nukleotide vom 5'-Ende des wachsenden RNA-Strangs mit einem N-Protein assoziiert werden. Nukleotide, die nicht auf diese Art „verpackt“ werden, wären im Zytoplasma einer infizierten Zelle dem Abbau durch zelluläre Nukleasen ausgesetzt. Die Anordnung der Gene auf dem SeV-Genom ist in Abb. 1.8 dargestellt.



Abbildung 1.8: Anordnung der Gene auf dem SeV-Genom.

Das P/C-Gen codiert für acht Proteine (P, C, C', Y₁, Y₂, X, V, W). In der für das Phosphoprotein (P-Protein) codierenden Region befindet sich ein zweiter Leserahmen, der für die Nichtstrukturproteine C und C' (C = cellular protein) sowie für die Polypeptide Y₁ und Y₂ codiert. Bei dem X-Protein handelt es sich um eine aminoterminal verkürzte Form des P-Proteins. V- und W-Protein entstehen durch neue Leserahmen, die im Laufe einer RNA-Editierung durch gezieltes Einfügen von Guanosinresten entstehen. Bei C, C', Y₁, Y₂, X, V und W handelt es sich um Nichtstrukturproteine. C, C', Y₁, Y₂ wirken in infizierten Zellen als Interferon-Antagonisten (Garcin et al., 2001).

N = Nucleokapsidprotein, P = Phosphoprotein, M = Matrixprotein, HN = Hämagglutinin-Neuraminidase, F = Fusionsprotein, L = *large* Protein (Polymerase)

1.3.3 Herstellung rekombinanter Sendai Viren

Die Herstellung rekombinanter Negativstrang-Viren war viele Jahre lang ein Problem, da von der negativ-strängigen RNA Proteine nicht direkt translatiert werden können. Für die Transkription wird ein funktionsfähiges Nucleokapsid benötigt, in dem die RNA von N-Proteinen umgeben und mit P- und L-Proteinen assoziiert ist. Nur so ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase in der Lage, virale mRNA zu synthetisieren. Im Jahr 1995 beschrieben Garcin und Mitarbeiter die Etablierung eines Systems zur Erzeugung rekombinanter Sendai Viren aus Plasmid-kodierter cDNA (Garcin et al., 1995). Dieses ursprüngliche System wurde in der Arbeitsgruppe von Wolfgang Neubert weiter modifiziert und verbessert, so dass die Herstellung von rekombinanten Viren ohne Zwischenpassage in Hühnereiern möglich wurde (Leyrer et al., 1998). Das Prinzip zur Herstellung rekombinanter Sendai-Viren ist in Abb. 1.9 schematisch dargestellt.

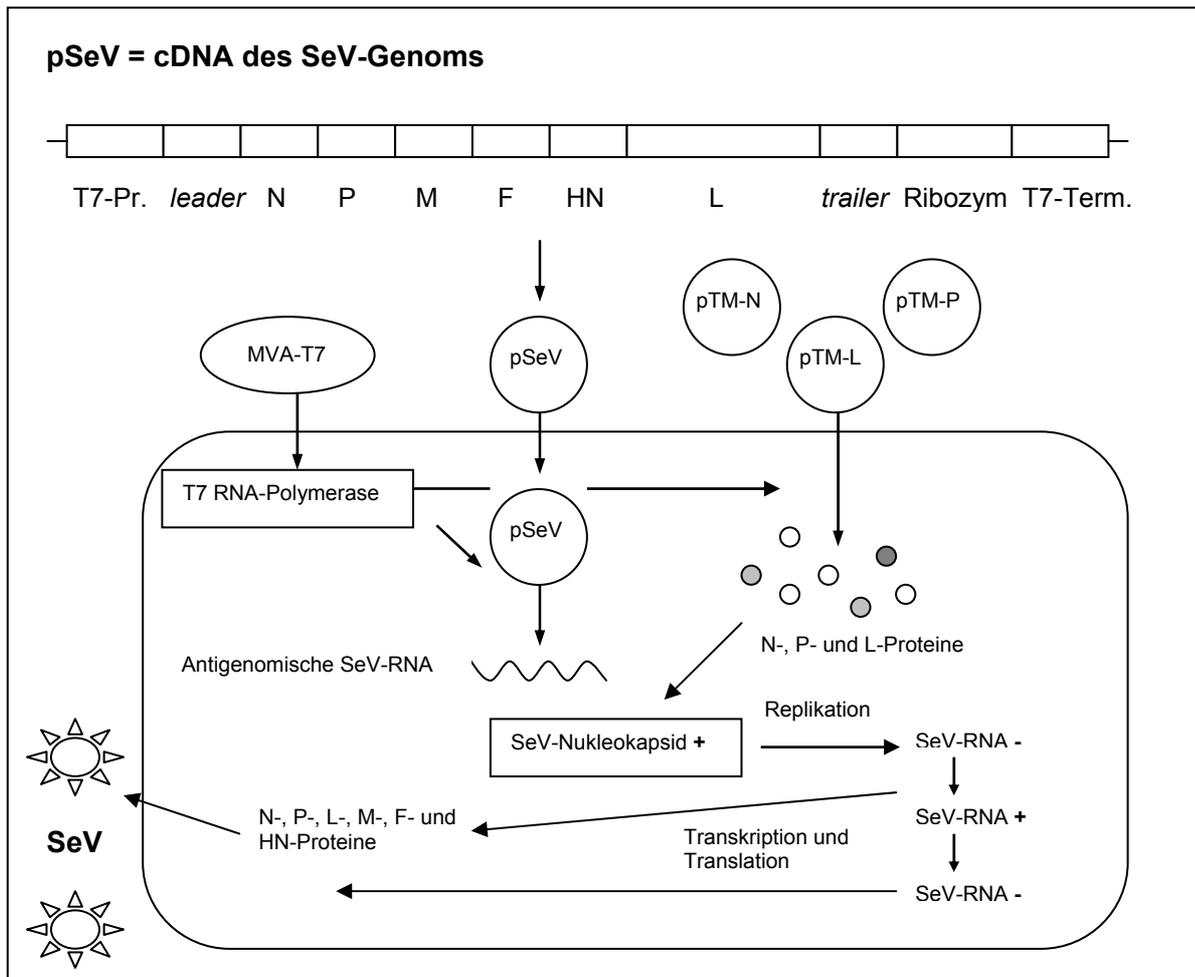


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Herstellung rekombinanter Sendai-Viren im MVA-T7-Helfersystem.

+ = Positivstrang, - = Negativstrang; T7-Pr. = T7-Promotor, T7-Term. = T7-Terminator

Zellen in Zellkultur werden mit der Plasmid-kodierten cDNA des viralen Genoms und den auf separaten Expressionsplasmiden codierten Genen N, P und L transfiziert (pTM-N, pTM-P und pTM-L). Sowohl die virale cDNA, als auch die Gene für N, P und L stehen unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Um die T7-Polymerase in den Zellen bereitzustellen, wurden die Zellen vor der Transfektion mit einem rekombinanten Vakzinia-Virus (MVA-T7) infiziert, das für dieses Enzym codiert. Nach der Transfektion kann die exprimierte T7-Polymerase das virale Genom und die N-, P- und L-Gene transkribieren. Durch eine Ribozymsequenz am Ende des viralen Genoms kann exakt die gewünschte Genomlänge erreicht werden, indem sich das Ribozym autokatalytisch aus der transkribierten RNA ausschneidet. Das korrekte 5'-Ende der RNA, die zuerst antigenomisch, also positiv-strängig, vorliegt, wird hergestellt, indem die Polymerase exakt am ersten Nukleotid des viralen Genoms mit

der Transkription beginnt. Die mittlerweile exprimierten N-Proteine verpacken die virale RNA und lagern sich mit P- und L-Proteinen zu einem Replikationskomplex zusammen. Über diesen Replikationskomplex kann nun genomische RNA (Negativ-Strang) hergestellt werden und im Anschluss daran können Transkription und Replikation erfolgen. Mit Hilfe der viruscodierten Proteine M, F und HN können die Nukleokapside zu vollständigen Virionen verpackt und aus der Zelle ausgeschleust werden.

2. Zielsetzung

Das respiratorische Syncytialvirus (RSV) verursacht Erkrankungen des Respirationstraktes bei Mensch (humanes RSV) und Rind (bovines RSV). Bei Kleinkindern ist das humane respiratorische Syncytialvirus (HRSV) der wichtigste virale Infektionserreger im unteren Respirationstrakt. Gegen HRSV gibt es bislang keinen zugelassenen Impfstoff.

Bei einer natürlichen Infektion ist das Fusionsprotein (F-Protein) in der Virus-Hülle Hauptziel der humoralen Immunantwort, d.h. neutralisierende Antikörper sind vor allem gegen das F-Protein gerichtet.

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, Impfstoffe auf der Basis des F-Proteins zu erzeugen und auf ihre Wirksamkeit zu untersuchen.

In einem ersten Ansatz sollten protektive Peptide des F-Proteins von HRSV identifiziert werden, die bei einer Immunisierung vor einer nachfolgenden HRSV-Infektion schützen. Die Peptide entstammen Regionen, die durch Versuche mit monoklonalen Antikörpern als Antikörper-Bindungsstellen charakterisiert worden waren. Da Peptide eine vergleichsweise geringe Immunogenität aufweisen, sollten die ausgewählten Peptide des F-Proteins in das Hüllprotein des Bakteriophagen T7 eingebaut werden. Die Genabschnitte der betreffenden Peptide sollten dabei so in das Genom des T7-Phagen eingebaut werden, dass das Hüllprotein bei der Translation am Carboxyterminus um das Fremdpeptid verlängert wurde. Auf diese Weise kann erreicht werden, dass das betreffende Peptid von jedem Phagen im Kopfteil in 415 Kopien exprimiert wird. Diese multivalente Präsentation sollte die Immunogenität der Peptide stark erhöhen.

In einem zweiten Ansatz wurden unterschiedliche Formen des F-Proteins in das Genom rekombinanter Sendai-Viren (SeV) inseriert. Mit Hilfe der rekombinanten Viren sollte zum einen das Gesamtprotein, zum anderen nur die Ektodomäne des F-Proteins exprimiert werden. Bei letzterem Konstrukt ist der Genabschnitt, der für den zytoplasmatischen Abschnitt und den Membrananker codiert, deletiert, so dass bei der Expression ein lösliches F-Protein entsteht. Als dritte Form sollte ein F-Protein exprimiert werden, dem eine der beiden Furinspaltstellen und pep27 fehlen.

Mit den beiden unterschiedlichen Antigenarten – von Phagen präsentierte Peptide bzw. von rekombinanten Sendai-Viren exprimierte F-Proteine – sollten Mäuse immunisiert werden. Durch die Analyse der Immunantwort sollte ermittelt werden, welches der Antigene (Gesamtprotein, lösliches Protein, Deletionsmutante, einzelne Peptide) am effizientesten in der Lage ist, eine protektive Immunantwort gegen HRSV zu induzieren.

3. Material

3.1 Zelllinien

Vero (permanente Zelllinie aus Nierengewebe der grünen Meerkatze):

American Type Culture Collection (ATCC)

16HBE14o⁻ (HBE = humane Bronchial-Epithel-Zellen):

Dr. Gruenert, *Human Molecular Genetics Unit, Department of Medicine, University of Vermont, Burlington, USA*

3.2 Zellkulturmedien

Dulbeccos's modified Eagle medium (DMEM) mit
4500 mg/l Glucose, Pyridoxin und Glutamax-I

GIBCO BRL Life Technologies

HAM'S F12 Medium mit 1,176 g/l NaHCO₃,
mit 0,259 g/l stabilem Glutamin

Biochrom, Hamburg

199 HANKS mit 0,35 g/l NaHCO₃

Biochrom, Hamburg

PBS Dulbecco's w/o Calcium und Magnesium

GIBCO BRL Life Technologies

Fetales Kälberserum, auf Mycoplasmen untersucht

GIBCO BRL Life Technologies

Versen-Trypsin 0,125%

Siehe 3.13.9

Penicillin-Streptomycin Antibiotikalösung

GIBCO BRL Life Technologies

N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin

GIBCO BRL Life Technologies

Nicht-essentielle Aminosäuren

GIBCO BRL Life Technologies

3.3 Viren

Humanes respiratorisches Syncytialvirus (HRSV), Stamm A2:

Geraldine Taylor, *Institut for Animal Health*, Compton, Großbritannien

Rekombinante Sendai- Viren (SeV/DsRed, SeV/HRSV-F, SeV/HRSV-F-Del-pep27 und SeV/HRSV-F-Del-TM), Stamm Fushimi:

Wolfgang Neubert, Max-Planck-Institut für Biochemie, Molekulare Virologie, Martinsried, Deutschland

3.4 Vektoren

T7Select415-1

pTM1 mit Gen für das

HRSV-F-Protein (Stamm *Long*)

Novagen, Schwalbach

Dr. Zimmer, Inst. f. Virologie

TiHo Hannover (Moss et al., 1990)

3.5 Enzyme

T4 DNA Ligase (5 U/ml)

10 x Puffer für T4 DNA Ligase

Taq Polymerase (5 U/ml)

10 x PCR-Puffer ohne MgSO₄

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) (1 U/ml)

10 x Puffer für CIAP

Streptavidin biotinylated horseradish

peroxidase complex

DNase I (aus bovinem Pankreas)

Proteinase K (600 U/ml)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Amersham Bioscience,
Freiburg

Roche, Mannheim

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

3.5.1 Restriktionsenzyme

EcoR I (10 U/μl), Puffer O⁺

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Hind III (10 U/μl), Puffer R⁺

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

3.6 Kits

T7Select™ Cloning Kit

Novagen, Schwalbach

QIAGEN Lambda Kit

QIAGEN, Hilden

QIA quick PCR Purification Kit

QIAGEN, Hilden

QIA quick Nucleotide Removal Kit

QIAGEN, Hilden

TA-Cloning Kit

Invitrogen, Karlsruhe

3.7 Primer

Die Primer wurden synthetisiert bei: MWG Biotech AG, Ebersberg

Restriktionsschnittstellen sind kursiv dargestellt.

3.7.1 Primer für die Herstellung rekombinanter T7-Phagen

	5'	3'
F-Rep1 (156-171)-S:	TTT <i>GAA TTC</i> TAA GGT CCT GCA CCT AGA AGG	
F-Rep1 (156-171)-AS:	TTT <i>AAG CTT</i> TAG AGC ACT TTT GAT CTT GTT C	
F-Rep2 (170-190)-S:	TTT <i>GAA TTC</i> TGC TCT ACT ATC CAC AAA CAA G	
F-Rep2 (170-190)-AS:	TTT <i>AAG CTT</i> GCT GGT TAA GAC ACT AAC TCC	
F-1a (205-225)-S:	TTT <i>GAA TTC</i> ACC TAT TGT GAA CAA GCA AAG C	
F-1a (205-225)-AS:	TTT <i>AAG CTT</i> TTG TTG GAA CTC TAT CAC AG	
F-1b (216-234)-S:	TTT <i>GAA TTC</i> AAA TAT AGA AAC TGT GAT AG	
F-1b (216-234)-AS:	TTT <i>AAG CTT</i> GGT AAT CTC TAG TAG TCT G	
F-2a (255-287)-S:	TTT <i>GAA TTC</i> TGA ATT ATT GTC ATT AAT CAA TGA TAT GCC	
F-2a (255-287)-AS:	TTT <i>AAG CTT</i> AGA GTA ACT TTG CTG TCT AAC	
F-2b (282-298)-S:	TTT <i>GAA TTC</i> TAG ACA GCA AAG TTA CTC TAT C	

F-2b (282-298)-AS: TTT AAG CTT TGC TAA GAC TTC CTC TTT TAT TAT
GG

F-3 (426-451)-S: TTT GAA TTC CTC CAA TAA AAA TCG TGG AAT C

F-3 (426-451)-AS: TTT AAG CTT AGA CAC AGT GTC TAC CCC

F-Rep3 (510-524)-S: TTT GAA TTC CGA TGA ATT ATT ACA TAA TG

F-Rep3 (510-524)-AS: TTT AAG CTT ATT TGT GGT GGA TTT ACC

3.7.2 Primer für die Sequenzierung

T7 up GGA GCT GTC GTA TTC CAG TC

T7 down AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA

T7 up (+400): GGC TGC TGA CCG TGT GTT C

T7 down (+400): CCT CAA TGT TGA AAC GTC C

3.8 Peroxidase Substrate

BM Chemiluminescence Blotting substrate (POD)	Roche, Mannheim
Super Signal [®] West Dura Extended Duration Substrate	PIERCE, Rockford, USA
ABTS Solution (ELISA)	Roche, Mannheim

3.9 Antikörper

3.9.1 Polyklonal:

Anti-Maus IgG, vom Esel, FITC-gekoppelt	DPC Biermann, Bad Nauheim
Anti-Maus IgG, vom Schaf, Cy [™] 3-gekoppelt	SIGMA, Deisenhofen
Anti-Maus IgG, vom Kaninchen, HRP-gekoppelt	Dako, Hamburg
Anti-Ziege IgG, vom Kaninchen, Cy [™] 2-gekoppelt	dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG, vom Schaf, biotinyliert	Amersham, Freiburg
Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Dako, Hamburg
Anti-Parainfluenza Typ 1, aus der Ziege	DPC Biermann, Bad Nauheim
Anti-Sendai Virus, aus Kaninchen	Inst. f. Virologie, Universität Marburg

3.9.2 Monoklonal:

Anti-RSV Matrix Protein (18G6)
(Zellkulturüberstand)

mab 1: Anti-RSV 18B2, Maus IgG 1

mab 2: Anti-RSV Fusionsprotein,

mab 3: Anti-RSV F Protein-Ig

mab 4: Anti-F

mab 5: 2F

mab 6: 58F

mab 7: 47F

mab 8: Anti-F

mab 9: F4 (Zellkulturüberstand)

mab 10: F13 (Zellkulturüberstand)

mab 11: F19 (Zellkulturüberstand)

Institut für Virologie, TiHo
Hannover

dianova, Hamburg

Chemicon, Hofheim

Serotec, Düsseldorf

Dr. Daus, *Institut for
Animal Science and*

Health, Lelystad, Niederlande

Dr. Melero, *Centro Nacional de
Biología Fundamental*, Madrid ,
Spanien (Lopez, 1998)

Dr. Melero, s. o.

Dr. Melero, s. o.

Dr. Örvell, *Laboratory of Clinical
Virology*, Huddinge

Dr. Taylor, *Institut for Animal
Health*, Compton, GB

Dr. Taylor, s.o.

Dr. Taylor, s.o.

3.10 Marker

3.10.1 Agarosegelelektrophorese:

Gene Ruler 100 bp Ladder Plus

λ DNA / *EcoRI* + *HindIII*

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

3.10.2 SDS-PAGE:

Rainbow marker

Amersham, Freiburg

3.11 Sonstiges

Hühnererythrozyten

E. coli BL21

Geflügelklinik, TiHo Hannover

Novagen, Schwalbach

3.12 Chemikalien

Acrylamidlösung 30 % „rotiphorese® Gel 30”

acetyliertes Trypsin (bovine Pancreas)

Agar-Agar

Aminocaprinsäure

APS

Bacto-Trypton

Blocking-Reagenz

Borsäure

Bovines Serumalbumin

Bromphenolblau

Cäsiumchlorid

Calciumchlorid

Complete, Proteinaseinhibitorcocktail

Coomassie-Brilliantblau

DABCO

DEPC-treated water

Dinatriumhydrogenphosphat

dNTP Set (4 times 0,25 ml of 100 mM Solution)

DTT

EDTA

Essigsäure

Ethanol

Ethidiumbromid

Glucose

Glycerin

Glycin

Hefeextrakt

Roth, Karlsruhe

Sigma, Deisenhofen

Roth, Karlsruhe

Sigma, Deisenhofen

Bio-Rad, München

Roth, Karlsruhe

Roche, Mannheim

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

Sigma, Deisenhofen

Roth, Karlsruhe

Roche, Mannheim

Merck, Darmstadt

Sigma, Deisenhofen

MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

Merck, Darmstadt

MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

MoBiTec, Göttingen

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
6 x <i>Loading Dye Solution</i>	MBI-Fermentas
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylzellulose (4.000 <i>centipoises</i>)	Sigma, Deisenhofen
Mowiol 4-88	Calbiochem, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
N, N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Nonidet ® P40 (4-Nonylphenolpolyethylenglycol)	Roth, Karlsruhe
2-Propanol (Isopropanol)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Pepton	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Tween	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

3.13 Medien, Puffer, Lösungen

3.13.1 Medien für Bakterien, Phagen und Lungenhomogenate

LB-Medium	Pepton	10 g
(pH 7,0):	NaCl	10 g
	H ₂ O	ad 1 l
autoklavieren, bei Raumtemperatur lagern		

M9 Salze (20x):	NH ₄ Cl	20 g
	KH ₂ PO ₄	60 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	120 g
	H ₂ O	ad 1 l
autoklavieren, bei Raumtemperatur lagern		

M9LB-Medium:	M9-Salze (20x)	5 ml
	20% Glucose	2 ml
	1 M MgSO ₄	0,1 ml
	LB-Medium	100 ml

LB-Agar (pH 7,0):	Pepton	10 g
	NaCl	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	Agar	20 g
autoklavieren, bei Raumtemperatur lagern		

Top-Agarose:	Pepton	1 g
	Hefeextrakt	0,5 g
	NaCl	0,5 g
	Ararose	0,6 g
	H ₂ O	ad 100 ml
autoklavieren, bei Raumtemperatur lagern		

Lungen-Puffer:	HANKS 199 Medium	87 ml
	74,7% Saccharose (steril)	10 ml
	Glutamin	1 ml
	3 M MgCl ₂ (steril)	1 ml
	Penicillin/Streptomycin	1 ml

3.13.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

SDS-Laufpuffer (10x):	SDS	10,0 g
	TRIS	30,0 g
	Glycin	144,0 g
	H ₂ O	ad 1 l
Sammelgel (2 ml-Ansatz):	H ₂ O	1,4 ml
	TRIS/HCl (1M) pH 6,8	0,25 ml
	Acrylamidlösung 30 %	0,33 ml
	SDS 10 % (in H ₂ O)	20 µl
	APS 10 % (in H ₂ O)	20 µl
	TEMED	2 µl
Trenngellösung (10 %) (5 ml-Ansatz):	H ₂ O	2,0 ml
	TRIS/HCl (1,5 M) pH 8,8	1,3 ml
	Acrylamidlösung 30 %	1,7 ml
	SDS 10 % (in H ₂ O)	50 µl
	APS 10 % (in H ₂ O)	50 µl
	TEMED	4 µl
Coomassie-Färbelösung:	Coomassie-Brilliantblau	0,5 g
	Ethanol	200 ml
	Essigsäure (konz.)	50 ml
	H ₂ O	250 ml

SDS-Probenpuffer (2x):	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	10 ml
	10% SDS	20 ml
	Glycerin	10 ml
	H ₂ O	9 ml
	2% Bromphenolblau (20 mg/ml in H ₂ O)	1 ml

3.13.3 Western Blot

Anoden-Puffer I (pH 9,0):	1M Tris	300 ml
	H ₂ O	500 ml
	Ethanol	200 ml
	pH-Wert mit HCl einstellen	

Anoden-Puffer II (pH 7,4):	1M Tris	25 ml
	H ₂ O	770 ml
	Ethanol	200 ml
	pH-Wert mit HCl einstellen	

Kathoden-Puffer (pH 9,0):	1M Tris	25 ml
	Aminocarbonsäure	5,25 g
	H ₂ O	770 ml
	Ethanol	200 ml
	pH-Wert mit HCl einstellen	

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung pH 7,2 (PBS):	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,3 g
	H ₂ O	ad 1 l

PBS ohne Calcium und Magnesium pH 7,2 (PBSM):	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	8 g 0,2 g 1,15 g ad 1 l
---	---	----------------------------------

3.13.4 Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer (10x):	Tris Borsäure 0,5 M EDTA (pH 8,0) H ₂ O	108 g 55 g 40 ml ad 1 l
-------------------	---	----------------------------------

Agarosegele:	1%TBE-Gel:	1 g Agarose/100 ml TBE
	1,5 % TBE-Gel:	1,5 g Agarose/100 ml TBE
	2% TBE-Gel:	2 g Agarose/100 ml TBE

DNA-Probenpuffer (6x):	Bromphenolblau Saccharose in H ₂ O bei 4°C lagern	0,25% 40% (w/v)
------------------------	--	--------------------

Ethidiumbromid- Stocklösung:	Ethidiumbromid H ₂ O Färbung: 0,5 µg / ml (in H ₂ O)	1g ad 100 ml
---------------------------------	---	-----------------

3.13.5 Zell-Lysate

NP40-Lysispuffer pH 7,5:	Natriumdesoxycholat TBS pH 7,5 Nonidet P40 (bei 37°C erwärmt) Bei Bedarf <i>Complete</i>	0,5 % 50,0 ml 1 % 1 Tablette
-----------------------------	--	---

3.13.9 Sonstiges

Versen-Trypsin 0,125%:	NaCl	8,0 g
	KCl	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,31 g
	KH ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,20 g
	CaCl ₂	0,13 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
	Trypsin	1,25 g
	EDTA	1,25 g
	Streptomycin	0,05 g
	Penicillin	0,06 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
	pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,0 einstellen	

3.14 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Agarosegelelektrophorese

- Bildverarbeitungssystem MWG Biotech, Ebersberg
- Gelträger, Kammer, Kamm Keutz, Reiskirchen
- Mikrowellengerät MWS 2820 Bauknecht
- UV-Transluminator UVP, USA
- Spannungsquelle Bio-Rad, München

Autoklaven

- Autoklav, Typ A5 Webeco, Bad Schwartau

Bakterienkultur

- Petrischalen, 100 cm Greiner, Nürtingen
- Reagenzröhrchen, 15 ml Greiner, Nürtingen
- Reagenzröhrchen, 50 ml Greiner, Nürtingen
- Erlenmeyerkolben 100 ml, 300 ml, 500 ml Jürgens, Hannover
- Schüttelinkubator Typ 3033 GFL, Burgwedel

- Brutschrank Typ B16 Heraeus, Osterode
- Photometer Ultraspec 2000 Amersham, Freiburg
- Einmal-Halbmikroküvetten Landgraf, Langenhagen
- Megafuge 1,0R Heraeus, Hamburg

ELISA

- 96 Well Maxi Sorb Elisa-Platte Nunc, Wiesbaden
- *ELISA-Reader*, Spectra II Tecan, Crailsheim

Magnetrührer, RCT basic

IKA Labortechnik, Staufen

Mikroskope

- Inverses Mikroskop Leitz, Wetzlar
- Axiophot Zeiss, Jena

PCR

- GeneAmp^R PCR System 2499 Perkin Elmer, Boston MA, USA
- Primus 25/96 Thermocycler MWG Biotech, Ebersberg
- Gene Quant RNA/DNA Calculator Pharmacia Biotech, Freiburg
- 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße Biozym, Hess. Oldendorf

pH-Meter

H. Jürgens, Hannover

Pipetten

- 10 µl, 100 µl, 1000 µl Eppendorf, Hamburg
- 8-Kanal-Pipette Brand, Wertheim/Main
- 12-Kanal-Pipette Brand, Wertheim/Main
- Pasteurpipetten aus Glas H. Jürgens, Hannover
- 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml Glaspipetten H. Jürgens, Hannover

Pipettierhilfen

- Accu-Jet^R Pipettenhelfer Brand, Wertheim/Main

SDS-PAGE und *Semi-dry* Western Blot

- Miniproteingelkammer,
Hoefer *Mighty small II*, SE 250 Amersham Pharmacia, Freiburg
- Filterpapier Schleicher & Schuell GmbH,
- Nitrozellulose-Transfer-Membran Schleicher & Schuell GmbH,
- Transferkammer Keutz, Reiskirchen
- Entwicklermaschine Konika SRX-101 Konika, Hohenbrunn
- Kodak BioMax MR Film Amersham, Freiburg
- Biorad Power Pack 200/300 Bio-Rad, München

Sicherheitswerkbänke

- NUAIRE™ Klasse 2 Nuaire, Plymouth, USA

Thomakammer

Jürgens, Hannover

Vortex

- Reax top Heidolph, Kehleim
- Reax 2000-05-20 Heidolph, Kehleim

Waagen

- Elektronische Analysenwaage,
Typ 1712 MP 8 Sartorius GmbH, Göttingen
- Sartorius *Portable* Waage Lauda A100 Sartorius GmbH, Göttingen
- Tierwaage: Explorer Präzisionswaage,
OHAUS Landgraf, Langenhagen

Wasserbäder

GFL, Burgwedel

Zellkultur

- Gewebekulturflaschen 25 cm² Nunc, Wiesbaden
- Gewebekulturflaschen 75 cm² Nunc, Wiesbaden
- 96-Well-Platten Costar, Bodenheim
- 24-Well-Platten Greiner, Nürtingen
- CO₂-Inkubator Hereaus, Hanau

- Schwenktisch

Keuz, Reiskirchen

Zentrifugen

- Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D
- Eppendorf Zentrifuge 5417C/R
- Ultrazentrifuge Modell 28-70 mit Rotoren SW28, SW41, SW55
- Megafuge 1,0R
- J221 Zentrifuge mit JA 10 Festwinkelrotor
- Vakuumpumpe *SpeedVac* Savant

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Beckman, München

Heraeus, Hamburg

Beckman, München

Savant Instruments Inc, USA

Zentrifugengefäße

- *Ultra Clear* für SW28, SW41, SW55
- *Polyallomer* für SW28, SW41, SW55
- 15 und 50 ml Röhrchen

Beckman, München

Beckman, München

Greiner, Nürtingen

4. Methoden

4.1 Herstellung rekombinanter T7-Phagen

4.1.1 Amplifikation der HRSV-F-Epitope mittels PCR

Für die Amplifikation der Abschnitte Rep1, Rep2, 1a, 1b, 2a, 2b, 3 und Rep3 auf dem HRSV Fusionsprotein (siehe Ergebnisse, Tab. 5.1) wurden die entsprechenden *Sense*- (S) und *Antisense*-Primer (AS) (siehe Material 3.7.1) eingesetzt. Als Matrize diente der pTM1-Vektor, der das Gen des HRSV F-Proteins (Stamm *Long*, Lopez et al., 1988) enthielt.

DEPC-Wasser	:	35,5 μ l	
10x PCR Puffer	:	5 μ l	
25 mM MgSO ₄	:	5 μ l	
10 mM dNTP	:	1 μ l	
10 pmol/ μ l Primer S	:	1 μ l	
(10 pmol/μl Primer AS	:	1 μl)	„Hot Start“
DNA (25 ng/ μ l)	:	1 μ l	
Taq Polymerase (5 U/ μ l)	:	0,5 μ l	

Es wurde eine sogenannte „*Hot Start*“ PCR durchgeführt, d.h. der AS-Primer wurde erst bei einer Temperatur von 70°C zu dem PCR-Ansatz gegeben. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

<u>70°C</u>	<u>95°C</u>	<u>95°C</u>	<u>60°C</u>	<u>72°C</u>	<u>72°C</u>	4°C
30 sec	1 min	15 sec	30 sec	30 sec	5 min	
						
25 Zyklen						

Für die Konstrukte Rep3, 1a und 1b wurde die *Annealing*-Temperatur bei jedem Zyklus um 0,2°C gesenkt.

4.1.2 Agarosegelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob in der PCR die gewünschten DNA-Fragmente amplifiziert wurden, wurden je 5 µl PCR-Probe mit je 3 µl DNA-Probenpuffer versetzt, gut gemischt und auf ein 2%iges TBE-Agarosegel aufgetragen. Für eine Bestimmung der Fragmentlängen wurde 1 µl DNA-Molekulargewichts-Marker mit 3 µl DNA-Probenpuffer und 4 µl sterilem H₂O gemischt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V in TBE-Puffer. Die DNA-Banden wurden anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Die amplifizierten Fragmente sollten eine Länge von etwa 100 bp aufweisen.

4.1.3 Reinigung der PRC-Produkte

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem *QIA quick Nucleotide Removal Kit*. Die DNA wurde für einen anschließenden Restriktionsverdau in 50 µl DEPC-Wasser eluiert.

4.1.4 Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Um die amplifizierten Fragmente in den T7-Vektor klonieren zu können, mussten diese mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Dafür wurden die durch die PCR eingefügten Schnittstellen für *EcoRI* (5'-Ende) und *HindIII* (3'-Ende) verwendet. Der Verdau erfolgte in zwei Schritten:

- | | | |
|----------------------------|---|-------|
| 1. DNA in H ₂ O | : | 50 µl |
| Puffer O ⁺ | : | 6 µl |
| <i>EcoRI</i> (10 U/µl) | : | 2 µl |
| DEPC-Wasser | : | 2 µl |

Der Ansatz wurde gut gemischt und dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der geschnittenen DNA erfolgte mit Hilfe des *QIA quick Nucleotide Removal Kits*. Die DNA wurde für einen weiteren Restriktionsverdau in 50 µl DEPC-Wasser eluiert.

2. DNA in H ₂ O	:	50 µl
Puffer R ⁺	:	6 µl
<i>Hind</i> III (10 U/µl)	:	2 µl
DEPC-Wasser	:	2 µl

Der 2. Ansatz wurde analog zum ersten Verdau inkubiert und gereinigt. Für die anschließende Ligation wurde die DNA in 30 µl EB-Puffer eluiert.

4.1.5 Restriktionsverdau des T7-Vektors

Im *T7Select*[®] Cloning Kit lag der *T7Select 415-1* Vektor bereits in geschnittener Form vor. Zusätzlich wurde jedoch auch ungeschnittene Vektor DNA, die mit Hilfe des *QIAGEN Lambda Kits* präpariert wurde, verwendet. Für eine anschließende Ligation musste auch diese DNA mit *Eco*RI und *Hind*III geschnitten werden.

T7-DNA (ca. 500 ng/µl)	:	10 µl
Puffer R ⁺	:	5 µl
<i>Hind</i> III (10 U/µl)	:	2 µl
DEPC-Wasser	:	33 µl

Der Verdau erfolgte für 2 Std. bei 37°C. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.7.2) durchgeführt, und die DNA wurde für den 2. Verdau in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

T7-DNA in H ₂ O	:	50 µl
Puffer O ⁺	:	6 µl
<i>Eco</i> RI (10 U/µl)	:	2 µl
DEPC-Wasser	:	2 µl

Nach erneuter Inkubation und Phenol-Chloroform-Extraktion, wurde die DNA in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und dephosphoryliert.

4.1.6 Dephosphorylierung linearer DNA

Die Entfernung der terminalen 5'-Phosphatgruppen erfolgte durch Inkubation mit *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIAP) für 1 Std. bei 37°C.

T7-DNA in H ₂ O	:	50 µl
10 x Puffer CIAP	:	6 µl
CIAP (10 U/µl)	:	3 µl
DEPC-Wasser	:	1 µl

Die DNA wurde über Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt in 10 mM Tris pH 8,0 aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.1.7 Ligation

PCR-Fragmente und T7-Vektor-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt.

Insert (0,02-0,06 pmol)	:	0 - 1,5 µl
T7-DNA (0,5 µg/µl; 0,02 pmol)	:	1 µl
10 x Ligase-Puffer	:	0,5 µl
10 mM ATP	:	0,5 µl
100 mM DTT	:	0,5 µl
DEPC-H ₂ O	:	0 – 1,5 µl
T4 DNA-Ligase (0,5U/µl)	:	1 µl
<hr/>		
Gesamtvolumen	:	5 µl

Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Ansatz bei 4°C gelagert.

4.1.8 *In Vitro* Verpackung der T7-DNA

Die Verpackung der T7-DNA zu infektiösen Viruspartikeln erfolgt mit Hilfe des *T7 Packaging Extracts* (Son et al., 1988) aus dem *T7Select Cloning Kit*. Die *Packaging Extract*-Portionen von je 25 µl pro Reaktionsansatz wurden in je 2 Portionen zu je 12,5 µl gesplittet, da auch mit diesem geringeren Volumen ausreichend T7-DNA verpackt werden konnte.

Die unterschiedlichen Ligationsansätze wurden mit je 12,5 µl Verpackungsextrakt in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorsichtig gemischt. Als Kontrollansatz wurden 0,25 µg *Packaging Control DNA* zu dem Verpackungsextrakt gegeben. Die Proben wurden für 2 Std. bei RT inkubiert. Die Verpackungsreaktion wurde mit Zugabe von 280 µl sterilem LB-Medium gestoppt. Zum Vereinzeln der rekombinanten Phagen wurde ein Plaquetest (siehe 4.5.3) durchgeführt. Viren, die die gewünschten HRSV-F-Fragmente ins Genom aufgenommen hatten, wurden mit Hilfe einer Plaque-PCR identifiziert. Mit vektorspezifischen Primern wurden die inserierten Bereiche amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert.

4.1.9 Plaque-PCR

Einzelne Plaques wurden mit einer 10 µl Pipettenspitze gepickt, in je 50 µl TE Puffer überführt und gut gemischt. Die Viren dienten als Matrize für die anschließende PCR.

Mix 1:

DEPC-H ₂ O	:	30,5 µl
10x PCR Puffer	:	5 µl
25 mM MgSO ₄	:	5 µl
10 mM dNTP	:	1 µl
Phagen in TE-Puffer	:	2 µl

Mix 2:

10 pmol/µl Primer S	:	2 µl
10 pmol/µl Primer AS	:	2 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	:	1 µl

Zum Denaturieren der Viren wurde der PCR-Ansatz ohne Primer und Polymerase (Mix 1) für 5 min auf 98°C erhitzt. Bei einer Temperatur von 70°C wurden dann Primer und Polymerase (Mix 2) dazugegeben.

98°C	70°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
5 min	30 sec	30 sec	30 sec	1 min	5 min	
						
		25 Zyklen				

Es folgte eine PCR mit Insert-spezifischen Primern zur Identifizierung positiver Klone und eine PCR mit Vektor-spezifischen Primern, um die Produkte zu sequenzieren. Die Primer T7up und T7down binden etwa 50 Nukleotide, die Primer T7up +400 und T7down +400 etwa 400 Nukleotide 5' und 3' der inserierten HRSV-Peptidsequenz.

4.1.10 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte bei MWG Biotech, Ebersberg, in Auftragsarbeit. Für die Sequenzierreaktion wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des *QIA quick PCR Purification Kits* gereinigt und in 30 µl EB-Puffer eluiert. Pro Reaktion wurden 20 ng DNA pro 100 bp in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und verschickt. Sequenziert wurde mit den in der PCR verwendeten Primern.

4.2 Zellkulturen

4.2.1 Passagieren von Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden in DMEM mit 5% FKS und Antibiotika bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Passagierung erfolgte im Drei- bzw. Viertagesrhythmus in 75cm²-Zellkulturflaschen. Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurden diese einmal mit PBS Dulbecco's (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen und anschließend mit ca. 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung für kurze Zeit bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Der größte Teil des Trypsins wurde abgenommen, und die Zellen wurden für ca. 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sie sich komplett vom

Flaschenboden gelöst hatten. Die Zellen wurde in 10 ml DMEM mit 5% FKS und Antibiotika suspendiert, und 0,5 ml davon wurden in 20 ml frischem Medium weiter kultiviert (d.h. die Kultur wurde 1:20 gesplittet).

4.2.2 Passagieren von HBE-Zellen

HBE-Zellen wurden in einer Mischung aus DMEM und HAM'S F12 (1:1) unter Zugabe von 5-10% FKS und nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAS) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte analog zu den Vero-Zellen. HBE-Zellen wurden 1:10 bzw. 1:5 gesplittet und weiter kultiviert.

4.3 Bakterien

4.3.1 Kultivierung von *E. coli* BL21

Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika kultiviert. Zur Herstellung einer Flüssigkultur wurden 20 ml LB-Medium ohne Antibiotika mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 U/min im Wärmeschrank geschüttelt.

4.4 Virusanzucht

4.4.1 Anzucht von HRSV

Die Vermehrung von HRSV erfolgte auf HBE-Zellen. Dafür wurden $4,5 \times 10^6$ Zellen in eine 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Zeitgleich wurden die Zellen mit einer m.o.i. von 1 PFU/Zelle infiziert. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Medium (5% FKS). Virus und Zellen wurden für weitere 2 Tage inkubiert. Zur Virusernte wurde der virushaltige Zellkulturüberstand mit 0,1 M MgSO₄ und 0,05 M HEPES pH 7,4 (Endkonzentrationen) versetzt, abgenommen und zur Abtrennung der Zelltrümmer für 5 min bei 4°C und 1559 x g zentrifugiert. Das Virus wurde in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.4.2 Anzucht von rekombinanten Sendai-Viren

Die Vermehrung der rekombinanten Sendai-Viren erfolgte auf Vero-Zellen. Dafür wurde eine konfluente Zellkultur 1:5 in eine neue 75 cm²-Kulturflasche gesplittet, so dass sich bereits am nächsten Tag wieder ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte. Dieser wurde zur vollständigen Entfernung von FKS-Resten dreimal mit DMEM ohne FKS gewaschen. Die Zellen wurden mit einer m.o.i von 0,1 PFU/Zelle in einem Volumen von 6 ml DMEM auf einem Schwenker bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Std. wurde der Überstand abgenommen und durch 20 ml frisches DMEM ohne FKS mit 1 µg/ml acetyliertem Trypsin ersetzt. Die Virusernte erfolgte 2 Tage nach Infektion, bei Auftreten eines starken zytopathischen Effektes. Der virushaltige Zellkulturüberstand wurde zur Abtrennung der Zelltrümmer für 5 min bei 4°C und 1559 x g zentrifugiert. Zur vollständigen Aktivierung der Viren wurden diese mit 5 µg/ml acetyliertem Trypsin versetzt und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins und zur Stabilisierung der Viren wurde der Zellkulturüberstand mit 5% FKS versetzt.

Das Virus wurde in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

4.4.3 Anzucht von rekombinanten T7-Phagen (100 ml Kultur)

70 ml M9LB-Medium wurden mit 30 ml einer *E. coli* BL21 Kultur versetzt und mit 10 µl eines Phagenstocks (ca. 10¹⁰ PFU/ml) infiziert. Die Bakterien wurden bei 37°C und 200-220 U/min im Bakterienbrutschank geschüttelt. Nach vollständiger Lyse der Zellen (2-3 Std. nach Infektion) wurden 20 µl DNase I (1 mg/ml) zu der Suspension gegeben, und diese wurde für weitere 15 min geschüttelt. Nach Zugabe von 2,5 g NaCl wurde das phagenhaltige Lysat für 30 min bei 4°C und 6238 x g zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen. Die Phagen wurden entweder bei 4°C für mehrere Wochen gelagert, oder mit 0,1 Vol 80%igem Glycerin versetzt und so bei -80°C gelagert.

4.5 Virustitration

4.5.1 Bestimmung des HRSV-Titers im Immunoplaquetest

Auf einer 24 *Well*-Platte wurden Vero-Zellen mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Zur Bestimmung des Virustiters wurde von der Virussuspension eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten in DMEM angelegt (Doppelansatz). Jeweils 200 μl der einzelnen Verdünnungsstufen wurden auf die zuvor mit DMEM gewaschenen Zellen gegeben und auf einem Schwenker im Brutschrank für 1 Std. inkubiert. In jede Vertiefung wurde 1 ml Methylzellulose (4 g auf 500 ml DMEM + 2% FKS) gegeben. Die Zellen wurden für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Die Methylzellulose wurde abgenommen, die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und mit 3%igem Paraformaldehyd fixiert (20 min bei RT). Um das Paraformaldehyd zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit 0,1 M Glycin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,2% Triton-X-100 permeabilisiert und dann mit einem Antikörper gegen das RSV Matrix-Protein (mab 18G6) inkubiert. Der Antikörper wurde 1:25 in PBS verdünnt, pro Vertiefung wurden 200 μl aufgetragen. Nach einer Inkubation von 1 Std. bei RT wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (Kaninchen Anti-Maus-HRP, Fa. DAKO) für eine Stunde inkubiert. Der Antikörper wurde 1:500 in PBS verdünnt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden je 300 μl AEC als Substrat zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 10-15 min wurde das Substrat abgenommen und die Platten wurden zweimal mit Leitungswasser gewaschen. Die gefärbten Plaques wurden ausgezählt, und der Virustiter wurde in *plaque forming units* (Plaque-bildende Einheiten) pro ml (PFU/ml) angegeben.

4.5.2 Bestimmung des SeV-Titers im Immunoplaquetest

Die SeV-Titration erfolgte aufgrund der geringen Größe der SeV-Plaques in 96 *Well*-Platten. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Die Durchführung erfolgte analog zur HRSV-Titration. Pro Vertiefung wurden 50 μl der

Virusverdünnung aufgetragen. Die Färbung der Plaques erfolgte durch Inkubation mit einem polyklonalen Anti-Parainfluenza-Typ-I-Serum (1:1000 in PBS, 25 µl pro Vertiefung) und Peroxidase-gekoppeltem Anti-Ziege-Immunglobulin (1:2000 in PBS, 25 µl pro Vertiefung).

4.5.3 Bestimmung des T7-Titers mittels Plaquetest

Die Bestimmung des T7-Titers erfolgte auf LB-Agarplatten. Eine *E. coli* Flüssigkultur wurde 1:10 in LB-Medium verdünnt und für ca. 45 min bei 37°C und 200 U/min inkubiert, bis eine $OD_{600} = 1,0$ erreicht wurde. Zur Bestimmung des Virustiters wurde von der Virussuspension eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten in LB-Medium angelegt. Jeweils 100 µl der einzelnen Verdünnungsstufen wurden mit je 250 µl Bakterien gemischt. Nach Zugabe von je 3 ml Top-Agarose wurde das Gemisch zügig auf vorgewärmte LB-Agarplatten gegeben. Nachdem die Topagarose gelatiert war, wurden die Platten über Kopf bei 37°C im Brutschrank für 3 Std. inkubiert. Die Plaques wurden ausgezählt, und der Virustiter wurde in *plaque forming units* (Plaques-bildende Einheiten) pro ml (PFU/ml) angegeben.

4.5.4 Hämagglutinationstest

Viren, die die Fähigkeit besitzen, an Sialinsäuren zu binden, wie z. B. SeV, können aufgrund dieser Eigenschaft Erythrozyten agglutinieren. Mischt man Viren und Erythrozyten, so kommt es bei einer entsprechend hohen Viruskonzentration zu einer Quervernetzung der Erythrozyten, so dass sich diese nicht mehr am Boden eines Gefäßes als Sediment absetzen können.

Der Test wurde in Mikrotiterplatten mit U-förmigem Boden (Fa. Greiner) durchgeführt. Von der zu testenden Virussuspension (Zellkulturüberstand SeV-infizierter Zellen) wurde in der Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe in Zweierpotenzen in PBSM angelegt (50 µl/Vertiefung, Doppelansatz). Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 50 µl einer 1%igen Erythrozytensuspension gegeben. Nach einer Inkubation von ca. 30 min bei 4°C wurde der Test ausgewertet. Eine gleichmäßige Verteilung der Erythrozyten bedeutete Agglutination. Nicht agglutinierte Erythrozyten sedimentierten als scharf umrissener Knopf am Boden der Vertiefung.

Der in Hämagglutinationseinheiten pro ml (HAU/ml, *haemagglutinating units/ml*) angegebene Titer stellt den reziproken Wert der höchsten Verdünnungsstufe dar, die noch eine Agglutination erkennen lässt.

4.5.5 Endpunktverdünnungsmethode zur Infektiositätsmessung (Bestimmung einer KID₅₀)

Mit einer Endpunktverdünnung kann die Anzahl infektiöser Einheiten in einer Virussuspension statistisch ermittelt werden. Als Bezugsgröße für die Einheit der Infektiositätsbestimmung wird diejenige Verdünnungsstufe gewählt, bei der 50% der inokulierten Probanden (z.B. Zellkulturen) infiziert wurden (KID₅₀).

Von einer Virussuspension wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten in DMEM mit 5% FKS angelegt. Jeweils 100 µl der einzelnen Verdünnungsstufen wurden in je vier Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zugabe von 100 µl Vero-Zellsuspension mit einer Zelldichte von 200.000 Zellen pro ml erfolgte eine dreitägige Inkubation in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Fixierung und Färbung der infizierten Zellen erfolgte analog zum Immunoplaquetest. Vertiefungen, in denen mindestens eine infizierte Zelle vorhanden war, galten als positiv. Bei der Berechnung der KID₅₀ (kulturinfektiöse Dosis zur Basis 50%) kam die Gleichung nach Kärber zur Anwendung (Kärber, 1931).

4.6 Virusreinigung

4.6.1 Reinigung rekombinanter Sendai-Viren für die Immunisierung von Mäusen

Die Virusanzucht erfolgte wie unter 4.4.2 beschrieben. Es erfolgte keine Zugabe von FKS. Stattdessen wurde der virushaltige Zellkulturüberstand in Zentrifugenröhrchen überführt und mit einem 20%igen Saccharosekissen unterschichtet. Die Viren wurden in einer Ultrazentrifuge bei 4°C und 100.000 x g für 60 min pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µl DMEM ohne FKS und ohne Antibiotika resuspendiert. Um den

Virustiter zu bestimmen, wurden Titrations (siehe 4.5.2) jeweils als Dreifach-Ansatz durchgeführt.

4.6.2 Plaque-Reinigung rekombinanter T7-Phagen

Um gewährleisten zu können, dass die rekombinanten T7-Phagen klonal vorlagen und die Sequenzen der inserierten Fremdpeptide stabil in das Genom eingebaut waren, wurde mit jedem Konstrukt eine Plaque-Reinigung durchgeführt. Hierfür wurden die Phagen vermehrt (siehe 4.4.3, 20 ml Kultur) und anschließend in einem Plaquetest auf LB-Agarplatten vereinzelt (siehe 4.5.3). Es wurden einzelne Plaques gepickt, mit denen neue Bakterienkulturen (20 ml) infiziert wurden. Dieser Vorgang wurde für jeden Klon zweimal wiederholt. Die Phagen wurden anschließend erneut sequenziert.

4.6.3 Reinigung rekombinanter T7-Phagen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Für die Reinigung der intakten Phagenpartikel wurde ein Cäsiumchlorid-Stufengradient verwendet. Die Phagen wurden wie unter Punkt 4.4.3 beschrieben kultiviert (400 ml Kultur). Die Viren wurden in einer Ultrazentrifuge bei 4°C und 100.000 x g für 60 min pelletiert. Die Pellets der einzelnen Konstrukte wurden in je 8 ml Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium) resuspendiert und auf einen Cäsiumchlorid-Stufengradienten geladen. Für den Gradienten wurde eine 62,5 %ige CsCl-Stocklösung angesetzt. Diese wurde mit TE-Puffer in folgenden Verhältnissen verdünnt:

Stufe	CsCl : TE
1	1:2
2	1:1
3	2:1
4	1:0

← intakte Viruspartikel

Nach Zentrifugation bei RT und 100.000 x g für 45 min wurde die gut sichtbare Virusbande mit einer 1 ml Spritze (Kanüle 0,80 x 40 mm) abgenommen. Nach Verdünnung mit TE-Puffer wurden die Viruspartikel erneut bei 100.000 x g (1 Std., RT) pelletiert und zur vollständigen Entfernung des CsCl mit PBS Dulbecco's gewaschen. Die Pellets wurden in je 1 ml PBS Dulbecco's resuspendiert. Zur Analyse der gereinigten Viren wurde eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung des Gels, eine Titration und eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt.

4.7 Allgemeines

4.7.1 BCA-Test

Zur Bestimmung des Proteingehalts der gereinigten T7-Phagen wurde der *BCA-Assay* von Pierce nach Angaben des Herstellers verwendet.

Der Test wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Je 10 µl Probe, Standard (BSA) und Leerwert (PBS) wurden in die Vertiefungen gegeben und mit je 200 µl Substrat gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm im *ELISA-Reader* gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Standards berechnet.

4.7.2 DNA-Reinigung mittels Phenol-Chloroformextraktion

Während des gesamten Vorgangs wurde unter einem Abzug gearbeitet. Die Probe (z.B. DNA nach einem Restriktionsverdau) wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 250 µl gebracht. Nach Zugabe von 1 Vol. (250 µl) äquilibriertem Phenol, wurde der Ansatz durch vorsichtiges Über-Kopf-Schwenken gut gemischt. Das Gemisch wurde 15 min bei 17.900 x g und RT zentrifugiert. Mit einer Pipette wurde zunächst ein Teil der Phenol-Phase (untere Phase) abgenommen, dann wurde erneut 5 min bei 17.900 x g und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase (obere Phase) wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 1 Vol. (250 µl) Chloroform-Isopropanol (1:24) wurde die Probe 2 min über Kopf geschwenkt und 15 min bei 17.900 x g und RT zentrifugiert. Mit einer Pipette wurde ein Teil der Chloroform-Isopropanol-Phase (untere Phase) abgenommen, und nach einer letzten

fünfminütigen Zentrifugation bei 17.900 x g und RT wurde die wässrige Phase (obere Phase) abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Zum Ankonzentrieren wurde die DNA anschließend gefällt (siehe 4.7.3) und in einem geringeren Volumen (50 µl) Puffer oder Wasser aufgenommen.

4.7.3 DNA-Fällung

Die DNA wurde aus einer wässrigen Lösung durch Zugabe von 1/10 Vol. 3M NaAc pH 4,5 und 2 ½ Vol. 100% Ethanol gefällt. Nach sorgfältigem aber vorsichtigem Mischen wurde die Probe für 30 min bei 4°C und 20.800 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl Ethanol (70%) gewaschen, dabei jedoch nicht resuspendiert. Nach Zentrifugation (5 min, 4°C, 20.800 x g) wurde der Überstand verworfen, das Pellet wurde luftgetrocknet und in einem kleinen Volumen (50 µl) DEPC-Wasser oder 10 mM Tris, pH 8, aufgenommen.

4.7.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Proteine wurden in einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Trenngele besaßen die Maße 60 x 80 x 0,75 mm und eine Acrylamidkonzentration von 10%. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstant 15 mA in Miniproteingelkammern der Firma Hoefer (*Mighty small II*, SE 250). Es wurden Elektrophoresen sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden die Zell-Lysate, Zellkulturüberstände oder Phagen direkt 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Reduzierende Bedingungen wurden dadurch erzeugt, dass den Proteinen außer Probenpuffer noch Dithiothreitol (DTT) in einer Endkonzentration von 0,1 M zugesetzt wurde. Die Proben wurden anschließend 5 min auf 95°C erhitzt und erst dann auf das Gel aufgetragen. Proben, die DTT enthielten, waren immer durch mindestens eine Spur von Proben ohne DTT getrennt, da das DTT auch während der angelegten Spannung im Gel diffundieren kann und so evtl. auch die benachbarten Proben reduziert.

Als Marker wurden vorgefärbte Proteine mit Molekulargewichten zwischen 14,3 und 220 kDa verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden entweder im Gel gefärbt oder auf Nitrozellulose transferiert.

4.7.5 Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese in einer Glaspetrischale für 30 min in der Coomassie-Lösung geschwenkt. Das Gel war dabei vollständig mit Färbelösung bedeckt. Nach 30 min wurde die Färbelösung abgegossen (konnte wiederverwendet werden), und das Gel wurde anschließend in 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren (ca. 1 Std.). Um die Entfärbezeit zu verkürzen, wurde der Entfärber häufiger gewechselt. Nach Wässerung der Gele konnten diese über Nacht zwischen zwei Zellophanfolien gespannt und getrocknet werden.

4.7.6 *Semi-dry*-Western Blot

Um die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine immunologisch nachweisen zu können, wurden sie mit Hilfe eines *Semi-dry*-Blots auf Nitrozellulose übertragen (Kyhse-Andersen, 1984). Für den Blot wurden 6 Filterpapierstreifen mit Anodenpuffer I, 3 Filterpapierstreifen mit Anodenpuffer II und 9 Filterpapierstreifen mit Kathodenpuffer benetzt. Der Blot-Aufbau erfolgte in der Transferkammer von unten nach oben:

- 6x Filterpapier Anode I
- 3x Filterpapier Anode II
- Nitrozellulosemembran
- Gel
- 9x Filterpapier Kathode

Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² über einen Zeitraum von 60 min. Für die anschließende Immunfärbung wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blocking-Reagenz (Roche) geblockt. Alle freien Proteinbindungsstellen der Membran wurden so abgesättigt.

4.7.7 Immunchemische Detektion von Proteinen

Die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Antigene wurden über einen indirekten immunologischen Nachweis mit spezifischen monoklonalen Antikörpern oder polyklonalem Serum detektiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten für 1 Std. bei 4°C. Nach dem Blockierschritt und nach jeder weiteren Inkubation wurde die Membran dreimal für je 10 min mit PBSM / 0,1% Tween gewaschen. Nach Inkubation mit dem proteinspezifischen Primärantikörper erfolgte entweder eine Inkubation mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000 in PBSM verdünnt), und es wurde ein dritter Inkubationsschritt mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin durchgeführt (1:2000 in PBSM verdünnt), oder die gebundenen Primärantikörper wurden direkt mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:1000 in PBSM verdünnt) inkubiert. Die gebundene Peroxidase konnte mit *BM Chemoluminescence Blotting Substrate* (Roche) bzw. *Super Signal* (Pierce) dargestellt werden. Die Signale wurden auf Röntgenfilm oder mit Hilfe einer lichtempfindlichen Kamera dargestellt.

4.7.8 ELISA

Um die rekombinanten Phagen immunologisch charakterisieren zu können, wurden diese in einem ELISA mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern inkubiert, die gegen das RSV-Fusionsprotein gerichtet waren.

Für den Nachweis wurden die rekombinanten Viren (Lysat, siehe Punkt 4.4.3) auf Mikrotiterplatten (Maxisorb, Nunc) über Nacht bei 4°C immobilisiert (je 100 µl pro Vertiefung). Alle weiteren Inkubationen, mit Ausnahme des Substrates, erfolgten für 1 Std. bei 37°C. Verbliebene freie Bindungsstellen wurden mit Blocking-Reagenz (Roche) abgesättigt (200 µl pro Vertiefung). Nach der Absättigung und nach jedem weiteren Inkubationsschritt wurden die Vertiefungen dreimal mit je 200 µl PBSM / 0,05% Tween gewaschen. Die monoklonalen Antikörper wurden 1:500 in PBSM verdünnt, und je 50 µl wurden in die Vertiefungen gegeben. Als Sekundärantikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Anti-Maus-Immunglobuline aus Kaninchen verwendet (Dako, 1:1000 in PBSM, 50 µl pro Vertiefung). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl ABTS-Lösung (Roche) gestartet und nach 15 min durch Zugabe von je 50 µl einer 1%igen SDS-Lösung gestoppt. Die

Extinktion wurde photometrisch in einem *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

4.7.9 Dot Blot

Die Präsentation der Fremdepitope an der Oberfläche der rekombinanten T7-Phagen wurde mit Hilfe eines Dot Blots nachgewiesen. Hierfür wurden die Phagen in einem Plaquetest auf LB-Agarplatten vereinzelt (siehe 4.5.3). Auf die Plaques wurde ein passendes Stück Nitrozellulose aufgelegt und nach leichtem Andrücken vorsichtig wieder entfernt. Zum Absättigen der freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulose wurde diese über Nacht bei 4°C mit Blocking-Reagenz (Roche) inkubiert. Der Nachweis der eingebauten RSV-Epitope erfolgte immunochemisch (siehe 4.7.7).

4.7.10 Immunfluoreszenztest

Mit Hilfe eines Immunfluoreszenztests wurde zum einen die Expression des HRSV-Fusionsproteins in rSeV-infizierten Zellen untersucht, zum anderen wurde diese Methode verwendet, um in den Seren der immunisierten Mäuse HRSV- bzw. SeV-spezifische Antikörper zu detektieren. Für beide Ansätze wurden Vero-Zellen in DMEM mit 5% FKS und Antibiotika suspendiert und auf Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät (180.000 Zellen pro Vertiefung). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder mit HRSV (Charakterisierung der Seren) oder rSeV (Charakterisierung der Seren, Proteinexpression) mit einer m.o.i. von 0,1 PFU/Zelle infiziert. Die Zellen wurden zuvor dreimal mit Medium ohne FKS gewaschen. Die Viren wurden für die Infektion direkt ins frische Medium gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3%igem Paraformaldehyd fixiert (20 min bei RT). Zur Entfernung des Paraformaldehyds wurden die Zellen zweimal mit 0,1 M Glycin gewaschen. Um die intrazelluläre Betrachtung zu ermöglichen, wurden einige Ansätze mit 0.2% Triton-X-100 für 5 min inkubiert. Dadurch wurden die Zellen permeabilisiert. Währenddessen wurde eine feuchte Kammer vorbereitet. Dafür wurde in eine Glaspetrischale ein feuchtes Filterpapier und darauf ein Stück Parafilm gelegt. Auf den Parafilm wurden

pro Ansatz 20 µl des entsprechenden Primärantikörpers gegeben. Kommerzielle Antikörper wurden 1:200 in PBS + 1% BSA verdünnt. Mausseren wurden in Verdünnungen von 1:50-1:1600 eingesetzt. Auf den Antikörpertropfen wurden die fixierten Deckglaskulturen so aufgelegt, dass die Zellen in direktem Kontakt mit dem Antikörper standen. Die Inkubation erfolgte für 1 Std. bei RT. Anschließend wurden die Deckgläschen wieder in die 24-Well-Platte überführt, und die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern erfolgte ebenfalls in der feuchten Kammer für 1 Std. bei RT, jedoch im Dunkeln. Die Antikörper wurden 1:200 in PBS + 1% BSA verdünnt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um Salzreste zu entfernen, wurden die Zellen einmal mit Reinstwasser gewaschen und dann mit der Zellseite auf einen Tropfen Mowiol (siehe 3.12.7, auf 37°C vorgewärmt) auf einen Objektträger aufgebracht. Die Proben wurden bei 4°C gelagert und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

FITC-gekoppelte Antikörper:	Absorption bei 495 nm	Emission bei 528 nm
Cy TM - gekoppelte Antikörper:	Absorption bei 495 nm	Emission bei 528 nm

4.7.11 Präparation von Zell-Lysaten für eine anschließende Western Blot-Analyse

Vero-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte in DMEM mit 5% FKS ausgesät (500.000 Zellen pro Vertiefung) und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Infektion mit HRSV oder rSeV erfolgte am nächsten Tag. Dafür wurden die Zellen dreimal mit Medium ohne FKS gewaschen und anschließend direkt mit einer m.o.i. von 0,1 PFU/Zelle infiziert. Die Inkubation der RSV-infizierten Zellen erfolgte 2 Tage, die der SeV-infizierten Zellen erfolgte einen Tag bei 37°C und 5% CO₂. Für die Lyse wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann mit je 500 µl NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die lysierten Zellen in dem Puffer suspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 20.800 x g und 4°C, wurde der proteinhaltige Überstand 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.7.12 Virusneutralisationstest

Mausseren wurden für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. In einer Mikrotiterplatte wurde von dem zu untersuchenden Serum eine Verdünnungsreihe in Zweierpotenzen in DMEM angelegt (Vierfachansatz). Das Serum lag dazu in einer 1:10 Ausgangsverdünnung vor. Als Negativkontrolle diente DMEM. Pro Vertiefung wurden 100 KID₅₀ /50 µl einer Virussuspension hinzugegeben. Virus und Antikörper wurden mit einer Mehrkanalpipette gemischt und anschließend für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl einer Vero-Zellsuspension (200.000 Zellen/ml) wurde der Ansatz für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Fixieren und Färben der infizierten Zellen erfolgte analog zum Immunoplaquetest (siehe 4.5.1, 4.5.2). Es erfolgte eine mikroskopische Auswertung. Der Antikörpertiter im Serum ergibt sich aus dem reziproken Wert der Verdünnungsstufe bei der 50% der infizierten Probanden vor der Testvirusdosis geschützt waren. Er wird als Neutralisationsdosis 50 (ND₅₀) ausgedrückt. Bei der Berechnung kam die Gleichung nach Kärber zur Anwendung (Kärber, 1931).

4.8 Tierversuche

4.8.1 Immunisierung von Balb/c Mäusen mit rekombinanten T7-Phagen

Die Genehmigung war am 12.03.2001 erteilt worden (AZ 509c-42502-01/403).

6 Wochen alte, weibliche Balb/cABom Inzucht-Mäuse wurden bezogen von M&B, Dänemark. Die Tiere wurden in Macrolon-Käfigen Typ IV, in Gruppen zu je 5 Tieren gehalten. Eine Woche nach Ankunft wurden die Tiere subkutan mit je 100 µg gereinigten T7-Phagen in einem Volumen von 120 µl Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium), ohne Zugabe eines Adjuvans immunisiert. Es wurden mehrere Konstrukte miteinander kombiniert, um die Zahl an Versuchstieren möglichst gering zu halten. Die Einteilung der einzelnen Gruppen ist in Tab. 4.1 dargestellt.

21 Tage nach der Immunisierung erfolgte eine Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus, und den Tieren wurden in einer ersten Folgeimmunisierung erneut rekombinante Phagen subkutan appliziert (Kanüle: 0,4 x 20 mm).

Gruppe	T7-Konstrukte
1	Wildtyp-Phage
2	F-Rep1 Klone 4 + 8 F-Rep2 Klon 1
3	F-1a Klon 2 + 6 F-1b Klon 1
4	F-2a Klon 1
5	F-2b Klon 8 F-Rep3 Klon 1
6	Gemisch aus allen 9 Konstrukten

Tabelle 4.1: Einteilung der verschiedenen T7-Konstrukte in 6 Immunisierungsgruppen.

21 Tage nach der ersten Folgeimmunisierung wurde den Mäusen erneut Blut abgenommen, und es wurde eine 3. Immunisierung mit je 100 µg Phagenprotein diesmal in einem Volumen von 100 µl durchgeführt. 14 Tage nach der 3. Immunisierung wurden erneut Blutproben genommen. Aus allen Blutproben wurde Serum gewonnen (4°C und 6.000 x g, für 5 min), und die Seren wurden im Western Blot, im Virusneutralisationstest und in der Immunfluoreszenz auf HRSV-spezifische, bzw. HRSV-neutralisierende Antikörper untersucht.

Die Tiere der Gruppen 1, 4 und 6 wurden für eine Belastungsinfektion intranasal mit $3,6 \times 10^6$ PFU HRSV in einem Volumen von 50 µl infiziert. Es handelte sich dabei um auf HBE-Zellen vermehrtes Virus (siehe 4.4.1). Für die Infektion wurde das Virus mit einer 100 µl Pipette tröpfchenweise auf die Nase der Maus aufgebracht. 4 Tage nach Infektion wurden die Tiere in ihren Käfigen in CO₂-Atmosphäre getötet (Fließgeschwindigkeit: 4 l pro min). Zur Bestimmung des Virustiters in den Lungen wurden diese entnommen und in sterile 15 ml Röhren (Greiner) überführt. Die Lungen wurden einmal in sterilem PBS gewaschen und in ein neues Röhren mit

2 ml Lungen-Puffer (siehe Material 3.12.1) überführt. In diesen Röhrchen wurden die Lungen mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Dispergierwerkzeug S 25N-8G) homogenisiert. Die Lungen wurden vor, während und nach der Homogenisierung auf Eis gelagert. Alle Lungenhomogenate wurden mit Lungen-Puffer auf ein Volumen von 3 ml eingestellt. Die Zelltrümmer wurden bei 1559 x g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und entweder sofort titriert, oder in Kryoröhrchen zu 1 ml Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Titration bei -80°C gelagert. Die Lagerung bei -80°C führte zu einem Titerverlust von mindestens einer Logstufe. Die Titration der Homogenate erfolgte in Doppelansätzen auf Vero-Zellen (siehe 4.5.1). Auch die nicht infizierten Versuchstiere wurden am Versuchsende in ihren Käfigen in CO₂-Atmosphäre getötet.

4.8.2 Immunisierung bzw. Infektion von Mäusen mit rekombinanten Sendai-Viren

Die Genehmigung war am 01.04.2003 erteilt worden (AZ 509c-42502-03/649).

Die Tierhaltung erfolgte unter S2-Bedingungen.

Balb/c Inzucht-Mäuse wurden bezogen vom Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover (Vorversuch) und von Taconic M&B, Dänemark (Hauptversuch). Die Tiere wurden in Macrolon-Käfigen Typ IV, in Gruppen zu je 3 Tieren (Vorversuche), bzw. zu je 5 Tiere (Hauptversuch) gehalten.

Für den Vorversuch wurden die Tiere 4 Tage nach ihrer Ankunft mit unterschiedlichen Konzentrationen von gereinigtem (siehe 4.6.1) SeV/DsRed (siehe Abb. 5.6) in einem Volumen von 25 µl intranasal infiziert. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe mit nicht-infizierten Tieren gehalten. Diesen Tieren wurden je 25 µl DMEM nasal verabreicht.

Es wurde eine tägliche Gewichtskontrolle durchgeführt, und die Tiere wurden auf Krankheitssymptome untersucht. 14 Tage nach der Infektion erfolgte bei allen Tieren eine Blutentnahme durch Punktion der Schwanzvene (Kanüle: 0,4 x 20 mm). Die Tiere wurden zuvor für einige Minuten unter einer Rotlichtlampe erwärmt, um den Blutkreislauf anzuregen. Die Blutproben jeweils einer Gruppe wurden gemischt, und durch Zentrifugation bei 4°C und 6.000 x g für 5 min wurden die Seren gewonnen. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für den Hauptversuch wurden die Mäuse 8 Tage nach Ankunft mit den unterschiedlichen rekombinanten Sendai-Viren (SeV-DsRed, SeV/HRSV-F, SeV/HRSV-F-Del-pep27 und SeV/HRSV-F-Del-TM) nasal infiziert (pro Maus 2×10^4 PFU in 25 μ l DMEM). Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe mit nicht-infizierten Tieren gehalten. Diesen Tieren wurden je 25 μ l DMEM nasal verabreicht. Während der gesamten Versuchszeit wurde eine tägliche Gewichtskontrolle durchgeführt. 13 Tage nach der ersten Infektion wurden analog zum Vorversuch Blutproben genommen. 14 Tage nach der ersten Infektion wurden die Tiere erneut mit 2×10^4 PFU in 25 μ l DMEM der entsprechenden rekombinanten Viren infiziert bzw. immunisiert. 21 Tage nach der 2. Infektion wurden erneut Blutproben genommen und die Tiere wurden für eine Belastungsinfektion mit $3,6 \times 10^6$ PFU HRSV in einem Volumen von 50 μ l nasal infiziert. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte analog zu Versuch 4.8.1.

5. Ergebnisse

5.1 Rekombinante T7-Phagen als HRSV-Impfstoff

5.1.1 Auswahl immunogener Epitope des HRSV-Fusionsproteins

Wie in der Einleitung erwähnt ist (siehe 1.1.4), wurden bereits eine Reihe antigener Domänen auf dem RSV-Fusionsprotein identifiziert. Ausgehend von den vorliegenden Informationen wurden in dieser Arbeit bestimmte Bereiche auf dem RSV-F-Protein festgelegt, die als Peptide in rekombinante Bakteriophagen eingebaut und auf ihre immunogene Wirkung untersucht werden sollten (siehe Tab. 5.1). Zusätzlich zu den bereits bekannten Epitopen wurden zwei weitere Peptide (Rep1 und Rep3) ausgewählt, die wie auch das Peptid Rep2, in den Bereichen der *heptad repeats* des HRSV-F-Proteins lokalisiert sind (siehe Abb. 1.3). Alle ausgewählten Peptide sind in Tabelle 5.1 aufgeführt (siehe auch Abb. 1.4).

Name	AS-Sequenz	Länge	Literaturangabe
F-Rep1	156-171	16 AS	
F-Rep2	170-190	22 AS	Langedijk et al., 1998
F-Rep3	510-524	15 AS	
F-1a	205-225	21 AS	Bourgeois et al., 1991 Corvaisier et al., 1993
F-1b	216-234	19 AS	Trudel et al., 1987; 1991
F-2a	255-287	33 AS	Lounsbach et al., 1993
F-2b	282-298	17 AS	Paradiso et al., 1991 Martin-Gallardo et al., 1991
F-3	426-451	27 AS	Lopez et al., 1998

Tabelle 5.1: Ausgewählte Epitope auf dem RSV-Fusionsprotein.

5.1.2 Herstellung rekombinanter T7-Phagen

Die Herstellung rekombinanter T7-Phagen erfolgte mit Hilfe des *T7Select Cloning Kits™* der Firma Novagen, der unter 1.2.4 ausführlich beschrieben ist. Verschiedene Peptide des HRSV-Fusionsproteins wurden ausgewählt (siehe Ergebnisse 5.1.1) und mittels PCR aus einem pTM1 Vektor amplifiziert (siehe 4.1). Nach Restriktionsverdau der amplifizierten Fragmente wurden diese so in das Genom des T7-Phagen inseriert, dass chimäre Proteine aus dem Kapsidprotein des Phagen und den einzelnen HRSV-Peptiden entstanden. Das T7-Genom wurde mit Hilfe phageneigener Proteine aus T7-infizierten Zellen (Son et al., 1987) zu infektiösen Viruspartikeln verpackt. Diese wurden kultiviert und anschließend in einem Plaquetest vereinzelt. Von jedem Konstrukt wurden mehrere Plaques gepickt. In einer PCR wurde der inserierte Bereich zusammen mit angrenzenden Teilen des T7-Genoms amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in Auftragsarbeit (MWG, Ebersberg) sequenziert.

Trotz wiederholter Klonierung und Sequenzierung vieler Klone war es nicht möglich in alle 8 Konstrukte eine fehlerfreie Peptidsequenz zu inserieren. Bei den Konstrukten F-Rep1, F-1a, F-2a und F-2b wurde daher zunächst mit fehlerhaften Klonen weitergearbeitet. Hier waren die HRSV-Peptide entweder verkürzt oder sie enthielten Aminosäure-Austausche. Die fehlerhaften Klone sind in Tabelle 5.2 dargestellt.

Um sicherzustellen, dass die rekombinanten Phagen klonal vorlagen, wurden die Viren 2 x Plaque-gereinigt (siehe 4.6.2) und erneut sequenziert. Bei allen Konstrukten waren die Sequenzen vor und nach der Plaque-Reinigung identisch. So konnte außerdem sichergestellt werden, dass die inserierten Sequenzen auch nach mehreren Viruspassagen stabil im T7-Genom vorlagen.

Zusätzlich zu den rekombinanten T7-Phagen, denen Sequenzen des HRSV-F-Gens ins Genom inseriert wurden, wurde ein T7-Phage erzeugt, der lediglich die modifizierte T7-DNA (mit *multiple cloning site*, siehe Abb. 1.7), jedoch keine Fremdsequenzen enthält. Dieser Phage diente in den weiteren Versuchen als Vergleichsvirus und wurde mit T7-Wildtyp bezeichnet.

Konstrukt	Original Sequenz	AS-Sequenz	Fehlerhafte Klone
T7-F-Rep1	156-171	156-171	Rep1 Klon 4: 164/V/A
		156-168	Rep1 Klon 8
T7-F-1a	205-225	205-222++	1a Klon 2: Leserastersprung an Position 222, daher um 11 AS verlängert
		205-220	1a Klon 6
T7-F-2a	255-287	255-287	2a Klon 1: 286/Y/S
T7-F-2b	282-298	282-297	2b Klon 8

Tabelle 5.2: Sequenzen der rekombinanten T7-Phagen mit fehlerhaften HRSV-Peptiden.

5.1.3 Charakterisierung der rekombinanten Phagen

Die unterschiedlichen Konstrukte zeigten keine Unterschiede in ihrem Wachstumsverhalten. Bei der Kultivierung erreichten alle Konstrukte gleich hohe Virustiter (ca. 10^{11} PFU/ml).

Für die immunologische Charakterisierung der rekombinanten Phagen standen mehrere monoklonale Antikörper gegen das HRSV-Fusionsprotein zur Verfügung (siehe Material 3.9.2, mab 1-12). Bei diesen Antikörpern handelte es sich zum Teil um kommerziell erworbene Antikörper (mab 1-3), weitere Antikörper wurden uns von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt (mab 4-11). Es war nicht bekannt gegen welche Epitope des F-Proteins die Antikörper gerichtet waren. Mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern wurden die rekombinanten Phagen im Western- (siehe Methoden 4.8.6) und Dot-Blot (siehe Methoden 4.8.9) und in einem ELISA (siehe Methoden 4.8.8) genauer untersucht.

5.1.3.1 Charakterisierung der rekombinanten Phagen im Western Blot

Die rekombinanten Phagen wurden in einer Bakterienkultur (*E. coli* BL21) vermehrt (siehe Methoden 4.4.3). Die Proteine des Lysats wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Das chimäre Kapsidprotein wurde

durch ein Gemisch aus mehreren HRSV-spezifischen monoklonalen Antikörpern in einer Enzymreaktion (Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper) sichtbar gemacht (siehe Methoden 4.7.7).

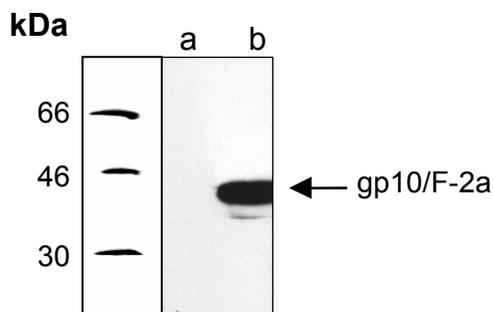


Abbildung 5.1:

Darstellung des chimären Proteins aus gp10 und F-2a im Western Blot, mit Hilfe HRSV-F-spezifischer monoklonaler Antikörper (1:100 in PBSM verdünnt). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen, d.h. in der Gegenwart von DTT.

a = Wildtyp T7-Phage, Lysat infizierter Zellen

b = T7-F-2a, Lysat infizierter Zellen

Abb. 5.1 zeigt das chimäre Protein aus gp10 und F-2a. Das Gemisch aus den HRSV-F-spezifischen monoklonalen Antikörpern erkannte im Lysat des Konstruktes T7-F-2a eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 42 kDa, die im Lysat des Wildtyp-Phagen fehlt. Das in das Kapsidprotein inserierte F-Peptid wird also von den monoklonalen Antikörpern erkannt. Die anderen Konstrukte zeigten im Western Blot keine Reaktion mit den RSV-spezifischen Antikörpern (Daten nicht gezeigt).

5.1.3.2 Charakterisierung der rekombinanten Phagen im Dot Blot

Um die Präsentation der eingebauten Peptide an der Virusoberfläche nachzuweisen, wurden die intakten rekombinanten Phagen mit Hilfe eines Dot Blots (siehe Methoden 4.8.9) auf Nitrozellulose übertragen. Durch Inkubation mit HRSV-F-spezifischen monoklonalen Antikörpern wurden die auf der Phagenoberfläche exponierten F-Peptide in einer Enzymreaktion mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper sichtbar gemacht (siehe Methoden 4.7.7).

In Abbildung 5.2 erkennt man Plaques des rekombinanten Phagen T7-F-2a, die mit Hilfe HRSV-spezifischer monoklonaler Antikörper immunochemisch gefärbt wurden. Das eingebaute Fremdpeptid F-2a wird also an der Oberfläche des rekombinanten Phagen exponiert.

Plaques des Wildtyp-Phagen und der anderen Konstrukte zeigten im Dot Blot keine Reaktion (Daten nicht gezeigt).

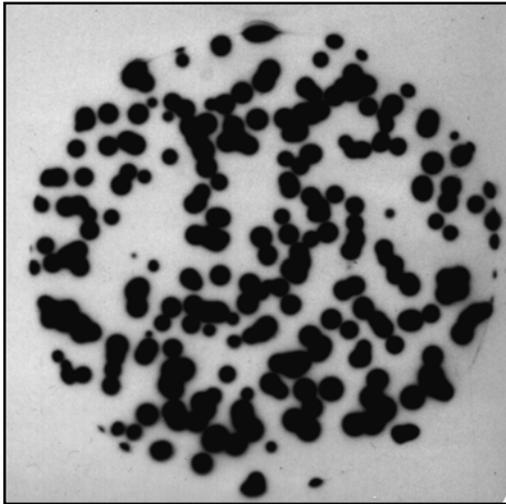


Abbildung 5.2:

Darstellung des F-2a-Peptides auf der Phagenoberfläche. Der Nachweis erfolgte in einem Dot Blot mit HRSV-spezifischen monoklonalen Antikörpern (1:100 in PBSM verdünnt) und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper.

5.1.3.3 Charakterisierung der rekombinanten Phagen im ELISA

Da die Konstrukte F-Rep1, F-Rep2, F-1a, F-1b, F-2b, F-3 und F-Rep3 weder im Western- noch im Dot-Blot eine Reaktion mit den zur Verfügung stehenden RSV-spezifischen monoklonalen Antikörpern zeigten, wurde nur der Phage T7-F-2a in einem ELISA (siehe Methoden 4.7.8) einzeln mit neun verschiedenen Antikörpern inkubiert. Hierfür wurden die Phagen aus dem Lysat infizierter Zellen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe einer Enzymreaktion sichtbar gemacht (siehe 4.7.8). In einem Kontrollansatz wurden die Phagen nur mit den Anti-Maus-Immunglobulinen und nicht mit einem RSV-spezifischen Antikörper inkubiert.

Abb. 5.3 zeigt eine deutliche Reaktion des rekombinanten Phagen T7-F-2a mit drei monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher Herkunft. Bei den Antikörpern 1 und 3 handelt es sich um kommerziell erworbene Produkte der Firmen dianova (mab 1) und Serotec (mab 3). Antikörper 8 wurde von der Arbeitsgruppe J. A. Melero (Madrid) zur Verfügung gestellt (mab 7). Antikörper 1 zeigt die stärkste Reaktion. In einem Versuch unter den selben Bedingungen zeigten weder der Wildtyp Phage, noch die anderen T7-Konstrukte eine spezifische Reaktion mit den Antikörpern (Daten nicht gezeigt).

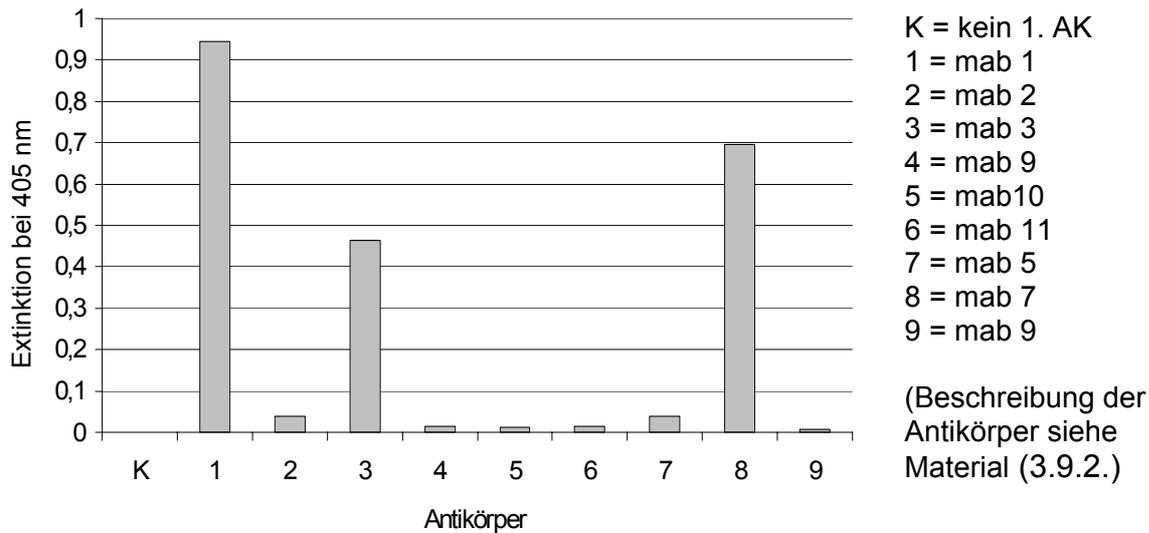


Abbildung 5.3: Untersuchung des rekombinanten Phagen T7-F-2a mit unterschiedlichen RSV-spezifischen Antikörpern im ELISA.

Die Antikörper 1, 2, 3, 7, 8 und 9 wurden 1:500 in PBSM verdünnt. Die Antikörper 4, 5 und 6 lagen als Hybridoma-Zellkulturüberstand vor und wurden daher nur in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.

5.1.4 Reinigung der rekombinanten Phagen

Für die Immunisierung von Mäusen war es wichtig, die rekombinanten Phagen entsprechend sorgfältig zu reinigen. Bakterielle Proteine sollten möglichst vollständig abgetrennt werden, um im Mausmodell eine rein phagenspezifische Immunantwort zu induzieren. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe eines CsCl_2 -Stufengradienten (siehe Methoden 4.6.3) aus einer 400 ml Bakterienkultur. Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurden gleiche Volumina der präparierten Phagen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE (siehe Methoden 4.7.7) aufgetrennt, und mit Coomassie-Lösung gefärbt.

In Abb. 5.4 sind die Proteine der gereinigten Phagen nach ihrer Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel dargestellt. Alle 11 Konstrukte zeigen identische Bandenmuster. Im Gel ist ein leichter *smile*-Effekt erkennbar. Die stärkste Bande stellt bei jedem Konstrukt das chimäre Protein aus gp10 und HRSV-Peptid dar, da dieses Protein im Viruspartikel mit der höchsten Molekülzahl vorliegt (415 Kopien). Die chimären Proteine weisen, verglichen mit dem Standard, ein relatives Molekulargewicht von ca. 42 kDa auf.

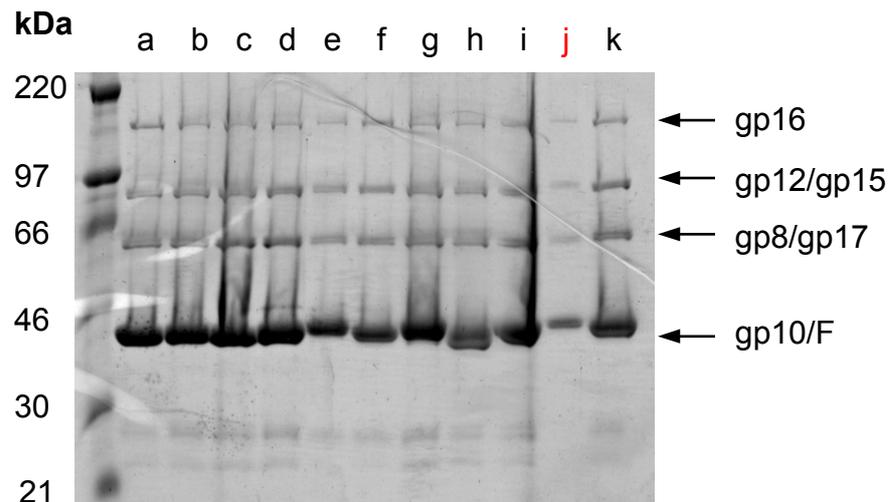


Abbildung 5.4: Darstellung gereinigter Phagen im SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung. A = T7-Wildtyp, b = F-Rep1 Klon 4, c = F-Rep1 Klon 8, d = F-Rep2, e = F-1a Klon 2, f = F-1a Klon 6, g = F-1b, h = F-2a, i = F-2b, j = F-3, k = F-Rep3

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen, d.h. in Gegenwart von DTT.

Bei einem Molekulargewicht von ca. 144 kDa erkennt man das Core-Protein gp16. Zwischen 66 und 97 kDa ist eine weitere Bande lokalisiert, die die viralen Proteine gp12 (89 kDa, 6 Kopien pro Partikel) und/oder gp15 (84 kDa, 12 Kopien pro Partikel) darstellt. Mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 60 kDa sind die viralen Proteine gp8 (59 kDa, 12 Kopien pro Partikel) und gp17 (61 kDa, 18 Kopien pro Partikel) dargestellt. Im unteren Bereich des Gels erkennt man weitere, jedoch nur schwach gefärbte Banden mit relativen Molekulargewichten von weniger als 30 kDa. Hier befinden sich die viralen Proteine gp3 (17 kDa), gp11 (22 kDa), gp13 (16 kDa) und gp14 (21 kDa). Verunreinigungen durch bakterielle Proteine sind nicht zu erkennen.

Das Konstrukt T7-F-3 (Abb. 5.4, Spur j) zeigt ein deutlich schwächer ausgeprägtes Bandenmuster im Vergleich zu den anderen rekombinanten Phagen, was auf eine geringere Proteinkonzentration zurückzuführen ist. Auch bei wiederholter Phagenpräparation zeigte das Konstrukt nicht die nötige Stabilität, um eine für die Immunisierung ausreichende Proteinkonzentration zu erhalten. Es wurde daher in den anschließenden Immunisierungsversuchen nicht berücksichtigt.

5.1.5 Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten T7-Phagen

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte wie in Punkt 6.9.1 beschrieben. In weiteren Versuchen wurden die Seren der immunisierten Tiere charakterisiert. Die Bildung T7- bzw. HRSV-spezifischer Antikörper wurde mit Hilfe von Western Blot (siehe 4.7.6) und Immunfluoreszenztest auf HRSV-infizierten Zellen untersucht (siehe Methoden 4.7.10). Der Nachweis HRSV-neutralisierender Antikörper erfolgte im Virus-Neutralisationstest (siehe Methoden 4.7.12). In einem letzten Versuchsansatz wurden die immunisierten Tiere mit HRSV infiziert (*HRSV-Challenge*), um die protektive Wirkung der Antikörper zu untersuchen.

5.1.5.1 Nachweis T7- und HRSV-spezifischer Antikörper

Zunächst wurden die Proteine des Wildtyp T7-Phagen aus dem Bakterien-Lysat in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Je ein Streifen mit aufgetrennten Phagenproteinen wurde mit den Seren der einzelnen Immunisierungsgruppen (siehe Tab. 4.1) inkubiert. Die Seren wurden dafür in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Immunglobulinen detektiert (siehe Methoden 4.7.7).

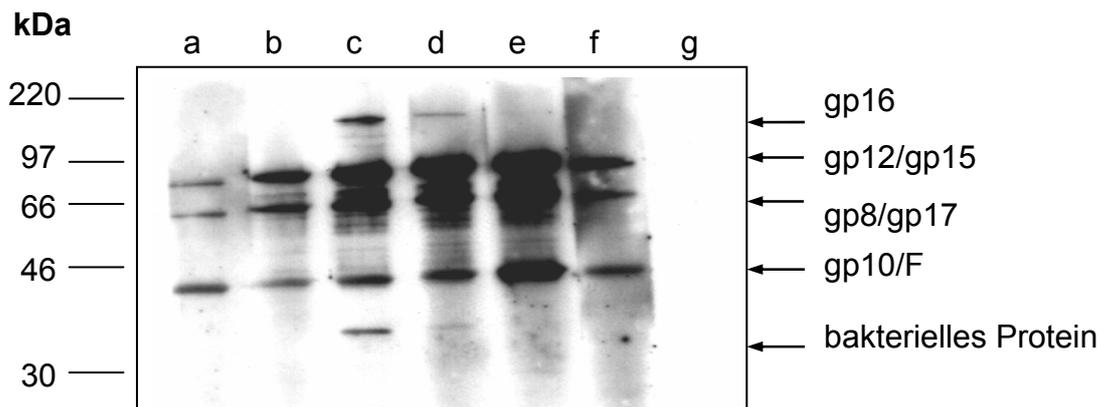


Abbildung 5.5: Nachweis T7-spezifischer Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse.

A = Wildtyp T7, b = F-Rep1 und F-Rep2, c = F-1a und F-1b, d = Mix, e = F-2b und F-Rep3, f = F-2a, g = nicht immunisierte Maus. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen, d.h. in Gegenwart von DTT.

Abb. 5.5 zeigt die Proteine des T7-Phagen, die von den Seren der einzelnen Gruppen erkannt werden. Als Negativkontrolle diente das Serum einer nicht immunisierten Maus. Neben den bereits in Abb. 5.4 beschriebenen Proteinen gp16, gp12, gp15, gp8, gp17 und dem Fusionsprotein gp10/F findet man in diesem Blot noch weitere Banden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um bakterielle Proteine, die trotz Reinigung über einen CsCl₂-Gradienten nicht vollständig entfernt werden konnten. Bei der Immunisierung könnten so von den Mäusen ebenfalls Antikörper gegen diese bakteriellen Proteine gebildet worden sein.

Besonders stark sind die T7-spezifischen Banden von gp12/gp15, gp8/gp17 und gp10/F. Bei den Proteinen gp12 (Schwanz), gp17 (Schwanzfasern) und gp10/F (Kapsid) handelt es sich um Proteine, die an der Partikeloberfläche exponiert werden. Bei gp15 und gp16 handelt es sich um Proteine des inneren Cores, die im Immunsystem der Maus eine schwächere humorale Immunantwort induzieren. Obwohl das Kapsidprotein gp10/F mit 415 Kopien im Virus-Partikel am häufigsten vorkommt (siehe auch Abb. 5.4), sieht man in den Spuren b-f eine stärkere Reaktion der Seren mit den Schwanz- bzw. Schwanzfaserproteinen gp12 und gp17.

Für den Nachweis HRSV-spezifischer Antikörper in den Seren der immunisierten Mäuse wurden diese zunächst im Western Blot untersucht. Hierfür wurden Zell-Lysate HRSV-infizierter Vero-Zellen (siehe Methoden 4.7.11) in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Je ein Streifen mit aufgetrennten Zell-Lysat-Proteinen wurde mit den Seren der einzelnen Immunisierungs-Gruppen (siehe Tab. 4.1) inkubiert. Gebundene Antikörper sollten mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Immunglobulinen immunochemisch nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde ein monoklonaler AK gegen das F-Protein von HRSV eingesetzt. Die Seren zeigten im Blot jedoch keine RSV-spezifische Reaktion (Daten nicht gezeigt).

Auch in einem anschließenden Immunfluoreszenztest mit HRSV-infizierten Vero-Zellen konnte bei einer Serum-Verdünnung von 1:50 keine spezifische Reaktion der Seren gezeigt werden.

5.1.5.2 Nachweis HRSV-neutralisierender Antikörper

Für den Nachweis HRSV-neutralisierender Antikörper in den Seren der immunisierten Mäuse wurde ein Virus-Neutralisationstest (siehe Methoden 4.7.12) durchgeführt. Die Seren wurden aufgrund der geringen Menge an Serum, die zur Verfügung stand, 1:10 in Dulbecco's MEM vorverdünnt. Als Positivkontrolle diente ein monoklonaler Anti-RSV-Antikörper (mab9, siehe 3.9.2).

Tab. 5.3 zeigt, dass nur in den Gruppen 4 (T7-F-2a), 5 (T7-F-2b und T7-F-Rep3) und 6 (T7-Mix) Virus-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die Antikörpertiter von 10 ND₅₀ und 17 ND₅₀ sind jedoch wesentlich niedriger als erwartet. In den anderen Gruppen lagen die Antikörpertiter alle unterhalb von 10 ND₅₀ und somit unterhalb der Nachweisgrenze. Auch beim Wildtyp-Phagen war bei einer hohen Antikörperkonzentration (z.B. 1:10 oder 1:20 Verdünnung) die Anzahl infizierter Zellen etwas reduziert. Das lässt auf eine unspezifische Neutralisationseigenschaft des Serums schließen.

Gruppe (Mäuse)	T7-Konstrukte	Titer neutralisierender Antikörper (ND ₅₀ /50 µl)
1	Wildtyp-Phage	< 10
2	F-Rep1 Klone 4 + 8	< 10
	F-Rep2 Klone 1	
3	F-1a Klone 2 + 6	< 10
	F-1b Klone 1	
4	F-2a Klone 1	14
5	F-2b Klone 8	17
	F-Rep3 Klone 1	
6	Gemisch aus allen 9 Konstrukten	17
	mab9: Vergleichsantikörper	316

Tabelle 5.3: HRSV-neutralisierende Antikörper in den Seren von Mäusen, immunisiert mit rekombinanten T7-Phagen.

5.1.5.3 HRSV-Challenge

Aufgrund der vorangegangenen Versuchsergebnisse wurden zunächst nur drei der sechs Gruppen mit HRSV infiziert: die Kontrollgruppe, die mit dem Wildtyp-Phagen immunisiert wurde, die Gruppe die mit dem Konstrukt T7-F-2a immunisiert wurde, da dieses im Western Blot und im ELISA mit monoklonalen Antikörpern eine positive Reaktion zeigte (siehe Ergebnisse 5.1.3.1 und 5.1.3.3), und die Gruppe, die mit dem Gemisch aus allen Konstrukten immunisiert wurde. Die Infektion und die Titration der Lungenhomogenate erfolgte wie unter 4.8.1 beschrieben. Die Homogenate wurden bis zur Titration bei -80°C gelagert. Die Ergebnisse der Titration sind in Tabelle 5.4 dargestellt.

Konstrukt	Virustiter in den Lungen infizierter Tiere (PFU/Lunge)
Wildtyp (Kontrolle)	$3,5 \times 10^4$
T7-F-2a	4×10^4
T7-Gemisch	2×10^4

Tabelle 5.4: Nachweis einer HRSV-Infektion in Mäusen, immunisiert mit rekombinanten T7-Phagen.

Weder die Tiere der Gruppe, die mit dem T7-F-2a Konstrukt immunisiert wurden, noch die Tiere, die mit einem Gemisch aus allen Konstrukten immunisiert wurden, waren vor einer HRSV-Infektion geschützt. In den Lungen der infizierten Tiere konnten HRSV-Titer von 10^4 PFU/Lunge nachgewiesen werden. Dieselben Titer wurden in den Kontrolltieren nachgewiesen, die nur mit dem Wildtyp-Phagen ohne HRSV-Epitope immunisiert worden waren. Die geringe Menge HRSV-neutralisierender Antikörper, die für das Konstrukt T7-F-2a nachgewiesen werden (siehe Tab. 5.3) konnte, reichte nicht aus, um die Tiere vor einer HRSV-Infektion zu schützen.

5.2 Rekombinante Sendai-Viren als HRSV-Impfstoff

Mit den T7-Phagen war versucht worden, mit ausgewählten Peptiden aus dem HRSV-F-Protein eine Immunantwort gegen HRSV zu induzieren. In einem zweiten Ansatz sollte das gesamte F-Protein bzw. die gesamte Ektodomäne zur Immunisierung verwendet werden. Hierfür wurden rekombinante Sendai-Viren als Expressionssystem verwendet.

5.2.1 Herstellung rekombinanter Sendai-Viren

Die Herstellung der rekombinanten Viren erfolgte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Wolfgang Neubert, Molekulare Virologie, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. (siehe Einleitung 1.3.3). Es wurden drei unterschiedliche Viren erzeugt. Alle drei enthielten zusätzlich zu den Sendai-Genen das Gen für eine bestimmte Form des HRSV-F-Proteins. Der Einbau des Fremdgens erfolgte zwischen Gen P und Gen M im Sendai-Virus Genom (Abb. 5.6 A). Zusätzlich stand uns ein Virus zur Verfügung, das das Gen für DsRed enthielt (siehe Abb. 5.6 A). Dieses Virus wurde im weiteren Verlauf als Vergleichsvirus eingesetzt. In Abb. 5.6 B sind die drei unterschiedlichen Formen des RSV-Fusionsproteins dargestellt. Die Gene codieren für: das authentische HRSV-F-Protein (HRSV-F), eine lösliche Form ohne Membrananker und zytoplasmatischen Anteil (HRSV-F-Del-TM) und eine Deletionsmutante, die eine Furinspaltstelle und das Peptid pep27 fehlt (HRSV-F-Del-pep27).

5.2.2 Expression des HRSV-F-Proteins mit Hilfe rekombinanter Sendai-Viren

Die Expression der unterschiedlichen Formen des HRSV-F-Proteins (authentisches F, lösliches F und Deletionsmutante ohne pep27), wurde im Western Blot und in einem Immunfluoreszenztest untersucht. Der Western Blot wurde mit Lysaten rSeV-infizierter Vero-Zellen durchgeführt. Die Lysate wurden wie unter 4.7.11 beschrieben gewonnen. Als Positivkontrolle diente das Lysat HRSV-infizierter Zellen. Als Negativkontrollen dienten Lysate nicht-infizierter Zellen und Lysate von Zellen, die mit rSeV infiziert wurden, welches anstelle des HRSV-F-Gens das Gen für DsRed im Genom trägt (SeV/DsRed).

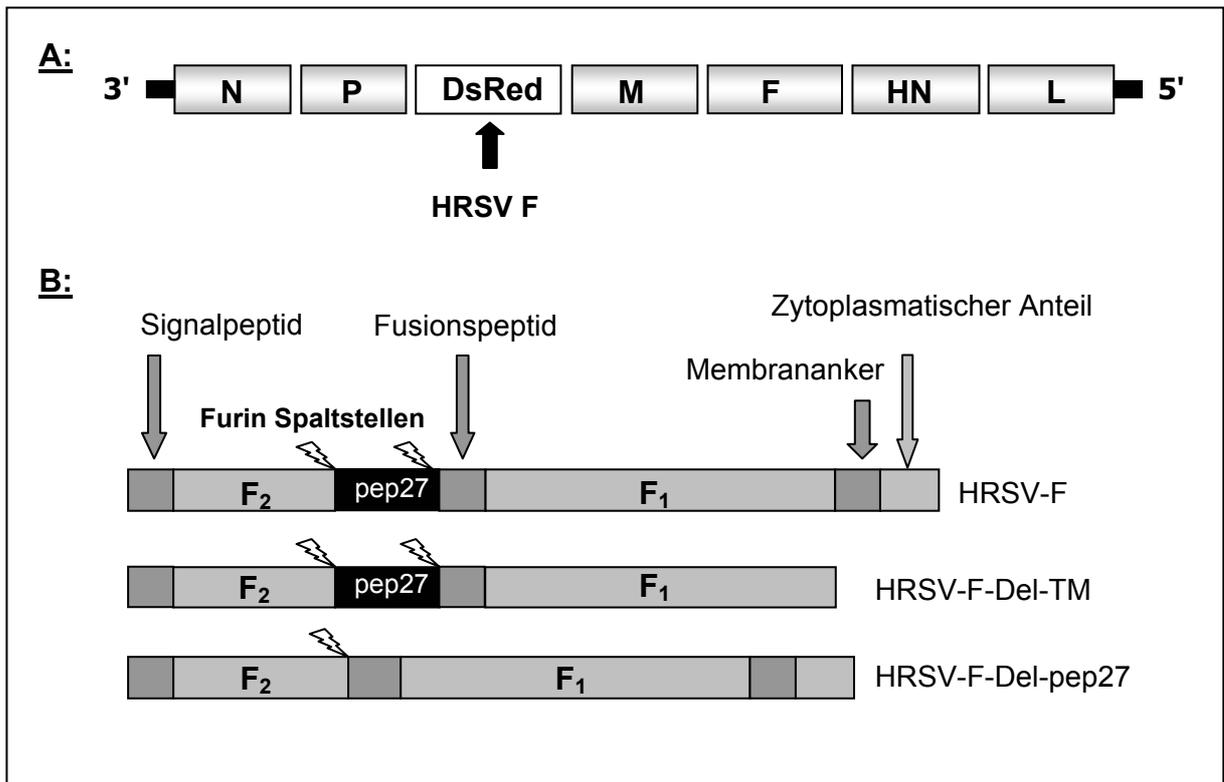


Abbildung 5.6: Unterschiedliche Formen des HRSV F-Proteins im Genom rekombinanter Sendai-Viren. **A:** Anordnung der Gene im SeV-Genom; **B:** Die unterschiedlichen Formen des HRSV-F-Proteins

Die Detektion der entsprechenden HRSV-Proteine im Western Blot erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper (mab 1), einem Anti-Maus-Biotin-Komplex, und die gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes sichtbar gemacht (siehe Methoden 4.7.7). In Abb. 5.7 sind die Ergebnisse des Western Blots dargestellt.

Das Fusionsprotein kommt in HRSV-infizierten Zellen in zwei unterschiedlichen Formen vor: als Monomer mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa und als Trimer mit einem Molekulargewicht von ca. 210 kDa. Beide Formen sind in Spur a als starke Banden dargestellt. In nicht-infizierten Vero-Zellen (Spur b) und SeV/DsRed-infizierten Zellen (Spur c) fehlen diese Banden. So können unspezifische Reaktionen der verwendeten Antikörper ausgeschlossen werden. In den Spuren d, e und f ist die Expression der rekombinanten Proteine dargestellt. Man findet bei allen drei Konstrukten F-Protein in seiner trimeren Form. Die Expression der Deletionsmutante Del-pep27 (Spur e) scheint jedoch deutlich schwächer als die des authentischen F-Proteins (Spur d). Die Expression des löslichen F-Proteins (Spur f) scheint ebenfalls schwächer zu sein, als die des authentischen F-Proteins. Die geringe intrazelluläre

Menge des F-Del-TM könnte auch damit zusammenhängen, dass dieses Protein in den Überstand der infizierten Zellen sezerniert wird.

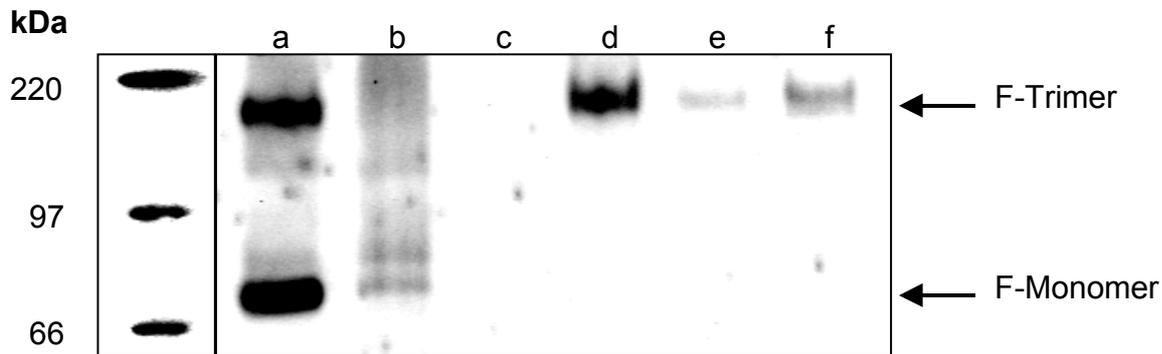


Abbildung 5.7: Expression der HRSV-F-Proteine mit Hilfe rekombinanter Sendai-Viren. Nachweis in Zell-Lysaten infizierter Zellen; a = HRSV, b = nicht infiziert, c = SeV/DsRed, d = SeV/HRSV-F, e = SeV/HRSV-F-Del-pep27, f = SeV/HRSV-F-Del-TM

Lösliches F-Protein konnte auch im Überstand infizierter Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.8). Hierfür wurde eine kleine Menge Zellkulturüberstand direkt mit SDS-Probenpuffer versetzt, in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose übertragen. In Abb. 5.8 erkennt man in Spur c sowohl die trimere auch die monomere Form des F-Proteins. Sie ist erwartungsgemäß etwas kleiner als die des authentischen F-Proteins, da ihr Membrananker und zytoplasmatischer Anteil (50 AS) fehlen.

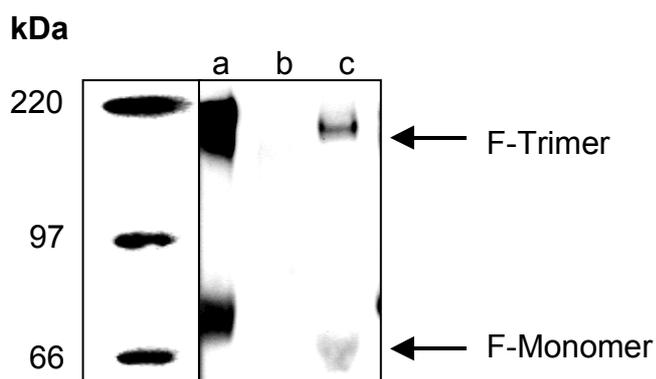


Abbildung 5.8:

Nachweis des löslichen rekombinanten F-Proteins im Überstand infizierter Zellen.
a = Lysat HRSV-infizierter Zellen (Positivkontrolle)
b = Überstand nicht-infizierter Zellen
c = Überstand SeV/HRSV-F-Del-

Zusätzlich zum Expressionsnachweis im Western Blot wurden rSeV-infizierte Vero-Zellen auch im Immunfluoreszenztest untersucht. Das Ergebnis des Western Blots sollte bestätigt und die Lokalisation der HRSV-F-Proteine in den infizierten Zellen bestimmt werden. Der Test wurde wie in Punkt 4.7.10 beschrieben durchgeführt. Für

den Proteinnachweis wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet (mab 3). Die Oberflächenimmunfluoreszenz ist in Abb. 5.9 dargestellt. Für den intrazellulären Nachweis des löslichen F-Proteins wurden die Zellen mit Triton-X-100 permeabilisiert (siehe Abb. 5.10).

Abb. 5.9 zeigt, dass nach Infektion der Zellen mit den rekombinanten Viren SeV/HRSV-F und SeV/HRSV-F-Del-pep27, HRSV-F-Protein exprimiert und zur Zelloberfläche transportiert wird. Das authentische HRSV-F-Protein (b) zeigt jedoch wie auch schon im Western Blot ein deutlich stärkeres Signal als die Deletionsmutante (c). Eine Färbung mit Anti-Parainfluenza-Serum (d), welches aufgrund von Kreuzreaktivität für den SeV-Nachweis verwendet wurde, zeigte bei der Deletionsmutante eine erfolgreiche Infektion der Zellen mit dem rekombinanten Virus. In den SeV/DsRed-infizierten Zellen (a) wurde wie erwartet kein F-Protein an der Oberfläche nachgewiesen. Unspezifische Antikörperbindungen können somit ausgeschlossen werden. Lösliches HRSV-F-Protein konnte wie erwartet nicht an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), da ohne Transmembrandomäne keine Verankerung des Proteins in die Zellmembran stattfinden kann. Das lösliche Protein wurde jedoch intrazellulär detektiert (siehe Abb. 5.10). Das Protein zeigt eine für Proteine des Golgi-Apparats charakteristische Verteilung (siehe 5.10 b).

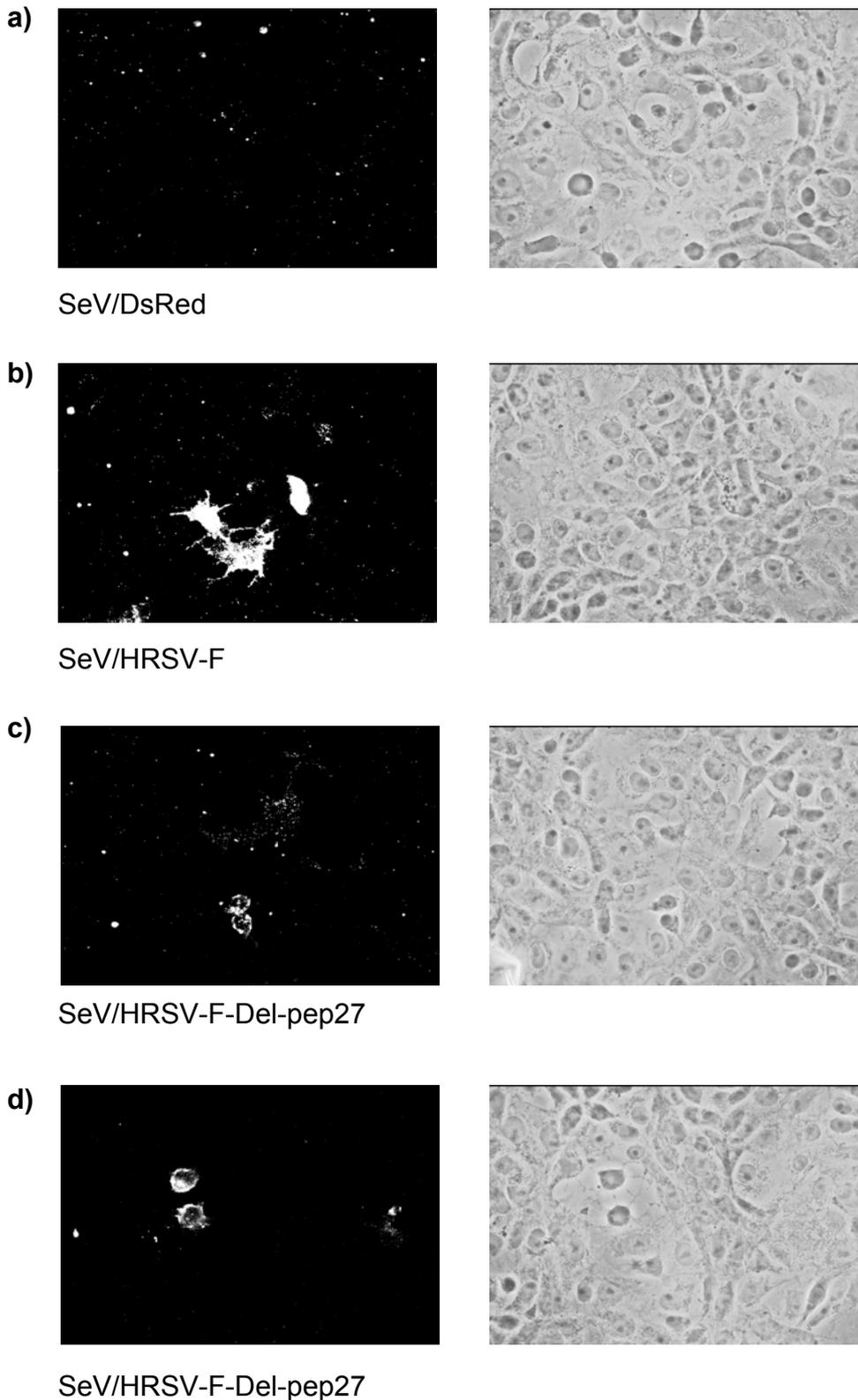


Abbildung 5.9: Expression der unterschiedlichen Formen des HRSV F-Proteins. Oberflächenimmunfluoreszenz rSeV-infizierter Zellen (links) und entsprechende Darstellung der Zellen im Durchlicht (rechts). a-c = Anti-HRSV-F, Anti-Maus-FITC; d = Anti-Parainfluenza Typ 1, Anti-Ziege Cy2TM (alle 1:200 in PBSM verdünnt).

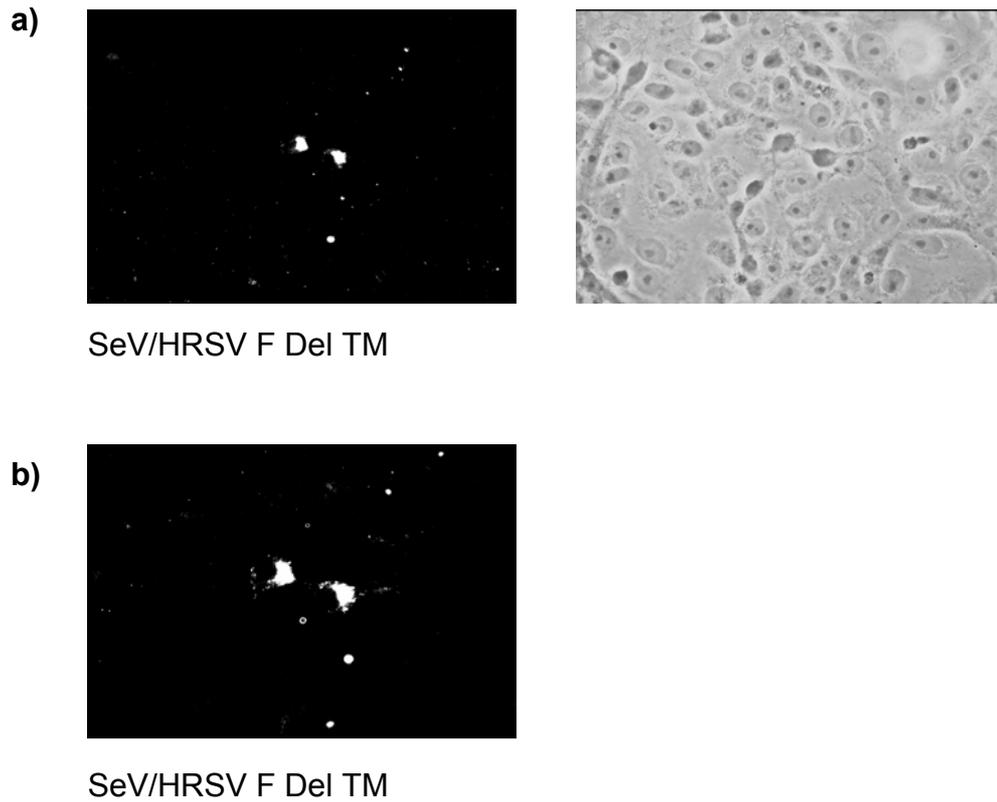


Abbildung 5.10: Intrazelluläre Immunfluoreszenz in SeV/HRSV F Del TM-infizierten Zellen. Fluoreszenz (links) und entsprechende Darstellung im Durchlicht (rechts). Abb. b zeigt einen vergrößerten Bildausschnitt. Antikörper: Anti-HRSV-F, Anti-Maus-FITC

5.2.3 Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Sendai-Viren

5.2.3.1 Optimierung der SeV-Dosis

Um die optimale Viruskonzentration für die Immunisierung zu bestimmen, wurden 1 Jahr alte Balb/c Mäuse (3 Tiere pro Gruppe) zunächst mit unterschiedlichen SeV-Konzentrationen zwischen 10^2 und 10^6 PFU/Dosis infiziert (siehe Methoden 4.8.2). Für die Infektion wurde das Vergleichsvirus SeV/DsRed verwendet. Die Tiere sollten bei einer Immunisierung keinerlei Krankheitssymptome, wie z.B. Gewichtsverlust zeigen. Trotzdem sollte durch die Infektion eine starke Immunantwort induziert werden. Die infizierten Tiere wurden zunächst über einen Zeitraum von zwei Wochen beobachtet. Dabei wurden unter anderem tägliche Gewichtskontrollen durchgeführt. Die Daten sind in Abb. 5.11 dargestellt. Die Tiere, die mit 10^6 PFU/Dosis infiziert wurden, zeigten ab Tag 4 nach Infektion erste Krankheitssymptome. Sie waren weniger lebhaft, zeigten gesträubtes Fell und begannen zu niesen. Mit dem Auftreten der Symptome kam es bei den Tieren dieser Gruppe zu einem Gewichtsverlust von bis zu 1,8 g pro Tier, innerhalb von 2 Tagen. Das entspricht einem Gewichtsverlust von 6% des Ausgangsgewichtes. Am 9. Tag nach Infektion stieg die Gewichtskurve aller drei Tiere wieder an, und an Tag 11 waren auch die Krankheitssymptome vollständig abgeklungen. Obwohl es sich bei dem rekombinanten SeV um einen in Mäusen stark attenuierten Stamm (Fushimi) handelt, ist es möglich, durch eine Infektion mit einer relativ hohen Viruskonzentration leichte Erkrankungsformen auszulösen. Bei einem SeV-Feldisolat sind jedoch schon wesentlich geringere Konzentrationen (10^2 PFU/Dosis) für die Tiere tödlich (Itoh et al., 1997; Kiyotani et al., 1990). Eine Viruskonzentration von 10^6 PFU/Dosis ist für einen Immunisierungsversuch nicht geeignet, da man die Belastung für die Tiere möglichst gering halten möchte. Eine weniger belastende Virus-Konzentration liegt bei einer SeV-Dosis von 10^4 PFU vor. Hier zeigten die Tiere weder Krankheitssymptome, noch Gewichtsverlust. Die Gewichtskurven wichen nicht von denen der nicht infizierten Kontrolltiere ab. Die Tiere dieser Gruppe wurden an Tag 15 nach der ersten Infektion mit der selben Virusdosis erneut infiziert. So sollte eine Folgeimmunisierung simuliert werden. Auch diese zweite Infektion verlief ohne Symptome.

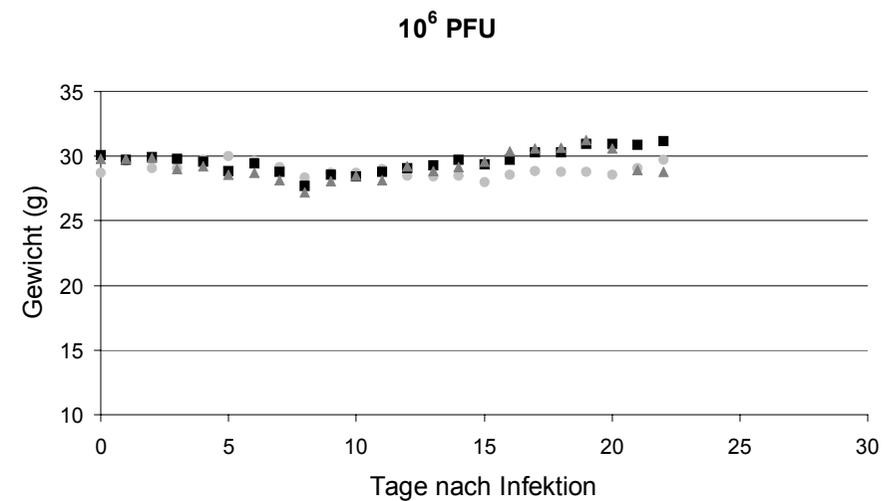
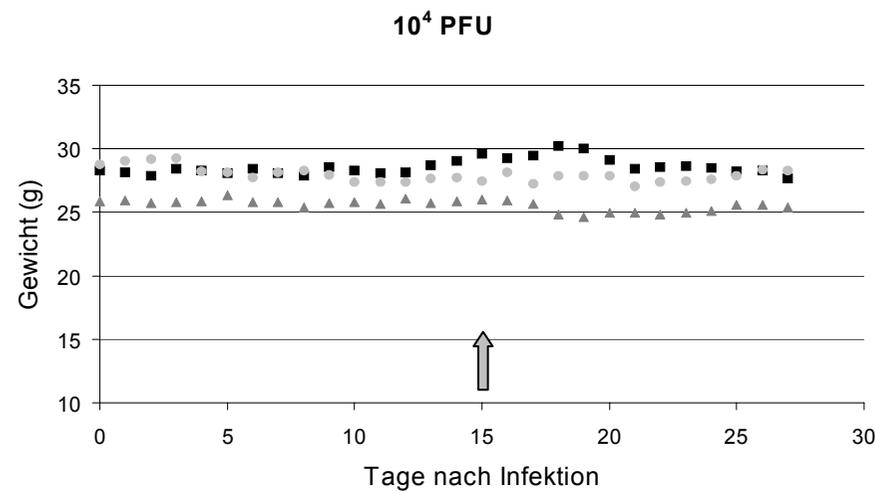
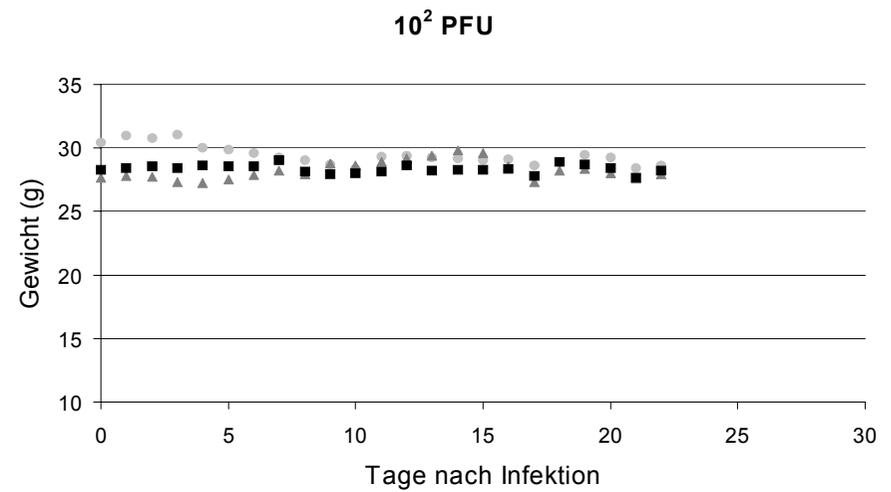
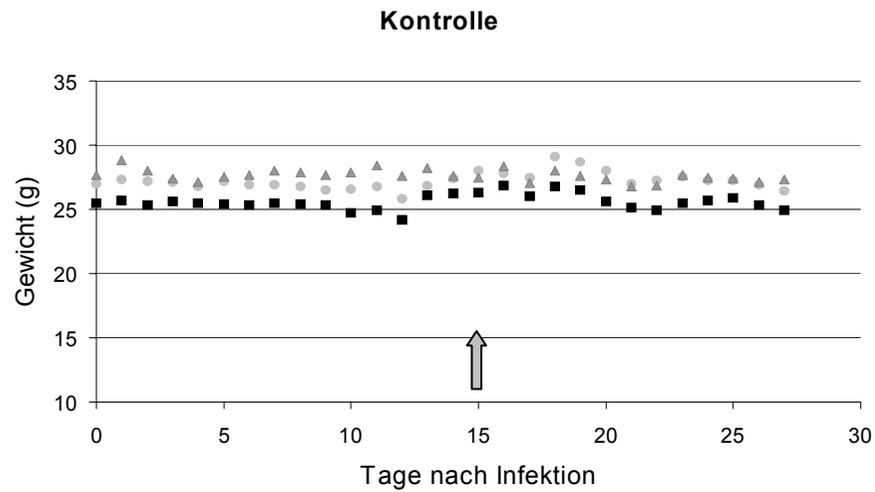


Abbildung 5.11: Gewichtskurven der SeV/DsRed-infizierten Mäuse. Pro Gruppe wurden je 3 Tiere mit je 10^2 , 10^4 und 10^6 PFU SeV/DsRed infiziert. Die grauen Pfeile kennzeichnen eine 2. SeV-Infektion. Die verschiedenen Symbole repräsentieren jeweils ein Tier.

Die Bildung SeV-spezifischer Antikörper in den infizierten Tieren wurde in einem Immunfluoreszenztest (siehe Methoden 4.7.10) untersucht. Hierfür wurden die Seren infizierter (10^4 und 10^6 PFU/Dosis) und nicht infizierter Tiere (Kontrolle) 1:50 verdünnt und auf SeV-infizierte Vero-Zellen gegeben. Gebundene Antikörper wurden mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

Abb. 5.12 zeigt eine deutliche SeV-spezifische Reaktion der Seren infizierter Tiere in der Immunfluoreszenz.

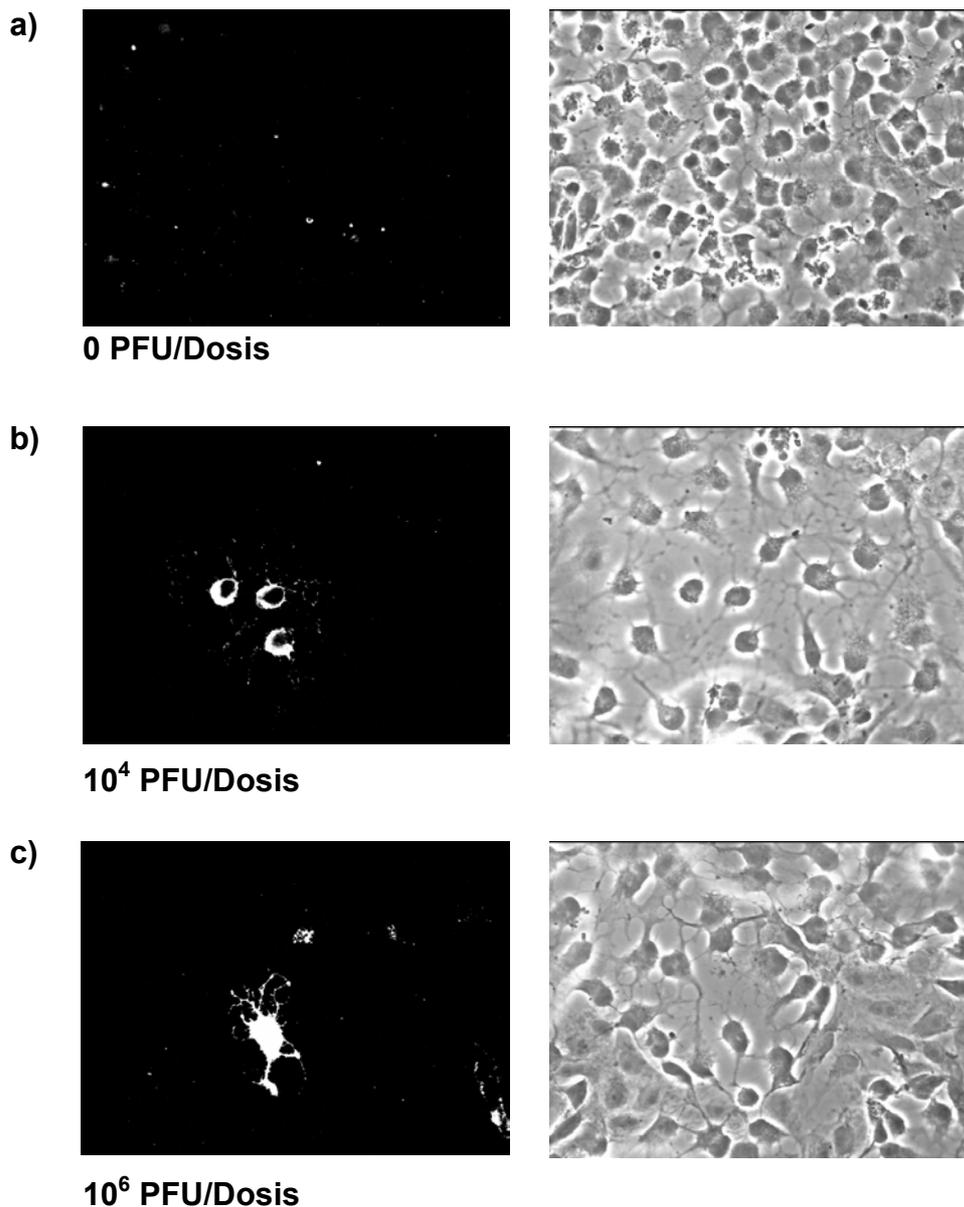


Abbildung 5.12: Nachweis SeV-spezifischer Antikörper in Seren SeV/DsRed-infizierter Mäuse. Die Mäuse waren mit 0, 10^4 bzw. 10^6 PFU/Dosis infiziert worden. Die Bilder auf der linken Seite zeigen Oberflächenimmunfluoreszenz SeV-infizierter Vero-Zellen, auf der rechten Seite sind die Zellen im Durchlicht gezeigt.

Für die Immunisierung gegen HRSV sollten, anders als im Vorversuch, wesentlich jüngere Tiere verwendet werden. Um sicherzustellen, dass auch diese Tiere die Infektion mit 10^4 PFU SeV unbeschadet überstehen, wurde einer Gruppe 8 Wochen alter Balb/c Mäuse ebenfalls mit 10^4 PFU SeV infiziert. Wieder erfolgte eine Gewichtskontrolle, diesmal über einen Zeitraum von 12 Tagen.

In Abb. 5.13 unterscheiden sich die Gewichtskurven von Kontrolltieren und infizierten Tieren kaum voneinander. Man erkennt ein leichtes Absinken der Kurven einiger Tiere an Tag 5 nach Infektion. Dieser leichte Gewichtsverlust ist jedoch nicht auf eine SeV-Infektion zurückzuführen, da er auch bei den Kontrolltieren auftritt. Auch konnten nach der Infektion keine anderen Krankheitssymptome beobachtet werden.

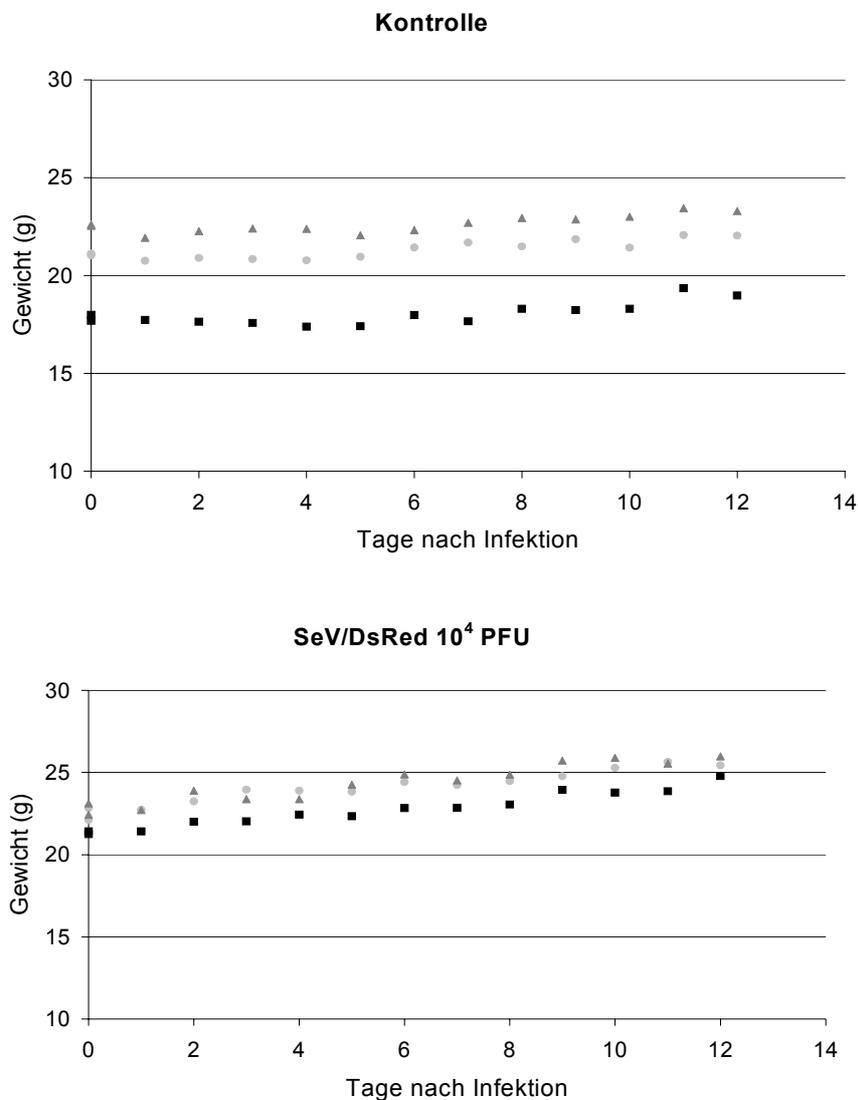


Abbildung 5.13: Gewichtskurven SeV-Infizierter (10^4 PFU/Dosis) und nicht infizierter 8 Wochen alter Balb/c Mäuse. Die verschiedenen Symbole repräsentieren jeweils ein Tier.

5.2.3.2 Immunisierung gegen HRSV

Bei einer SeV-Dosis von 10^4 PFU pro Maus zeigten die infizierten Tiere keine Krankheitssymptome, wie z.B. Gewichtsverlust (siehe Abb. 5.13 und 5.11). Nach einer Infektion konnten jedoch SeV-spezifische Antikörper im Serum der infizierten Tiere nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.12). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die Immunisierung gegen HRSV, jeweils 10^4 PFU/Dosis der rekombinanten Sendai-Viren SeV/HRSV-F, SeV/HRSV-F-Del-pep27 und SeV/HRSV-F-Del-TM (siehe Abb. 5.6) eingesetzt. Als Kontrollen dienten nicht infizierte Tiere und mit SeV/DsRed-infizierte Tiere. Die Immunisierung wurde wie unter 4.8.2 beschrieben durchgeführt. Der anschließende HRSV-Challenge erfolgte an Tag 34 nach der ersten SeV-Infektion. Über den gesamten Versuchszeitraum wurde bei den Tieren eine tägliche Gewichtskontrolle durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 5.14 dargestellt sind.

Trotz sorgfältiger Vorversuche zeigten einige der infizierten Tiere an Tag 7 nach der ersten rSeV-Infektion einen Gewichtsverlust, der bei den nicht infizierten Tieren ausblieb.

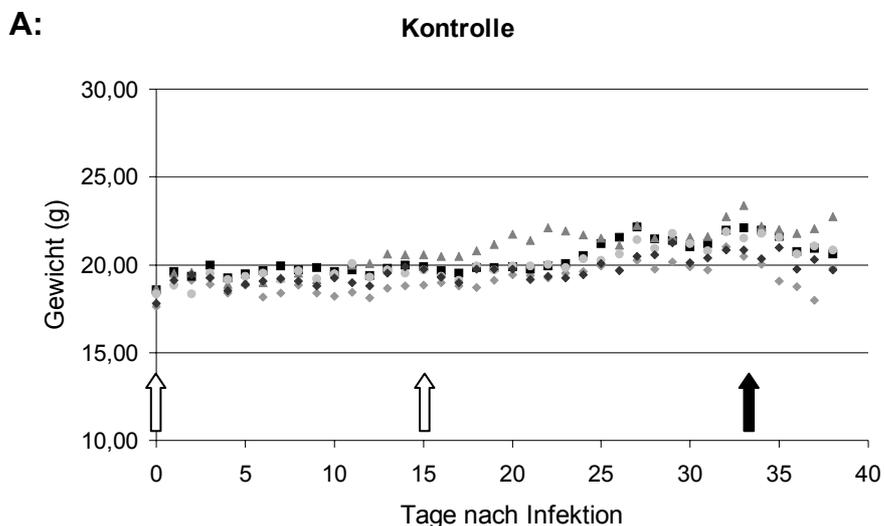


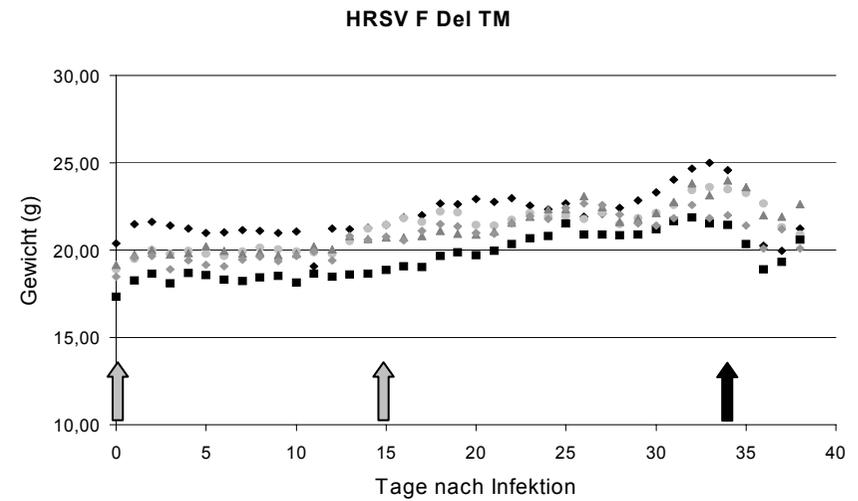
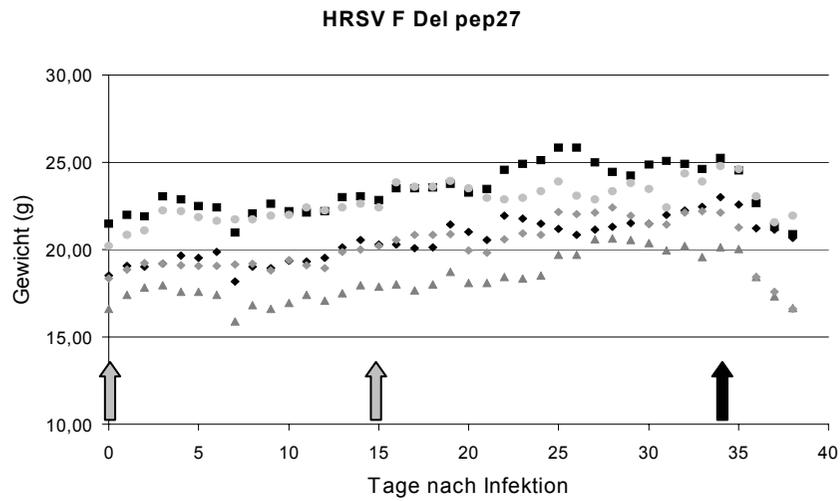
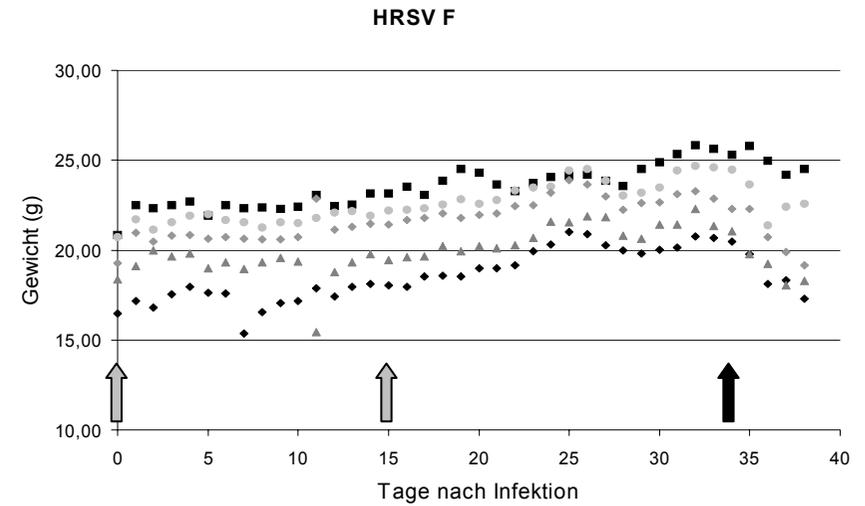
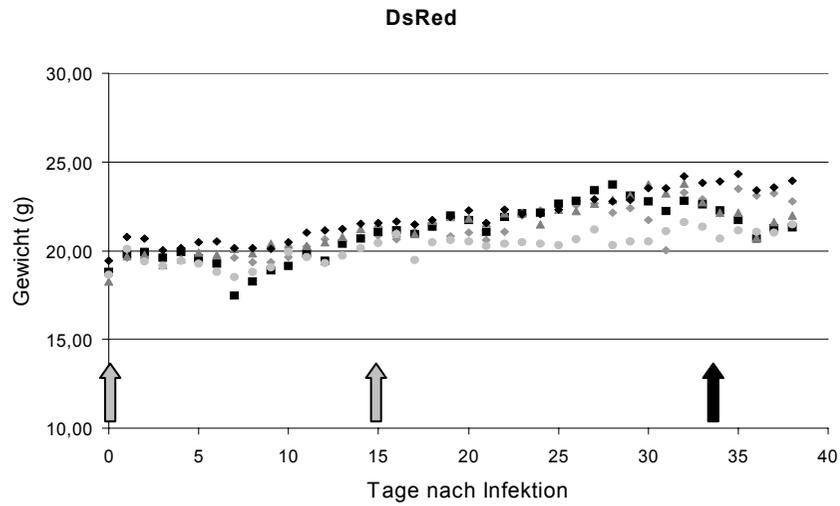
Abbildung 5.14: Gewichtskurven rSeV-infizierter Balb/c Mäuse, HRSV-Immunisierung.

A: nicht infizierte Tiere, weiße Pfeile = 50 μ l Dulbecco's MEM nasal, schwarze Pfeile = HRSV-Infektion (3×10^6 PFU); B: rSeV-infizierte Tiere, Graue Pfeile = SeV-Infektion (10^4 PFU), schwarze Pfeile = HRSV-Infektion (3×10^6 PFU). Die verschiedenen Symbole repräsentieren jeweils ein Tier.

Fortsetzung nächste Seite...

Fortsetzung von Seite 98

B:



In der Gruppe der SeV/DsRed-infizierten Tiere zeigte eines einen signifikanten Gewichtsverlust. Es verlor von Tag 6 auf Tag 7 1,8 g Gewicht, was einem Gewichtsverlust von 9,4% entspricht. In der Gruppe der SeV/HRSV-F-infizierten Tiere zeigten 2 von 5 Tieren einen signifikanten Gewichtsverlust, eines an Tag 7 (12,6% von Tag 6 auf Tag 7), ein weiteres an Tag 11 nach Infektion (20,26% von Tag 10 auf Tag 11). In der Gruppe der SeV/HRSV-F-Del-pep27-infizierten Tiere zeigten 3 von 5 Tieren einen Gewichtsverlust ebenfalls mit Tiefstwerten an Tag 7 nach Infektion (6,4%, 8,5% und 9%). Die Kurven der SeV/HRSV-F-Del-TM-infizierten Tiere lassen an Tag 7 nach Infektion keinerlei signifikante Gewichtsverluste erkennen. Alle infizierten Tiere konnten einen Gewichtsverlust innerhalb weniger Tage wieder ausgleichen. Sie wiesen keine weiteren Krankheitssymptome auf.

5.2.3.3 Immunantwort

Um die Immunantwort der rSeV-infizierten Tiere zu charakterisieren wurde mit den Seren der einzelnen Gruppen ein Immunfluoreszenztest (siehe 4.7.10) mit HRSV-infizierten Vero-Zellen und ein Virus-Neutralisationstest (siehe 4.7.12) mit SeV und HRSV durchgeführt.

Die Seren von Tag 13 nach Infektion wurden für den Immunfluoreszenztest 1:50 verdünnt eingesetzt. In einer Positivkontrolle wurden die Zellen mit einem HRSV-spezifischen monoklonalen Antikörper (mab 3) inkubiert. Es wurde ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet.

In Abb. 5.15 zeigen die Seren der Kontrollgruppe (b) und die der SeV/DsRed-infizierten Tiere (c) wie erwartet keine Reaktion mit den HRSV-infizierten Zellen. Bei den in Abb. c) erkennbaren Signalen handelt es sich um Präzipitate des fluoreszierenden Farbstoffes

Für die Seren der Gruppen SeV/HRSV-F (d), SeV/HRSV-F-Del-pep27 (e) und SeV/HRSV-F-Del-TM (f) konnte jedoch eine deutliche HRSV-spezifische Reaktion im Immunfluoreszenztest nachgewiesen werden, wobei das Serum der SeV/HRSV-F-Del-TM-infizierten Tiere das stärkste Signal zeigt. Alle rSeV infizierten Tiere zeigten zusätzlich eine starke SeV-spezifische Immunantwort, ähnlich der in Abb. 5.12. Die Reaktion der Seren mit SeV-infizierten Zellen wurde daher nicht noch einmal dargestellt.

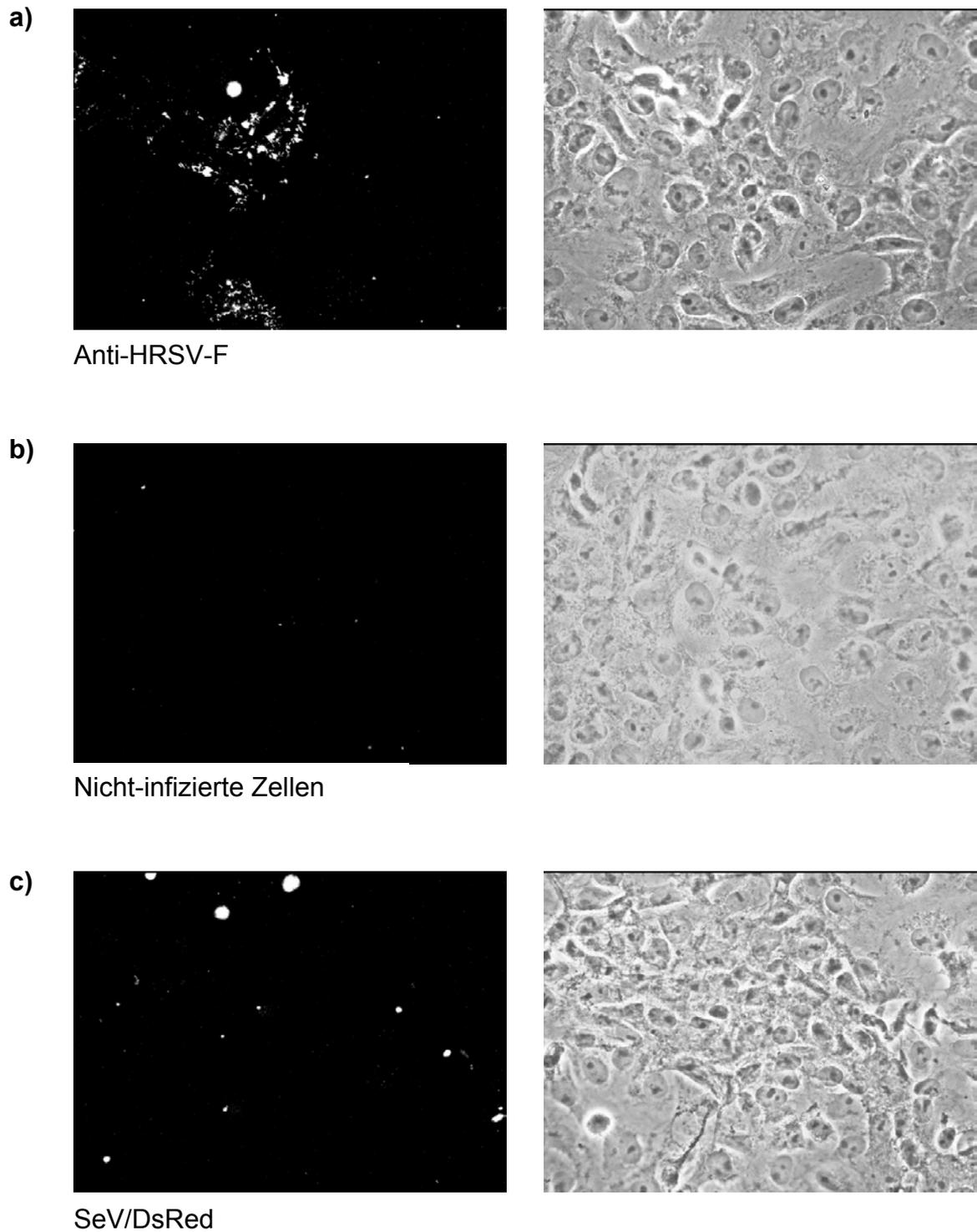


Abbildung 5.15 a: HRSV-spezifische Antikörper in den Seren rSeV-infizierter Mäuse. Oberflächenimmunfluoreszenz mit HRSV-infizierten Vero-Zellen (links) und entsprechende Darstellung der Zellen im Durchlicht (rechts); a = Zellen inkubiert mit monoklonalem Anti-HRSV-F-Antikörper (Positivkontrolle), b = Serum nicht-infizierter Mäuse, c = Serum SeV/DsRed-infizierter Mäuse.

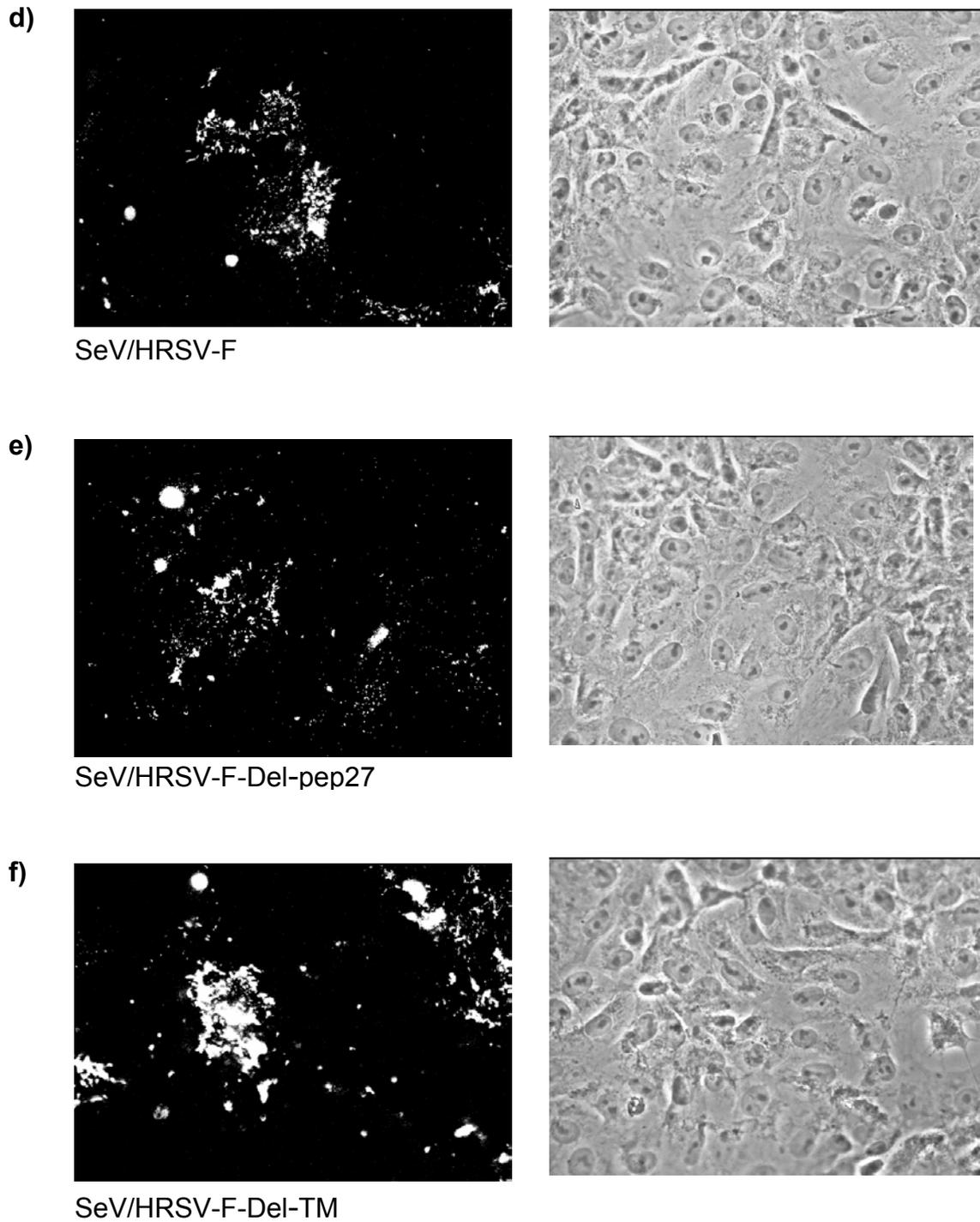


Abbildung 5.15 b: HRSV-spezifische Antikörper in den Seren rSeV-infizierter Mäuse. Oberflächenimmunfluoreszenz mit HRSV-infizierten Vero-Zellen (links) und entsprechende Darstellung der Zellen im Durchlicht (rechts). Die verwendeten Seren stammen aus Mäusen, die mit d) SeV/HRSV-F, e) SeV/HRSV-F-Del-pep27 bzw. f) SeV/HRSV-F-Del-TM infiziert waren.

Um die Menge an HRSV- und SeV-spezifischen Antikörpern in den Seren der immunisierten Tiere vergleichen zu können, wurden am Beispiel des Serums der SeV/HRSV-F-infizierten Tiere, welches an Tag 34 nach Infektion gewonnen wurde, ein weiterer Immunfluoreszenztest durchgeführt. Hier wurde das Serum in unterschiedlichen Verdünnungen (1:50 - 1:1600) mit HRSV- und SeV-infizierten Zellen inkubiert.

In Abb. 5.16 erkennt man bis zu einer Verdünnung von 1:1600 (e) noch eine spezifische Reaktion der Seren mit SeV-infizierten Zellen. Eine deutliche Reaktion mit HRSV-infizierten Zellen kann dagegen nur bis zu einer Verdünnung von 1:200 (c) nachgewiesen werden. Die Seren enthalten also etwa 8x mehr SeV- als HRSV-spezifische Antikörper.

Die Seren der einzelnen Gruppen (Tag 34 nach Infektion) wurden aufgrund ihrer geringen Menge für einen Virus-Neutralisationstest 1:10 in Dulbecco's MEM vorverdünnt. Der Test erfolgte wie unter Punkt 4.7.12 beschrieben in einer Mikrotiterplatte. In keinem der Seren der mit rekombinanten Sendai-Viren infizierten Mäusen konnte ein HRSV-neutralisierender Antikörpertiter bestimmt werden. Bei der höchsten Antikörperkonzentration (1:10 Verdünnung) war die Anzahl infizierter Zellen zwar reduziert, aber es bestand kein vollständiger Schutz vor einer HRSV-Infektion. Anders verhielt es sich bei der Bestimmung der SeV-neutralisierenden Antikörper. Diese wurden beispielhaft an den Seren der mit SeV/HRSV-F immunisierten Gruppe bestimmt. Hier wurde ein Antikörpertiter von 224 ND₅₀/50 µl im Serum nachgewiesen.

5.2.3.4 HRSV-Challenge

Die Immunisierung mit den rekombinanten Sendai-Viren induzierte in den Mäusen eine HRSV-spezifische Immunantwort (siehe Abb. 15.5). Die Bildung HRSV-neutralisierender Antikörper konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 5.2.3.3). Um zu zeigen, ob die Tiere trotzdem vor einer anschließenden HRSV-Infektion geschützt waren, wurden sie an Tag 34 nach der ersten SeV-Infektion mit 3×10^6 PFU HRSV nasal infiziert (siehe Methoden 4.8.2). Direkt vor der HRSV-Infektion erfolgte eine letzte Blutentnahme bei allen Tieren. 4 Tage nach der HRSV-Infektion wurden die Lungen der Mäuse homogenisiert.

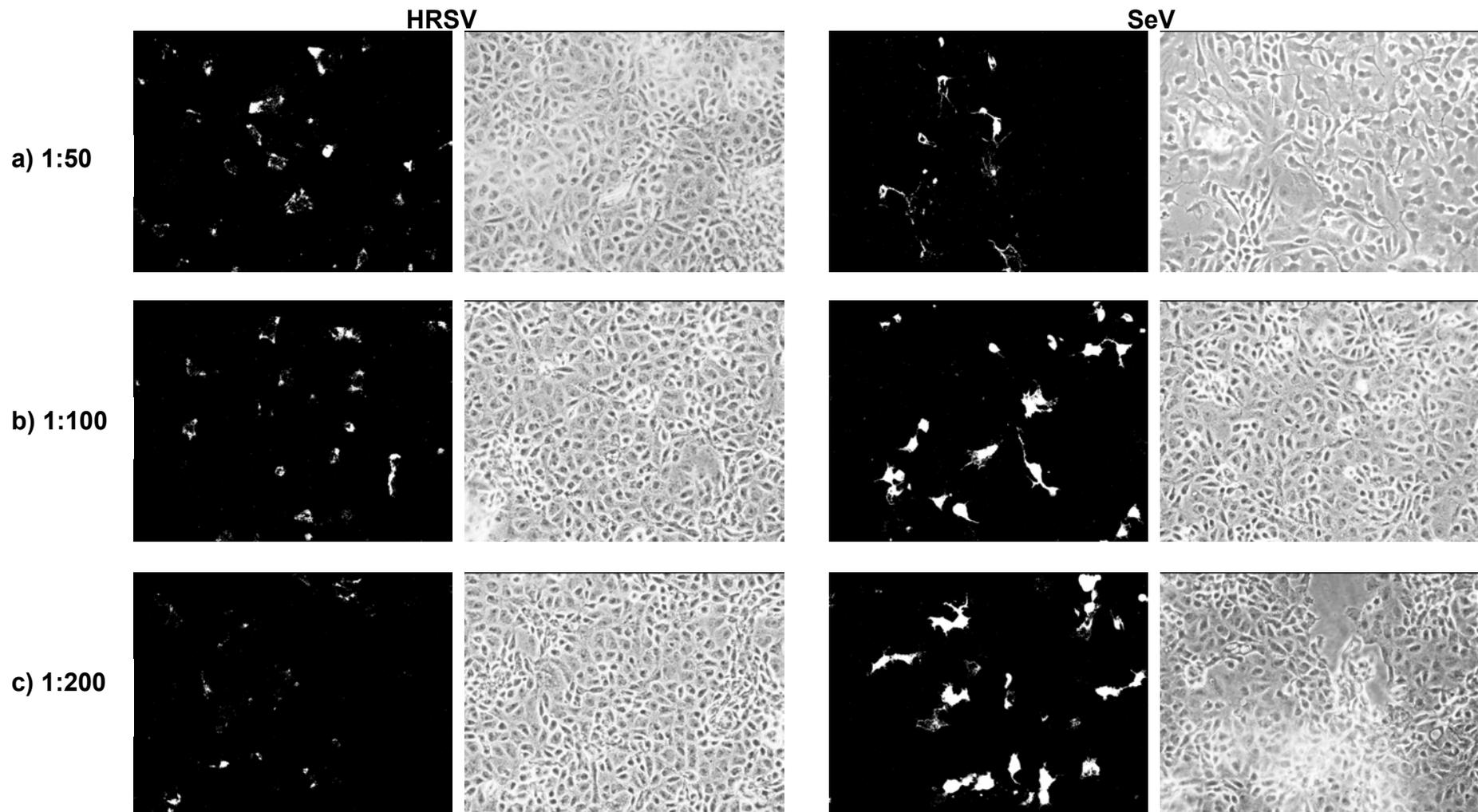


Abb. 5.16: Vergleich der Konzentrationen von HRSV- und SeV-spezifischen Antikörpern im Serum SeV/HRSV-F-infizierter Mäuse. Oberflächenimmunfluoreszenz mit HRSV-infizierten Vero-Zellen (links) und entsprechende Darstellung der Zellen im Durchlicht (rechts). Die Seren wurden a) 1:50 – e) 1:1600 verdünnt. *Fortsetzung nächste Seite....*

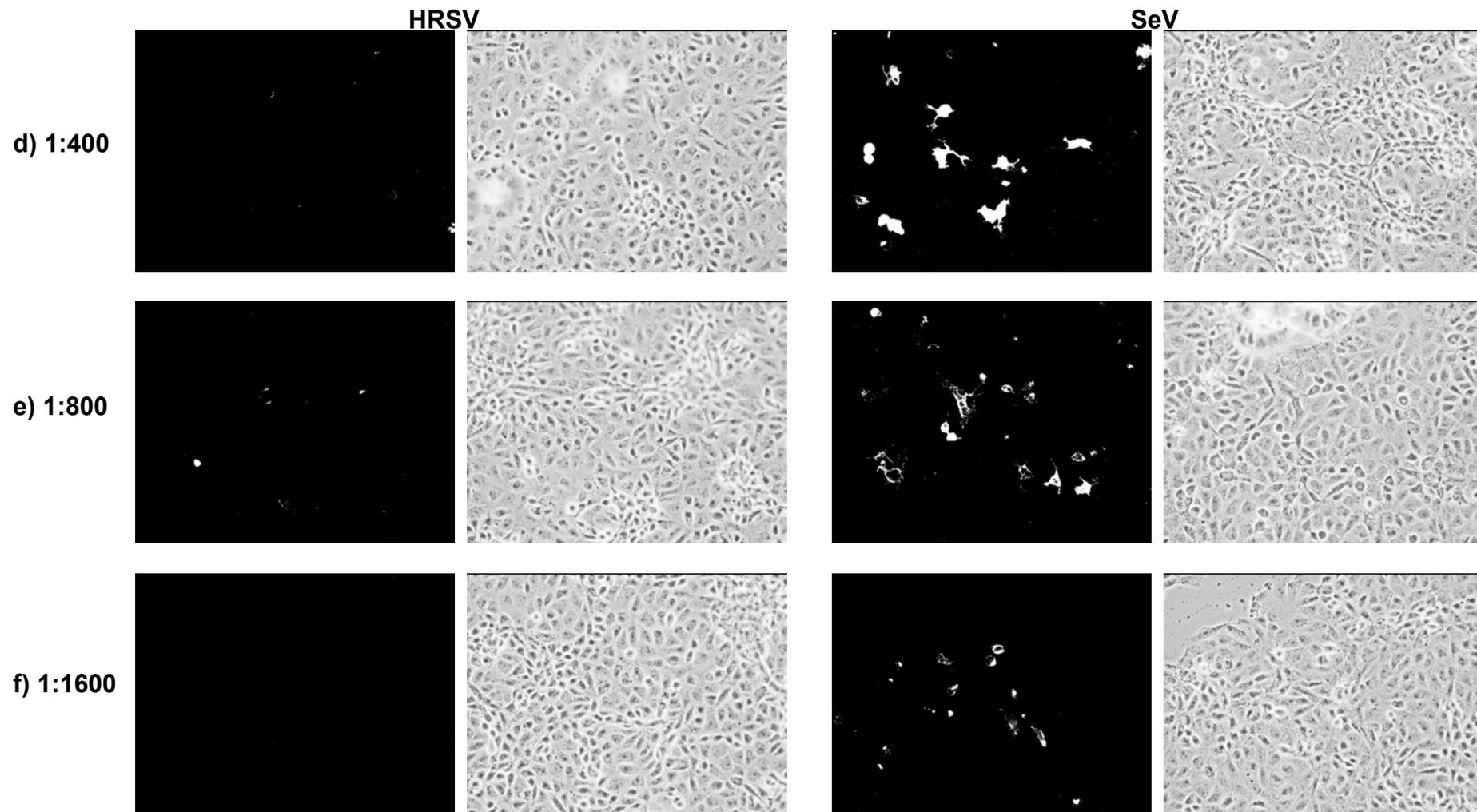


Abb. 5.16: Vergleich der Konzentrationen von HRSV- und SeV-spezifischen Antikörpern im Serum SeV/HRSV-F-infizierter Mäuse. Oberflächenimmunfluoreszenz mit HRSV-infizierten Vero-Zellen (links) und entsprechende Darstellung der Zellen im Durchlicht (rechts). Die Seren wurden a) 1:50 – e) 1:1600 verdünnt.

Die Ermittlung der HRSV-Titer erfolgte nach Lagerung der Homogenate bei -80°C . Das Fehlen von Viren in den Lungen weist auf einen Schutz vor einer HRSV-Infektion hin. Diesmal wurden auch die Tiere der Kontrollgruppe infiziert, bei denen kein Infektionsschutz erwartet wurde. Die HRSV-Infektion führte in allen Gruppen zu einem Absinken der Gewichtskurven (siehe Abb. 5.14). Der Gewichtsverlust der Tiere in der Kontrollgruppe war dabei jedoch am geringsten, was darauf schließen lässt, dass dieser Gewichtsverlust nicht zwingend als HRSV-Symptom gedeutet werden muss. Da an Tag 34 erstmalig Blutentnahme und Infektion an ein und dem selben Tag erfolgte, ist es möglich, dass der Gewichtsverlust auch auf erhöhten Stress der Tiere zurückzuführen ist.

Tabelle 5.5 zeigt einen vollständigen Schutz vor einer HRSV-Infektion in den Gruppen der mit SeV/HRSV-F, SeV/HRSV-F-Del-pep27 und SeV/HRSV-F-Del-TM immunisierten Tiere. In keinem der Tiere konnte infektiöses Virus in den Lungen nachgewiesen werden. Bei den Tieren der Kontrollgruppe und den SeV/DsRed-infizierten Tieren wurden wie erwartet Virustiter von etwa 10^4 PFU/Maus gefunden. Diese Titer sind vergleichbar mit denen aus Tab. 5.4.

Gruppe	Virustiter in den Lungen infizierter Tiere (PFU/Lunge), Mittelwert
Kontrolle	$6,9 \times 10^4$
SeV/DsRed	$6,5 \times 10^4$
SeV/HRSV-F	0
SeV/HRSV-F-Del-pep27	0
SeV/HRSV-F-Del-TM	0

Tabelle 5.5: Nachweis einer HRSV-Infektion in Mäusen, immunisiert mit rekombinanten Sendai-Viren.

6. Diskussion

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, Impfstoff-Kandidaten auf der Basis des Fusionsproteins (F) des humanen respiratorischen Syncytialvirus zu erzeugen und im Mausmodell auf ihre Wirksamkeit zu untersuchen.

HRSV weist einige Besonderheiten auf, die die Entwicklung eines Impfstoffes erschweren. In der Population treten zwei RSV-Subtypen (A und B) auf, wobei sich die unterschiedlichen Viren vor allem in der Sequenz ihrer G-Proteine unterscheiden. Ein Impfstoff sollte nach Möglichkeit gegen beide Subtypen schützen. Das wird gewährleistet, indem man den Impfstoff wie in der vorliegenden Arbeit auf der Basis des F-Proteins herstellt. Bei einer natürlichen RSV-Infektion wird keine anhaltende Immunität induziert, so dass es zu Reinfektionen mit leichteren Erkrankungsformen kommen kann. Bei Säuglingen muss eine Impfung bereits kurz nach der Geburt erfolgen, da die schwersten Erkrankungen in einem Alter von 2-7 Monaten auftreten. In diesem Alter ist die Immunantwort der Kinder jedoch nur schwach ausgeprägt (Delespesse et al., 1998; Murphy et al., 1986a), und die Kinder tragen maternale Antikörper, die wiederum eine immunsupprimierende Wirkung haben können (Crowe et al., 2001). Konventionelle Tiermodelle wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Balb/c Mäuse (Taylor et al., 1984) oder Baumwollratten sind keine natürlichen Wirte von RSV und lassen sich daher nicht sehr effizient infizieren. Sie eignen sich jedoch für erste Untersuchungen. Das Tiermodell, in dem sich HRSV ähnlich wie im Menschen repliziert und in dem es ähnliche Krankheitssymptome verursacht, ist der Schimpanse. Die Arbeit mit diesen Tieren ist jedoch besonders zeit- und kostenaufwändig und die Anzahl der für einen Versuch verfügbaren Tiere ist stark begrenzt. Die sorgfältige Evaluierung von Sicherheit und Effektivität eines pädiatrischen HRSV-Impfstoffes kann endgültig nur in klinischen Studien mit HRSV-naiven, 1-2 Monate alten Säuglingen durchgeführt werden (Wright et al., 2000). Eine mit Formalin inaktivierte RSV-Präparation (FI-RSV), die in den 60er Jahren in Kleinkindern evaluiert wurde, bot keinen Schutz, und bei einer anschließenden natürlichen HRSV-Infektion traten verstärkte Krankheitssymptome auf, die bei einigen Kindern sogar zum Tod führten (Kim et al., 1969). Seitdem wurden viele retrospektive Untersuchungen durchgeführt, um die Ursachen für diese unerwarteten Ergebnisse zu finden. Diese zeigten, dass FI-RSV die Bildung von Antikörpern

induzierte, die nicht in der Lage waren, HRSV zu neutralisieren (Murphy et al. 1986b). Die Verstärkung der Krankheitssymptome scheint auf eine erhöhte Stimulation von Th2 CD4⁺ T-Lymphozyten und die verstärkte Produktion von IL-4 zurückzuführen zu sein (Openshaw et al., 2001; Connors et al., 1994; Graham et al., 1993). FI-RSV löste im Gegensatz zu einer natürlichen RSV-Infektion nur eine schwache CD8⁺ T-Zell-Antwort aus. Untersuchungen in Mäusen haben gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen im Verlauf einer Immunantwort auf RSV-Antigene in der Lage sind, Th2-Zellen herunter zu regulieren (Hussel et al., 1997; Srikiatkachorn und Braciale 1997).

Bis heute gibt es eine Reihe unterschiedlicher Ansätze für die Entwicklung eines HRSV-Impfstoffes, nachdem in den 60er Jahren dieser erste zugelassene Impfstoff scheiterte:

Neben der Entwicklung von Protein-Impfstoffen wie PFP (*purified fusion (F) protein*) auf der Basis des F-Proteins (Hancock et al., 1995; Grootuis et al., 1998) und BBN2Na auf der Basis des G-Proteins (Power et al., 2001a und b), spielten auch attenuierte Lebendimpfstoffe wie z.B. temperatursensitive HRSV-Mutanten (Wright et al., 2000), HRSV-Deletionsmutanten (Birmingham und Collins, 1999; Jin et al., 2000; Karron et al., 1997; Teng et al., 2000), und rekombinante BRSV/HRSV-Chimären (Buchholz et al., 2000) eine wichtige Rolle. Desweiteren wirkte eine DNA-Vakzine auf der Basis des RSV G-Proteins im Mausmodell immunogen und protektiv (Li et al., 2000).

Von unterschiedlichen Arbeitsgruppen wird die Strategie verfolgt, andere rekombinante Viren als Vektoren für die Expression von HRSV-Glykoproteinen *in vivo* einzusetzen. So waren beispielsweise Mäuse, immunisiert mit rekombinantem Virus der vesikulären Stomatitis (VSV, Familie: *Rhabdoviridae*), welches das HRSV G-, oder F-Protein exprimiert, vor einer anschließenden HRSV-Infektion geschützt (Kahn et al., 2001).

Ein rekombinantes bovines Parainfluenza Virus Typ 3 (BPIV3, Familie: *Paramyxoviridae*), indem die Proteine HN und F durch HN- und F-Protein des humanen Parainfluenza Virus Typ 3 (HPIV3) ausgetauscht wurden (Schmidt et al., 2000), diente als Grundgerüst für einen weiteren Impfstoff. BPIV3 ist aufgrund einer natürlichen Speziesbarriere in Primaten stark attenuiert. Es wurde bereits als Impfstoff gegen HPIV3 evaluiert und erwies sich in seronegativen Kindern als immunogen, sicher und genetisch stabil (Karron et al., 1996). In das chimäre

rB/HPIV3-Virus wurden zusätzlich die Gene von HRSV F- oder G-Protein inseriert, um einen Kombinations-Impfstoff gegen HPIV3 und HRSV zu erhalten. Hamster, die mit diesen rekombinanten Viren nasal immunisiert wurden, waren vor einer anschließenden HRSV-Infektion geschützt (Schmidt et al., 2001). In Rhesus-Affen, immunisiert mit denselben rekombinanten Viren, konnten HRSV-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2002).

Chen und Mitarbeiter (2002) erzeugten ein rekombinantes Semliki-Forest-Virus (SFV), welches HRSV-F oder HRSV-F und -G exprimierte. Mäuse, die intranasal mit den rekombinanten Viren immunisiert wurden, zeigten eine starke systemische und lokale RSV-spezifische Immunität. Neben neutralisierendem IgG und mukosalem IgA, wurden T-Zellen nachgewiesen, die RSV-Antigene erkannten. Wurden die Tiere nach der Immunisierung einer HRSV-Belastungsinfektion ausgesetzt, so waren sie vor dieser geschützt.

Bis heute wurde jedoch keiner der neuen HRSV-Impfstoffe zugelassen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Ansatz Peptide des HRSV-F-Proteins (siehe Tab. 5.1), als Bestandteil rekombinanter T7-Phagen, im Mausmodell nach subkutaner Applikation auf ihre Immunogenität untersucht. Des Weiteren wurden authentisches F, lösliches F und eine F-Deletionsmutante (siehe Abb. 5.6) mit Hilfe rekombinanter Sendai-Viren exprimiert, und diese Sendai-Viren wurden ebenfalls für eine Immunisierung gegen HRSV eingesetzt. Für die Immunisierung wurden Mäuse nasal mit den einzelnen rekombinanten Viren infiziert.

6.1 Klonierung und Stabilität der rekombinanten T7-Phagen

Wie in Tab. 5.2 dargestellt ist, konnte die DNA nur von 4 der 8 ausgewählten Peptide fehlerfrei in das Genom der T7-Phagen eingebaut werden. Trotz mehrmaliger Wiederholung des gesamten Klonierungsansatzes, inklusive Veränderung von PCR-Bedingungen und Verwendung von *Pfu*-Polymerase (*proof-reading*) anstelle von *Taq*-Polymerase, traten immer wieder andere Fehler innerhalb der kodierenden Sequenzen auf. Der Versuch, die einzelnen PCR-Produkte zuerst in einen TA-Vektor zu klonieren, dort zu sequenzieren und erst dann in das T7-Genom zu inserieren, scheiterte ebenfalls. Nach der Sequenzierung wurden die Peptid-kodierenden Sequenzen mittels Restriktionsendonukleasen aus dem TA-Vektor geschnitten, wobei

zusätzlich kleinere DNA-Fragmente aus dem Vektor entfernt wurden. Diese ließen sich auch mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese nicht von den gewünschten HRSV-Peptid-Sequenzen abtrennen. Bei einer anschließenden Ligation wurden nun bevorzugt die kleineren Vektor-Fragmente in das Genom des T7-Phagen eingebaut, so dass auch hier nicht die Phagen mit den gewünschten Peptid-Sequenzen erhalten wurden.

Die einzelnen PCR-Produkte ließen sich unterschiedlich gut in das Genom des Phagen inserieren. Bei einigen Peptiden, wie z.B. dem Peptid F-3 zeigte bereits der erste sequenzierte Klon die richtige Sequenz. Bei den Peptiden F-Rep1, F-1a, F-2a und F-2b wurden bis zu 20 Klone sequenziert, ohne dass ein Klon mit korrekter Sequenz gefunden wurde. Hier musste mit fehlerhaften Konstrukten weitergearbeitet werden. Anscheinend tolerieren die T7-Phagen nicht jedes beliebige Fremdpeptid in ihrem Kapsidprotein. Die Länge der einzelnen Peptide scheint dabei keine große Rolle zu spielen. Das Peptid F-3 ist mit 33 AS relativ lang. Das fehlerhafte Peptid F-Rep1 hingegen hat nur eine Länge von 16 AS. Vielmehr scheint die Peptid-Sequenz entscheidend zu sein. Einmal inseriert, liegen die Fremdpeptide jedoch über mindestens 5 Passagen stabil im Genom der Phagen vor.

Die Sequenz der inserierten Peptide scheint auch die Stabilität der Phagenpartikel zu beeinflussen. So zeigte z.B. der Phage T7-F-3 eine geringe Stabilität bei der Zentrifugation im Cäsiumchloridgradienten (siehe Abb. 5.4). Obwohl er in einer Bakterienkultur zu gleichen Titern wuchs wie die anderen Konstrukte, ließen sich aus einem Gradienten wesentlich weniger intakte Phagenpartikel isolieren. Die Menge an gereinigtem Phagenprotein aus einer 400 ml Kultur betrug für den Phagen T7-F-3 nur ca. 200 µg. Bei den anderen Konstrukten waren es ca. 1000 µg Phagenprotein. Da für eine einzelne Immunisierung von 5 Mäusen mindestens 500 µg Phagenprotein nötig sind, wurde der Phage T7-F-3 nicht eingesetzt.

6.2 Charakterisierung der rekombinanten T7-Phagen mit Hilfe monoklonaler Antikörper

Für die immunologische Charakterisierung der rekombinanten Phagen standen mehrere monoklonale Antikörper zur Verfügung (siehe 3.9.2). In ELISA, Western Blot und Dot Blot wurden die Phagen mit den unterschiedlichen Antikörpern inkubiert. So sollte untersucht werden, ob die eingebauten Fremdpeptide von HRSV-spezifischen

Antikörpern erkannt werden. Außerdem sollte gezeigt werden, ob die Fremdpeptide tatsächlich an der Phagen-Oberfläche präsentiert werden, um so bei einer anschließenden Immunisierung vom Immunsystem der Mäuse erkannt zu werden. Im Dot Blot und Western Blot reagierte nur der Phage T7-F2a mit einem Gemisch aus mehreren Antikörpern (siehe Abb. 5.1 und 5.2). Wie sich in einem anschließenden ELISA herausstellte reagierten mit diesem Phagen drei der zur Verfügung stehenden Antikörper (siehe Abb. 5.3). Das Peptid F-2a bildet also ein Epitop des HRSV-Fusionsproteins und behält auch nach Einbau in das Kapsidprotein des Phagen seine entsprechende Konformation bei. Das von uns ausgewählte Peptid F-2a (AS 255-287) ist um einige AS länger als das in der Literatur beschriebene Epitop. Lounsbach und Mitarbeiter (1993) definierten ein Epitop im Bereich der AS 265-272. Innerhalb des klonierten Peptides F-2a ist an Position 286 die ursprüngliche Aminosäure Tyrosin durch Serin ausgetauscht. Trotz dieses AS-Austausches wird das Peptid von den Antikörpern erkannt. Der Austausch hat also keine Auswirkungen auf das eigentliche Epitop.

Zusätzlich zum Peptid F-2a sind von den ausgewählten Peptiden weitere 5 als Antikörperbindungsstellen in der Literatur beschrieben (siehe Tab. 5.1). Für die Peptide F-Rep1 und F-Rep3 finden sich keine Hinweise in der Literatur. Sie wurden ausgewählt, da sie ebenso wie das Peptid F-Rep2 in den Bereichen der *heptad repeats* des Fusionsproteins lokalisiert sind und daher interessant erschienen.

Da bereits drei der zur Verfügung stehenden Antikörper spezifisch für ein und dasselbe Epitop waren, ist es möglich, dass die Anzahl der zur Verfügung stehenden Antikörper nicht ausreicht, um alle ausgewählten Peptide zu charakterisieren. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass einige der von uns definierten Peptide zwar erkannt werden würden, jedoch aufgrund der fehlerhaften Sequenzen keine Antikörper-Bindung zustande kommt. Ebenso ist es möglich, dass es sich bei den ausgewählten Peptiden zwar um HRSV-spezifische Epitope handelt, dass diese jedoch als Bestandteil des Kapsid-Fusionsproteins ihre Konformation so verändern, dass keine Bindung der Antikörper erfolgen kann. Die Verwendung eines polyklonalen Serums (Ziege Anti-RSV) war nicht möglich, da es hier auch nach Reinigung der Phagen noch zu starken unspezifischen Reaktionen des Serums mit den Phagen, bzw. mit den in den Lysaten enthaltenen bakteriellen Proteinen kam.

6.3 Durch rekombinante T7-Phagen ausgelöste Immunantwort

Balb/c Mäuse, die subkutan mit den rekombinanten Phagen immunisiert wurden, enthielten nach einer zweiten Folgeimmunisierung in ihrem Serum T7-spezifische Antikörper. Diese wurden in einem Western Blot durch die Bindung an T7-Proteine nachgewiesen (siehe Abb. 5.5). Auch die Seren, die nach der ersten Immunisierung und nach der ersten Folgeimmunisierung gewonnen wurden, zeigten im Western Blot eine Reaktion mit den Phagenproteinen. Diese war jedoch deutlich schwächer als die Reaktion der Seren nach der zweiten Folgeimmunisierung. Es zeigte sich, dass die Schwanz-, bzw. Schwanzfaserproteine des Phagen in den immunisierten Tieren eine stärkere Immunantwort induzierten als das Kapsidprotein (siehe Abb. 5.5), obwohl dieses im Viruspartikel in einer größeren Menge, bzw. einer höheren Kopienzahl vorliegt. (siehe Abb. 5.4). Das Kapsidprotein des T7-Phagen erscheint daher nicht so immunogen zu sein wie erwartet wurde.

Im Gegensatz zu der starken Immunantwort gegen die Phagenproteine, konnten in den Seren der immunisierten Mäuse weder durch Western Blot noch durch Immunfluoreszenztest HRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 5.1.5.1). In einem der Neutralisationstests wurde ein geringer Titer an HRSV-neutralisierenden Antikörpern bestimmt (siehe Tab. 5.3). Da jedoch in diesem Test auch bei den Kontrolltieren die Anzahl an infizierten Zellen mit steigender Serumkonzentration abnahm, kann es sich hier auch um eine unspezifische Reaktion handeln. Bei einer anschließenden HRSV-Belastungsinfektion bestand bei keinem der Tiere ein Infektionsschutz (siehe Tab. 5.4).

Obwohl der Phage T7-F-2a *in vitro* deutliche Reaktionen mit HRSV-spezifischen Antikörpern zeigte (siehe Abb. 5.1-5.3), konnte er in den Tieren keine protektive Immunantwort induzieren. Die Seren der T7-F-2a-immunisierten Tiere zeigten im Western Blot keine Reaktion.

Evtl. hätte die Verwendung eines Adjuvans bei der Immunisierung die Induktion einer HRSV-spezifischen Immunantwort erhöht. Es wurde jedoch beschrieben, dass rekombinante fd-Phagen in der Lage sind, auch ohne die Zugabe eines Adjuvans eine protektive Immunantwort gegen virale Fremdpeptide zu induzieren (Grabowska et al., 2000).

Bei den rekombinanten Phagen handelt es sich um einen Totimpfstoff. Dieser bietet im Gegensatz zu einem Lebendimpfstoff den Vorteil, dass er auch für eine Impfung

schwangerer Frauen eingesetzt werden kann. Diese Impfung würde den Säuglingen einen besonders frühen Schutz vor einer HRSV-Infektion bieten.

Leider eignen sich die rekombinanten T7-Phagen nicht für eine Immunisierung gegen HRSV. Sie sind nicht in der Lage, im Mausmodell eine protektive HRSV-Immunantwort zu induzieren. Die eingebauten Peptide werden zwar in die Viruspartikel eingebaut (siehe Abb. 5.2), sind jedoch evtl. zu klein oder können ihre natürliche Konformation nicht beibehalten, oder sie sind nicht in der Lage, das Immunsystem soweit zu stimulieren, dass ein Schutz vor einer HRSV-Infektion ausgelöst wird.

Sogenannte *Mimotope* wären eine Alternative zu den von uns ausgewählten und klonierten Peptidsequenzen. Bei einem *Mimotop* handelt es sich um ein Molekül, „das in der Lage ist, an die Antikörperbindungsstelle eines Antikörpers zu binden ohne identisch mit dem Epitop zu sein, das die Bildung des Antikörpers induzierte“ (Geysenet al., 1985). Als Vakzin-Kandidat sollte ein *Mimotop* die Antigenität des eigentlichen Epitopes imitieren, so dass es von dem entsprechenden Antikörper erkannt wird. Des Weiteren sollte es die Immunogenität des Epitopes imitieren, indem es die Bildung von Antikörpern induziert, die eine Kreuzreaktivität zum eigentlichen Epitop aufweisen (El Kamasi et al., 1999). Ein *Mimotop* des RSV Fusionsproteins wurde bereits identifiziert, und war in der Lage, in Mäusen die Bildung von RSV-neutralisierenden Antikörpern zu induzieren. *In vitro* konnten diese Antikörper eine RSV-Infektion verhindern. Immunisierte Mäuse zeigten bei einer anschließenden RSV-Belastungsinfektion einen reduzierten Virustiter in ihren Lungen, waren jedoch nicht vollständig geschützt (Steward, 2001).

Als Alternative wäre es möglich gewesen, anstelle der von uns festgelegten Peptide eine Phagenbank mit zufälligen Peptiden zu verwenden, und diese mit HRSV-spezifischen Antikörpern zu charakterisieren. Die Phagen, die eine spezifische Reaktion mit den verwendeten Antikörpern gezeigt hätten, wären dann für die Immunisierung eingesetzt worden. Für eine solche Untersuchung wird jedoch eine grosse Anzahl HRSV-spezifischer Antikörper benötigt. Mit Hilfe von Phagenbanken des filamentösen Phagen fd erfolgte bereits die Identifizierung von immunogenen Epitopen von HIV-1 (Scala et al., 1999) und HSV-2 (Grabowska et al., 1999). Für diese Untersuchungen standen Patientenserum zur Verfügung. Der Einsatz von

Seren HRSV-infizierter Patienten wäre ebenfalls möglich gewesen, um die Bindung von rekombinanten Phagen einer Phagenbank zu untersuchen. Da es sich bei HRSV jedoch um eine weit verbreitete Krankheit handelt, und sehr viele Menschen in ihrem Serum HRSV-spezifische Antikörper tragen, ist es schwierig, entsprechende seronegative Kontrollen zu finden.

6.4 Unterschiede in der Expression von HRSV-F und HRSV-F-Del-pep27 bei der Infektion mit rekombinanten Sendai-Viren

Die HRSV-Proteine F und F-Del-pep27 werden nicht, oder nur zu einem sehr geringen Anteil in die SeV-Partikel eingebaut (unveröffentlichte Daten).

Die Expression von authentischem F-Protein (F), löslichem F-Protein (F-Del-TM) und einer F-Deletionsmutante ohne die Furin-Spaltstelle an der Position RAR/KR¹⁰⁹ und ohne pep27 (F-Del-pep27) wurde mit Hilfe eines Western Blots mit Zell-Lysaten und in einem Immunfluoreszenztest mit SeV-infizierten Zellen untersucht. In den Lysaten rSeV-infizierter Zellen findet man einen Tag nach Infektion eine schwächere Expression der F-Deletionsmutante verglichen mit dem authentischen F-Protein (siehe Abb. 5.7). Im Immunfluoreszenztest wird einen Tag nach Infektion weniger F-Del-pep27 an der Oberfläche infizierter Zellen nachgewiesen als es beim authentischen F-Protein der Fall ist (siehe Abb. 5.9). Das lässt auf eine geringere Expressionsrate der Deletionsmutante oder auf ein verändertes Transportverhalten schließen. Untersuchungen mit rekombinantem BRSV, das anstelle des authentischen F-Proteins das deletierte F-Protein trug, zeigten, dass sich dieses Virus in Zellkultur ebenso effizient vermehrte wie das ursprüngliche BRSV (Zimmer et al., 2002). Das wiederum weist darauf hin, dass die deletierte Domäne des F-Proteins für Virusreifung und Infektiosität nicht notwendig ist. Die beiden Viren SeV/HRSV-F und SeV/HRSV-F-Del-pep27 unterschieden sich nicht in ihrem Wachstumsverhalten, d. h. sie wuchsen zu gleich hohen Virustitern (ca. 10⁶ PFU/ml), und sie infizierten die Zielzellen gleichermaßen effektiv (siehe Abb. 5.9).

6.5 Interpretation des Gewichtsverlustes SeV-infizierter Balb/c Mäuse

10^4 PFU des rekombinanten Sendai-Virus wurden als optimale Virusmenge für eine nasale Immunisierung ermittelt (siehe Abb. 5.11-5.13). Hier zeigten sowohl ein Jahr alte, als auch acht Wochen alte Tiere im Vorversuch keinerlei Krankheitssymptome. Bei der nasalen Applikation wurde die Bildung SeV-spezifischer Antikörper induziert. In Versuchen anderer Arbeitsgruppen mit rekombinantem SeV (Z-Stamm) welches als zusätzliches Gen das grün-fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* trug, konnten drei bis vier Wochen alte *Balb/c nude*-Mäuse mit bis zu 10^8 PFU infiziert werden, ohne dass ein Gewichtsverlust beobachtet wurde (Agungpriyono et al., 1999). Rekombinantes Virus dieses Stammes ohne Fremdgen führte jedoch bereits bei einer Dosis von 10^3 PFU zu einem Gewichtsverlust, vergleichbar mit dem, der in Abb. 7.14 sichtbar ist. Eine Infektion mit 10^5 PFU des rekombinanten Wildtyp-Virus führte bei einigen Tieren bereits zum Tod (Agungpriyono et al., 1999).

Während der eigentlichen Immunisierungsversuche kam es unerwartet und trotz sorgfältiger Vorversuche zu einem Gewichtsverlust bei den infizierten Tieren, von dem sie sich jedoch schnell wieder erholten. Wie bereits in den Vorversuchen wurden die rekombinanten Viren gereinigt und einen Tag bei 4°C gelagert. Vorangegangene Versuche haben gezeigt, dass diese kurzzeitige Lagerung nicht zu einem signifikanten Titer-Verlust führt. Während der Lagerung wurde der Virustiter mit Hilfe eines Immunoplaquetests (siehe Methoden 4.5.2) bestimmt. Die infizierten Zellen wurden anstelle einer dreitägigen Inkubation nur über Nacht inkubiert und bereits am nächsten Tag gefärbt und ausgezählt. Diese verkürzte Inkubationszeit ermöglichte zwar eine schnelle Titration der gereinigten Viren, führte jedoch im Plaquetest zu einer schwächeren Färbung der infizierten Zellen und somit zu einer ungenaueren Auswertung. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Viren am Tag der Infektion erneut titriert. Hier erfolgte die Auswertung erst nach einer dreitägigen Inkubationszeit. In den Vorversuchen stimmten die Titer aus beiden Titrations überein. Bei den eigentlichen Immunisierungsversuchen konnte keine Auswertung der zweiten Titration erfolgen, da Probleme bei der Fixierung der Zellen auftraten. Evtl. wurden bei der ersten Bestimmung der Virustiter einige der schwach gefärbten infizierten Zellen nicht mitgezählt, so dass der Titer niedriger veranschlagt wurde, als er tatsächlich war. Eine erhöhte Virusdosis könnte so den verstärkten Gewichtsverlust in einigen Gruppen erklären. Es würde ebenso erklären, warum die

SeV/HRSV-F-Del-TM-infizierten Tiere diesen Gewichtsverlust nicht zeigten. Hier erfolgte anscheinend eine korrekte Titerbestimmung.

6.6 Schutz vor einer HRSV-Infektion durch Immunisierung mit rekombinanten Sendai-Viren

In den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Versuchen waren Balb/c Mäuse, die mit den unterschiedlichen rekombinanten Sendai-Viren (siehe Abb. 5.6) nasal immunisiert wurden, vollständig vor einer anschließenden HRSV-Infektion geschützt. Vier Tage nach einer HRSV-Belastungsinfektion (*challenge*), konnte kein infektiöses Virus in den Lungen der infizierten Tiere nachgewiesen werden (siehe Tab. 5.6). In den Kontrolltieren konnte sich das Virus hingegen ungehindert vermehren, so dass an Tag vier nach Infektion ca. 10^4 infektiöse Viruspartikel in den Lungen nachgewiesen werden konnten. Authentisches HRSV-F-Protein, Deletionsmutante und lösliches F-Protein unterschieden sich nicht in der von ihnen induzierten Immunantwort. Obwohl die F-Deletionsmutante in Zellkultur von den Sendai-Viren schwächer exprimiert wurde als das authentische F-Protein (siehe Ergebnisse 5.2.2), waren die immunisierten Tiere auch hier vollständig vor einer Infektion geschützt. In den Seren aller immunisierten Mäuse konnten bereits nach einer ersten Infektion im Immunfluoreszenztest HRSV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.15 a und b). Diese besaßen jedoch *in vitro* keine bzw. eine in unserem Testsystem nicht nachweisbare HRSV-neutralisierende Wirkung (siehe Ergebnisse 5.2.3.3). Mit dem Serum der SeV/HRSV-F-immunisierten Tiere wurde zusätzlich ein Neutralisationstest gegen SeV durchgeführt. Hier konnte mit 224 ND₅₀/50 µl ein relativ hoher Titer an SeV-neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen werden. Diese neutralisierenden Antikörper könnten die Replikation der Sendai-Viren im Respirationstrakt der Mäuse und die damit verbundene Expression des HRSV-F-Proteins abgeschwächt haben. Die Expressionsrate war jedoch ausreichend um einen Schutz vor einer HRSV-Infektion zu induzieren.

Da in den Seren der immunisierten Tieren keine HRSV-neutralisierenden Antikörper gefunden wurden, scheinen diese für den Schutz vor einer HRSV-Infektion nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Versuche von Kahn und Mitarbeitern (2001) führten zu ähnlichen Ergebnissen. Es wurde ein rekombinantes Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) erzeugt, bei dem das VSV-G-Protein deletiert war. So sollte eine

Attenuierung des Virus erreicht werden. Mit Hilfe des rekombinanten VSV wurde authentisches HRSV F-Protein exprimiert. Die Viren induzierten durch eine nasale Immunisierung in Balb/c-Mäusen die Bildung HRSV-spezifischer Antikörper. Auch hier konnten in den Seren der Tiere keine HRSV-neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden; trotzdem waren die Tiere vor einer anschließenden HRSV-Infektion geschützt.

Durch eine nasale Immunisierung wird eine natürliche Infektion imitiert, und es kommt durch die mukosale Immunisierung zu einer Stimulation des lokalen Immunsystems. Immunglobulin A (IgA) ist das vorherrschende Immunglobulin in seromukösen Sekreten wie Speichel, Kolostrum, Milch, urogenitalen Sekreten und Tracheobronchialsekret. So ist es wahrscheinlich, dass die ausgebildete lokale IgA-Antwort zum Schutz vor einer HRSV-Infektion beiträgt. Ebenso wie die lokale IgA-Antwort kann die zelluläre Immunantwort, wie z. B. die Bildung zytotoxischer T-Zellen, eine wichtige Rolle beim Schutz vor einer RSV-Infektion spielen. Bisher wurden jedoch von uns noch keine Untersuchungen betreffend der IgA- oder einer zellulären Immunantwort durchgeführt. Im Speichel oder in bronchioalveolarer Lavage-Flüssigkeit (BAL) kann ein IgA-Titer bestimmt werden. Außerdem kann mit den Milzzellen immunisierter Tiere ein Zytotoxizitätstest durchgeführt werden. Diese Methoden wurden jedoch bisher in unserem Labor noch nicht etabliert.

Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits rekombinante Sendai-Viren zur Immunisierung gegen andere virale Infektionserreger, wie z. B. HIV-1, eingesetzt (Matano et al., 2001; Kano et al., 2002). Auch hier wurden Proteine anderer Viren mit Hilfe der rekombinanten Viren exprimiert.

Im Gegensatz dazu wurde auch unverändertes rekombinantes Virus für Immunisierungen eingesetzt. So wurden *African green monkeys* (*Cercopithecus aethiops*) mit SeV, das als auch als murines Parainfluenzavirus Typ 1 (MPIV1) bezeichnet wird, immunisiert. In den Tieren wurde eine schützende Immunantwort gegen eine Infektion mit dem nahe verwandten humanen Parainfluenzavirus Typ 1 (HPIV1) hervorgerufen (Hurwitz et al., 1997). Die Genome von MPIV1 und HPIV1 besitzen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit hoher Übereinstimmung (Newman et al., 2002).

Möchte man einen humanen Impfstoff auf der Basis rekombinanter Sendai-Viren entwickeln, so darf das Virus in Primaten nicht zu stark attenuiert sein. Die SeV-Stämme Z, H (Harris) und Fushimi sind mittlerweile durch die Anzucht in Eiern relativ

stark attenuiert. In Mäusen sind sie mit einer letalen Dosis₅₀ (LD₅₀) von 10⁴ PFU nicht so virulent wie z.B. die Stämme Ohita M und Hamanatsu (LD₅₀ < 10² PFU), die in Japan während unterschiedlicher Epidemien aus Labormäusen isoliert wurden (Itoh et al., 1992; Kiyotani et al., 1990). Die von uns verwendeten rekombinanten Viren auf der Basis des Fushimi-Stamms, sind in ihrer Virulenz in Mäusen noch stärker attenuiert. Selbst bei einer Dosis von 10⁶ PFU kam es nicht zu Todesfällen unter den infizierten Tieren.

Zusätzlich muss man jedoch berücksichtigen, dass dieses Virus, obwohl mauspathogen, ursprünglich aus einem Menschen isoliert wurde (Kuroya et al., 1953). Eine Übertragung des Krankheitserregers auf den Menschen ist also möglich. Versuche mit *African green monkeys* und Schimpansen haben gezeigt, dass sich rekombinantes Sendai-Virus (Z-Stamm) bei einer Dosis von 10⁴ und 10⁶ PFU sowohl im oberen, als auch im unteren Respirationstrakt der Tiere ebenso effizient vermehrt wie HPIV1 (Skiadopoulos et al., 2002), dem Verursacher von Krupp bei Kleinkindern. Weder HPIV1 noch SeV sind jedoch in der Lage Krankheitssymptome in diesen Tiermodellen zu entwickeln. Daher lässt sich nur das Wachstumsverhalten der beiden Viren vergleichen. SeV zeigt Eigenschaften, die es zu einem Kandidaten für Vakzinierung beim Menschen machen. Seine letztliche Eignung muss in klinischen Tests geprüft werden.

6.7 Ausblick auf weitere Versuche

Neben der Untersuchung einer von den rekombinanten Sendai-Viren ausgelösten IgA-Antwort im Mausmodell (siehe Diskussion 6.6), können noch weitere Versuche mit den erzeugten Viren durchgeführt werden. Durch den Einbau des Gens des BRSV-F-Protein in das Sendai-Virus-Genom ist es nun möglich, auch die BRSV-F-induzierte Immunantwort im Mausmodell zu untersuchen. Da BRSV nicht in der Lage ist, Mäuse zu infizieren, wurden solche Studien bisher an Baumwollratten oder an gnotobiotischen Kälbern durchgeführt.

Mit Hilfe der rekombinanten Sendai-Viren ist es gelungen eine lösliche Form des HRSV-F-Proteins in relativ großen Mengen zu exprimieren. Dieses lösliche Protein soll nun dazu verwendet werden, die Bindung des RSV-Fusionsproteins an seinen zellulären Rezeptor genauer zu charakterisieren.

Literaturverzeichnis

Ackermann, H. W., (1987): Bacteriophage taxonomie in 1987. *Microbiol. Sci.* **4**, 214-218

Agungpriyono, D. R., R. Yamaguchi, K. Uchida, Y. Tohya, A. Kato, Y. Nagai, M. Asakawa und S. Tateyama (2000): Green fluorescent protein gene insertion of Sendai virus infection in nude mice: possibility as an infection tracer. *J. Vet. Med. Sci.* **62**, 223-228

Barik, S., T. McLean und L. C. Dupuy (1995): Phosphorylation of Ser232 directly regulates the transcriptional activity of the P protein of human respiratory syncytial virus: Phosphorylation of Ser237 may play an accessory role. *Virology* **213**, 405-412

Bermingham, A. und P. L. Collins (1999): The M2-2 protein of human syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11259-11264

Bourgeois, C., C. Corvaisier, J. B. Bour, E. Kohli und P. Pothier (1991): Use of synthetic peptides to locate neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **72** 1051-1058

Bousse, T., T. Takimoto, W. L. Gorman, T. Takahashi und A. Portner (1994): Regions on the hemagglutinin-neuraminidase proteins of human parainfluenza virus type-1 and Sendai virus important for membrane fusion. *Virology* **204**, 506-514

Buchholz, U. J., H. Granzow, K. Schuldt, S. S. Whitehead B. R. Murphy und P. L. Collins (2000): Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitution from human respiratory syncytial virus (HRSV): Effects on host range and evaluation as a live attenuated HRSV vaccine. *J. Virol.* **74**, 1187-1199

Bukreyev, A., S. S. Whitehead und B. R. Murphy (1997): Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of mouse.

J. Virol **71**, 8973-8982

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

Calder, L. J., L. Gonzalez-Reyes und B. Garcia-Barreno (2000): Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* **271**, 122-131

Chambers, P., C. R. Pringle und A. J. Easton (1990): Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **71**, 3075-3080

Chanock, R. M., B. Roizman und R. Meyers (1957): Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). Isolation, properties and characterisation. *Am. J. Hyg.* **66**, 281-290

Chen, M., K. F. Hu, B. Rozell, C. Örvell, B. Morein und P. Liljeström (2002): Vaccination with recombinant alphavirus or immune-stimulating complex antigen against respiratory syncytial virus. *J. Immunol.* **169**, 3208-3216

Chen, X., G. Scala, I. Quinto, W. Liu, T. W. Chun, J. S. Justement, O. J. Cohen, T. C. vanCott, M. Iwanicki, M.G. Lewis, J. Greenhouse, T. Barry, D. Venzon und A. S. Fauci (2001): Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. *Nat. Med.* **7** 1125-1231

Collins, P. L., L. E. Dickens und A. Buckler-White (1986): Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4594-4598

Collins, P. L., M. G. Hill und P. R. Johnson (1990): The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: Sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J. Gen. Virol.* **71**, 3015-3020

Collins, P. L., K. McIntosh und R. M. Chanock (2001): Respiratory syncytial virus. In: *Fields Virology*, (D. M. Kniepe und P. M. Howley Eds.), 4th ed., pp 1443-1485, Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA

Collins, P. L. und B. R. Murphy (2002): Minireview: Respiratory syncytial virus: reverse genetics and vaccine strategies. *Virology* **296**, 204-211

Condrón, B. G., J. F. Atkins und R. F. Gesteland (1991): Frameshifting in gene 10 of bacteriophage T7. *J. Bacteriol.* **173**, 6998-7003

Connors, M., N. A. Giese, A. B. Kulkarni, C. Y. Firestone, H. C. R. Morse, und B. R. Murphy (1994): Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB7c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J. Virol.* **68**, 5321-5325

Corvaisier, C., G. Guillemin, C. Bourgeois, J. B. Bour, E. Kohli und P. Pothier (1993): Identification of T-cell epitopes adjacent to neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus. *Res. Virol.* **144**, 141-150

Corvaisier, C., C. Bourgeois und P. Pothier (1997): Cross-reactive and group-specific immune response to a neutralizing epitope of the human respiratory syncytial virus fusion protein. *Arch. Virol.* **142**, 1073-1086

Crowe, J. E., Jr., C. Y. Firestone und B. R. Murphy (2001): Passively acquired antibodies suppress humoral but not cell-mediated immunity in mice immunized with live attenuated respiratory syncytial virus vaccines. *J. Immunol.* **167**, 3910-3918

De Berardinis, P., R. Sartorius, C. Fanutti, R. N. Perham, G. Del Pozzo und J. Guardiola (2000): Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nat. Biotechnol.* **18**, 873-876.

Delespesse, G., L. P. Yang, Y. Oshima, C. Demeure, U. Shu, D. G. Byun und M. Sarfati (1998): Maturation of human neonatal CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes into Th1/Th2 effectors. *Vaccine* **16**, 1415-1419

Demerec, M. und U. Fano (1945): Bacteriophage-resistant mutants in *Escherichia coli*. *Genetics* **30**, 119-136

Dupuy, L. C., S. Dobson und V. Bitko (1999): Casein kinase 2-mediated phosphorylation of human respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase: Phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser (215) and is without effect. *J. Virol.* **73**, 8384-8392

Elango, N., M. Satake, J. E. Coligan, E. Norrby, E. Camargo und S. Venkatesan (1985): Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: nucleotide sequence of mRNA, identification of cleavage activation site and amino acid sequence of N-terminus of F1 subunit. *Nucleic Acids Res.* **13**, 1559-1574

El Kamasi, K. C., S. Devos, D. M. Theisen, N. H. C. Blons und C. P. Muller (1999): Crossreactivity of mimotopes and peptide homologues of a sequential epitope with a monoclonal antibody does not predict crossreactive immunogenicity. *Vaccine* **18**, 284-290

Falsey, A. R., C. K. Cunningham, W. H. Baker, R. W. Kouides, J. B. Yuen, M. Menegus, L. B. Weiner, C. A. Bonville und R. F. Betts (1995): Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J. Infect. Dis.* **172**, 389-394

Fearns, R., und P. L. Collins (1999): Role of the M2-1 transcription antitermination protein of human respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J. Virol.* **73**, 5852-5864

Garcin, D., T. Pelet, P. Calain, L. Roux, J. Curran und D. Kolakofsky (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**, 6087-6094

Garcin, D., J. Curran, M. Itoh und D. Kolakofsky (2001): Longer and shorter forms of Sendai virus C proteins play different roles in modulating the cellular antiviral response. *J. Virol.* **75**, 6800-6807

Geysen, H. M., S. J. Barteling und R. H. Melen (1985): Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 178-182

Gonzales-Reyes, L., M. B. Ruiz-Argüello, B. Garcia-Barreno, L. Calder, J. A. Lopez, J. P. Albar, J. J. Skehel, D. C. Wiley und J. A. Melero (2001): Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9859-9864

Grabowska, A., C. Jameson, P. Laing, E. Sjögren-Jansson, J. Taylor, A. Cunningham und W. L. Irving (1999): Identification of type-specific domains within glycoprotein G of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) recognized by the majority of patients infected with HSV-2, but not by those infected with HSV-1. *J. Gen. Virol.* **80**, 1789-1798

Grabowska, A. M., R. Jennings, P. Laing, M. Darsley, C. L. Jameson, L. Swift und W. L. Irving (2000): Immunization with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2. *Virology* **269**, 47-53

Graham, B. S., G. S. Henderson, Y. W. Tang, X. Lu, K. M. Neuzil und D. G. Colley (1993): Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *J. Immunol.* **151**, 2032-2040

Groothuis, J. R., S. J. King, D. A. Hogerman, P. R. Paradiso und E. A. Simoes (1998): Safety and immunogenicity of a purified F protein respiratory syncytial virus (PFP-2) vaccine in seropositive children with bronchopulmonary dysplasia. *J. Infect. Dis.* **177**, 467-469

Gruber, C. und S. Levine (1985): Respiratory syncytial virus polypeptides. V. The kinetics of glycoprotein synthesis. *J. Gen. Virol.* **66**, 1241-1247

Hancock, G. E., D.J. Speelman, P.J. Frenchick, M. M. Mineo-Kunn, R. B. Baggs und D. J. Hahn (1995): Formulation of the purified fusion protein of respiratory syncytial virus with the saponin QS-21 induces protective immune responses in BALB/c mice that are similar to those generated by experimental infection. *Vaccine* **13**, 391-400

Hardy, R. W. und G. W. Wertz (1998): The product of human respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J. Virol.* **72**, 520-526

Hardy, R. W., S. B. Harmon und G. W. Wertz (1999): Diverse gene junctions of human respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J. Virol.* **73**, 170-176

Hardy, R. W. und G. W. Wertz (2000): The Cys(3)-His(1) motif of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *J. Virol.* **74**, 5880-5885

Heminway, B. R., Y. Yu und Y. Tanaka (1994): Analysis of human respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* **200**, 801-805

Hoogen, B. G., van den, C. J. de Jong, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. M. Fouchier, A. D. Osterhaus (2001): A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* **71**, 719-724

Huang, Y. T. und G. W. Wertz (1982): The genome of human respiratory syncytial virus is a negative stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J. Virol.* **43**, 150-157

Hurwitz, J. L., K. F. Soike, M. Y. Sangster, A. Portner, R. E. Sealy, D. H. Dawson und C. Coleclough (1997): Intranasal Sendai virus vaccine protects African green monkeys from infection with human parainfluenza virus-type one. *Vaccine.* **15**, 533-540

Hussel, T., C. J. Baldwin, A. O'Garra und P. J. Openshaw (1997): CD8⁺ T cell control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3341-3349

Itoh, M., X. L. Wang, Y. Suzuki und M. Homma (1992): Mutation of the HANA protein of sendai virus by passage in eggs. *Virology* **190**, 356-364

Itoh, M., Y. Isegawa, H. Hotta und M. Homma (1997): Isolation of an avirulent mutant of Sendai Virus with two amino acid mutations from highly virulent field strain through adaptation to LLC-MK₂ cells. *J. Gen. Virol.* **78**, 3207-3215

Jin, H., H. Zhou, X. Cheng, R. Tang, M. Munoz und N. Nguyen (2000): Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NA1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology* **273**, 210-218

Johnson, S., C. Oliver und G. A. Prince (1997): Development of a humanized monoklonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against human respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **176**, 1215-1224

Kärber, G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **162**, 480-483

Kahn, J. S., A. Roberts, C. Weibel, L. Buonocore und J. K. Rose (2001): Replication-competent or attenuated, nonpropagating vesicular stomatitis viruses expressing respiratory syncytial virus (RSV) antigens protect mice against RSV challenge. *J. Virol.* **75**, 11079-11087

Kano, M., T. Matano, A. Kato, T. Shioda und Y. Nagai (2002): Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector. *Jpn. J. Infect. Dis.* **55**, 59-60

Kapikian, A. Z., R. H. Mitchell und R. M. Chanock (1969): An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **89**, 405-421

Karron, R. A., M. Makhene, K. Gray, M. H. Wilson, M. L. Clements und B. R. Murphy (1996): Evaluation of a live attenuated bovine parainfluenza type 3 vaccine in two-to-six-month-old-infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**, 650-654

Karron, R. A., D. A. Buonagurio, A. F. Georgiu, S. S. Whitehead, J. E. Adamus, M. L. Clements-Mann, D. O. Harris, V. B. Randolph, S. A. Udem, B. R. Murphy und M. S. Sidhu (1997): Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: Clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13961-13966

Kim, H. W., J. G. Canchola und C. D. Brandt (1969): Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **89**, 422-434

Kiyotani, K., S. Takao, T. Sakaguchi und T. Yoshida (1990): Immediate protection of mice from lethal wild-type Sendai virus (HVJ) infections by a temperature-sensitive mutant, HVJpi, possessing homologous interfering capacity. *Virology* **177**, 65-74

Klaus, S., D. Krüger und J. Meyer (1992): Bakterienviren. Gustav Fischer Verlag, Jena

Kuo, L., H. Grosfeld und J. Christina (1996): Effects of mutation in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **70**, 6892-6901

Kuo, L., R. Fearn und P. L. Collins (1997): Analysis of the gene start and gene end signals of respiratory syncytial virus: Quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. *J. Virol.* **71**, 4944-4953

Kuroya, M., N. Ishida und T. Shiratori (1953): Newborn virus pneumonia (Type Sendai) II. Report: the isolation of a new virus possessing hemagglutinin activity. *Yokohama Med. Bull.* **4**, 217-233

Kyhse-Andersen, J. (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lamb, R. A. und D. Kolakofsky (2001): Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*, (D. M. Kniepe und P. M. Howley Eds.), 4th ed., pp 1305-1340, Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA

Langedijk, J. P., R. H. Melen und J. T. van Oirschot (1998): Identification of a conserved neutralizing site in the first heptad repeat of the fusion protein of respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.* **143**, 313-320

Leyrer, S., W. J. Neubert und R. Sedlmeier (1998): Rapid and efficient recovery of Sendai virus from cDNA: factors influencing recombinant virus rescue. *J. Virol. Methods* **75**, 47-58

Li, X., S. Sambhara, C. X. Li, L. Ettore, I. Switzer, G. Cates, O. James, M. Parrington, R. Oomen, R. P. Du und M. Klein (2000): Plasmid DNA encoding the V G protein is a promising vaccine candidate. *Virology* **269**, 54-65

Lopez, J. A., N. Villanueva, J. A. Melero und A. Portela (1988): Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: evidence of subtype genetic heterogeneity. *Virus Res.* **10**, 249-261

Lopez, J. A., R. Bustos, C. Örvell, M. Berois, J. Arbiza, B. Garcia-Barreno und J. A. Melero (1998): Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion protein. *J. Virol.* **72**, 6922-6928

Lounsbach, G. R., C. Bourgeois, W. H. L. West, M. J. Carter und G. L. Toms (1993): Binding of neutralizing monoclonal antibodies to regions of the fusion protein of respiratory syncytial virus expressed in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* **74**, 2559-2565

Martin-Gallardo, A., K. A. Fien, B. T. Hu, J. F. Farley, R. Seid, P. L. Collins, S. W. Hildreth und P. R. Paradiso (1991): Expression of the F glycoprotein gene from human respiratory syncytial virus in *Escherichia coli*: mapping of a fusion inhibiting epitope. *Virology* **184**, 428-432.

Matano, T., M. Kano, H. Nakamura, A. Takeda und Y. Nagai (2001): Rapid appearance of secondary immune response and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic Immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA prime/Sendai virus vector boost regimen. *J. Virol.* **75**, 11891-11896

Meola, A., P. Delmastro, P. Monaci, A. Luzzago, A. Nicosia, F. Felici, R. Cortese und G. Galfre (1995): Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J. Immunol.* **154**, 3162-3172

Modrow, S., D. Falke und U. Truyen (2003): Molekulare Virologie. Spektrum, Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin

Morris, J. A., R. E. Blount und R. E., Savage (1956): Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 544-549

Morrisson, T. G. (1988): Structure, function, and intracellular processing of Paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res.* **10**, 113-136

Moss, B., O. Elroy-Stein, T. Mizukami, W. A. Alexander und T. R. Fuerst (1990): New mammalian expression vectors. Product review, *Nature* **348**, 91-92

Murphy, B. R., B. S. Graham, G. A. Prince, E. E. Walsh, R. M. Chanock, D. T. Karzon und P. F. Wright (1986a): Serum and nasal-wash immunoglobulin G and A antibody response of infants and children to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins following primary infection. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 1009-1014

Murphy, B. R., G. A. Prince, E. E. Walsh, H. W. Kim, R. H. Parrot, V. G. Hemming, W. J. Rodriguez und R. M. Chanock (1986b): Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein antibody responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 197-202

Newman, J. T., S. R. Surman, J. M. Riggs, C. T. Hansen, P. L. Collins, B. R. Murphy und M. H. Skiadopoulos (2002): Sequence analysis of the Washington/1964 strain of human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) and recovery and characterization of wild type recombinant HPIV1 produced by reverse genetics. *Virus Genes* **24**, 77-92

Openshaw, P. J., F. J. Culley und W. Olszewska (2001): Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine* **20**, 27-31

Paradiso, P. R., B. T. Hu, R. Arumugham und S. Hildreth (1991): Mapping of a fusion related epitope of the respiratory syncytial virus fusion protein. *Vaccine* **9**, 231-237

Power, U. F., T. Huss, V. Michaud, H. Plotnicky-Gilquin, J. Y. Bonnefoy und T. N. Nguyen (2001a): Differential histopathology and chemokine gene expression in lung tissues following respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV- or BBG2Na-immunized mice. *J. Virol.* **75**, 12421-12430

Power, U. F., T. N. Nguyen, E. Rietveld, R. L. de Swart, J. Groen, A. D. Osterhaus, R. de Groot, N. Corvaia, A. Beck, N. Bouveret-Le-Cam und J. Y. Bonnefoy (2001b): Safety and immunogenicity of a novel recombinant subunit respiratory syncytial virus vaccine (BBG2Na) in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* **184**, 1456-1460

Russel, M. (1991): Filamentous phage assembly. *Mol. Microbiol.* **5**, 1607-1613

Scala, G., X. Chen, W. Liu., J. N. Telles, O. J. Cohen, M. Vaccarezza, T. Igarashi und A. S. Fauci (1999): Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J. Immunol.* **162**, 6155-6161

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

Scheid, A. und P. W. Choppin (1974b): The hemagglutinin and neuraminidase protein of a paramyxovirus: interaction with neuraminic acid in affinity chromatography. *Virology* **62**, 125-133

Schlender, J., B. Bossert, U. Buchholz und K. K. Conzelmann (2000): Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* **74**, 8234-8242

Schmidt, A. C., J. M. McAuliffe, A. Huang, S. R. Surman, J. E. Bailly, W. R. Elkins, P. L. Collins, B. R. Murphy und M. H. Skiadopoulos (2000): Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins make an important contribution to the restricted replication of BPIV3 in primates. *J. Virol.* **74**, 8922-8929

Schmidt, A. C., J. M. McAuliffe, B. R. Murphy und P. L. Collins (2001): Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. *J. Virol.* **75** 4594-4603

Schmidt, A. C., D. R. Wenzke, J. M. McAuliffe, M. St. Clair, W. R. Elkins, B. R. Murphy und P. L. Collins (2002): Mucosal Immunisation of rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 using live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone. *J. Virol.* **76**, 1089-1099

Shay, D. K., R. C. Holman, R. D. Newman, L. L. Liu, J. W. Stout und L. J. Anderson (1999): Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *J. Am. Med. Assoc.* **282**, 1440-1446

Skiadopoulos, M. H., S. R. Surman, J. M. Riggs, W. R. Elkins, M. St. Claire, M. Nishio, D. Garcin, D. Kolakofsky, P. L. Collins und B. R. Murphy (2002): Sendai virus, a murine parainfluenza type 1, replicates to a level similar to human PIV1 in the upper and lower respiratory tract of African green monkeys and chimpanzees. *Virology* **297**, 153-160

Smith, G. P. und J. K. Scott (1993): Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* **217**, 228-257

Son, M., S. J. Hayes und P. Serwer (1988): Concatemerisation and packaging of bacteriophage T7 DNA in vitro: determination of the concatemers' length and appearance kinetics by use of rotating gel electrophoresis. *Virology* **162**, 38-46

Srikiatkachorn, A. und T. J. Braciale (1997): Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J. Exp. Med.* **186**, 421-432

Steven, A. C., B. L. Trus, J. V. Maizel, M. Unser, D. A. Parry, J. S. Walls, J. F. Hainfeld und F. W. Studier (1988): Molekular substructure of viral receptor-recognition protein. The gp17 tail-fiber of bacteriophage T7. *J. Mol. Biol.* **200**, 351-365

Steward, M. W. (2001): The development of a mimotope-based synthetic peptide vaccine against respiratory syncytial virus. *Biologicals* **29**, 215-219

Taylor, G., E. J. Stott, J. Furze, J. Ford und P. Sopp (1992): Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **73**, 2217-2223.

Taylor, G., E. J. Stott, M. Hughes und A. P. Collins (1984): Respiratory syncytial virus infection in mice. *Infect. Immun.* **43**, 649-655

Teng, M. N. und P. L. Collins (1998): Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J. Virol.* **72**, 5707-5716

Teng, M. N., S. S. Whitehead, A. Bermingham, M. S. Clair, W. R. Elkins, B. R. Murphy und P. L. Collins (2000): Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J. Virol.* **74**, 9317-9321

The Impact-RSV Study Group (1998): Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* **102**, 531-537

Trudel, M., F. Nadon, C. Seguin, G. Dionne und M. Lacroix (1987): Identification of a synthetic peptide as a part of a major neutralization epitope of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 2273-2280

Trudel, M., E. J. Stott, G. Taylor, D. Oth, G. Mercier, F. Nadon, C. Seguin, C. Simard und M. Lacroix (1991): Synthetic peptides corresponding to the F protein of RSV stimulate murine B and T cells but fail to confer protection. *Arch. Virol.* **117**, 59-71

Veronese, F. D. M., A. E. Willis, C. Boyer-Thompson, E. Appella und N. R. Perham (1994): Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide Epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *Mol. Biol.* **243**, 167-172

Wertz, G. W., M. Krieger und L. A. Ball (1989): Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *J. Virol.* **63**, 4767-4776

Willis, A. E., N. R. Perham und D. Wraith (1993): Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* **128**, 79-83

Whimbey, E., R. E. Champlin und R. B. Couch (1996): Community respiratory virus infections among hospitalized adult bone marrow transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **73**, 778-782

Wright, P. F., R. A. Karron, R. B. Belshe, J. Thompson, J. E. Crowe, Jr., T. G. Boyce, L. L. Halburt, G. W. Reed, S. S. Whitehead, E. L. Anderson, A. E. Wittek, R. Casey, M. Eichelberger, B. Thumar, V. B. Randolph, S. A. Udem, R. M. Chanock und B. R. Murphy (2000): Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *J. Infect. Dis.* **182**, 1331-1342

Zimmer, G., I. Trotz und G. Herrler (2001): N-glycans of F protein differentially affect fusion activity of human respiratory syncytial virus. *J Virol.* **75**, 4744-51

Zimmer, G., L. Butz und G. Herrler (2001): Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein: cleavage at two furin consensus sequences.

J. Biol. Chem. **276**, 31642-31650

Zimmer, G., K. K. Conzelmann und G. Herrler (2002): Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR¹⁰⁹ and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture. *J. Virol.* **76**, 9218-9224

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Tagungen präsentiert:

- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 08.-11. April 2002
Poster: Use of bacteriophage T7 for the expression of immunogenic peptides of the respiratory syncytial virus fusion protein.
B. Voges, G. Zimmer und G. Herrler
- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 26.-29. März 2003
Poster: Immunisation of mice using recombinant Sendai virus (SeV) expressing different forms of the human syncytial virus (HRSV) fusion protein.
B. Voges, G. Zimmer, S. Bossow, W. Neubert und G. Herrler
- 12th International Conference on Negative Strand Viruses, Pisa, 14.-19. Juni 2003
Poster: Immunisation of mice using recombinant Sendai virus (SeV) expressing different forms of the human syncytial virus (HRSV) fusion protein.
B. Voges, G. Zimmer, S. Bossow, W. Neubert und G. Herrler

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg Herrler für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der Durchführung der Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft bei Siegen und Niederlagen von Hannover 96. Herrn Prof. Hans-Jörg Jacobsen danke ich für die Übernahme des Korreferates trotz seines stets vollen Terminkalenders.

Herrn Dr. Gert Zimmer danke ich für die engagierte Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor, sowie für fachliche Diskussionen und Anregungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Neubert und Herrn Dr. Sascha Bossow aus dem Max-Planck Institut, Martinsried, möchte ich mich für ihre Kooperation bei der Herstellung der rekombinanten Sendai-Viren bedanken, die meine Arbeit um viele interessante Ergebnisse bereicherten.

Herrn Prof. Dr. Hans Joachim Hackbarth und Herrn Helge Stelzer vom Zentrum für Tierschutz und Verhalten der TiHo danke ich ganz herzlich für die Beratung und die praktische Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die freundliche Aufnahme in „Kuchenclub“ und „Iso-Frühstücksrunde“ bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt meinen „Zimmergenossinnen“ Wiebke und Christine, die neben vielen fachlichen Tips auch immer Schokolade, Kekse und aufmunternde Worte hatten. Ebenso gilt mein besonderer Dank meinen weiteren „Mit-Dortoranden“ Birthe, Diana, Matthias und Dr. Christel, durch die ich im Labor so viele schöne Momente wie „Waschwannenrennen“ und „Aktionswochen“ (..Veros für Wiebke..) hatte.

Oliver danke ich für sein großes Interesse an meiner Arbeit. Ohne seine Nackenmassagen und Durchhalteparolen wäre diese Dissertation wahrscheinlich nie abgeschlossen worden.