

Entwicklung viraler Vektoren für den gentherapeutischen Einsatz in der Lunge

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Alexandra Hey

geboren am 25.04.1980 in Dortmund

(2008)

Referent: PD Dr. G. Zimmer

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

Tag der Promotion: 15.02.08

Für alle, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Was wir wissen, ist ein Tropfen;
was wir nicht wissen, ein Ozean.

(Isaac Newton)

Zusammenfassung

Für gentherapeutische Zwecke werden heute zumeist retrovirale und adenovirale Vektoren sowie adeno-assoziierte Viren eingesetzt. Hinsichtlich einer Gentherapie des Respirationstraktes konnten aber bisher mit diesen Vektoren keine Erfolge erzielt werden. Als größtes Hindernis erwies sich die polare Organisation des Respirationsepithels, welches gegenüber einer apikalen Infektion durch die genannten Viren weitgehend resistent ist.

Das Ziel dieses Dissertations-Projektes war daher die Entwicklung eines viralen Vektors für den effizienten Gentransfer in das respiratorische Epithel vor allem hinsichtlich einer möglichen Behandlung der Cystischen Fibrose. Das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) ist ein RNA-Virus, welches polarisierte Epithelzellen streng basolateral infiziert. Es konnte gezeigt werden, dass das Glykoprotein des Influenza-C-Virus (HEF) in die Hülle von VSV-Partikeln aufgenommen wurde und dadurch eine apikale Infektion polarisierter Epithelzellen vermittelte. Von diesem Protein wurden in der vorliegenden Arbeit drei Mutanten angefertigt (S71C, C652S, Furin-Mutante), die die Eigenschaften des Vektors verbessern sollten. Alle HEF-Mutanten wurden an der Zelloberfläche exprimiert und vermittelten mit Ausnahme der Furin-Mutante, die nicht proteolytisch aktiviert wurde, eine Infektion von MDCK-I-Zellen. Doch keine der Mutanten wies günstigere Eigenschaften auf als das native HEF-Protein. Daher wurden andere virale Hüllproteine für die Pseudotypisierung eingesetzt, nämlich das AcMNPV-GP64, das LCMV-GP und das Ebola-Zaire-GP. Diese Glykoproteine wurden in BHK-21-Zellen zur Zelloberfläche transportiert und vermittelten eine apikale Infektion polarisierter Epithelzellen, wenn sie zur Pseudotypisierung von VSV eingesetzt wurden. Dabei stellte sich heraus, dass VSV*- Δ G (LCMV-GP) hinsichtlich Virustiter und apikaler Infektion von allen heterologen Glykoproteinen am effizientesten war.

Ein wesentlicher Nachteil von VSV als Vektor für eine Substitutionstherapie ist seine Zytopathogenität, die vor allem auf verschiedene Aktivitäten des viralen Matrixproteins (M) zurückzuführen ist. Durch gezielte Mutagenese des M-Proteins ist es in früheren Arbeiten gelungen, nicht-zytopathogene VSV-Vektoren (VSV*ncp und VSV*ncp- Δ G) zu entwickeln. Diese VSV-Mutanten wurden in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass im Unterschied zum Elternvirus (VSV*cp) VSV*ncp die zelluläre Proteinexpression nicht inhibierte, jedoch immer noch zytotoxisch war. VSV*ncp- Δ G, welchem zusätzlich das VSV-G-Protein entfernt worden war, wies dagegen in Vero-Zellen eine deutlich geringere Zytotoxizität auf und induzierte nur noch wenig Apoptose. Dies zeigte, dass nicht nur das M-, sondern auch das G-Protein an der Zytopathogenese von VSV maßgeblich beteiligt ist. In Interferon-kompetenten Zellen, wie z. B. A549-Zellen, wies VSV*ncp- Δ G jedoch immer noch zytotoxische Eigenschaften und eine verlangsamte Virusreplikation auf, die auf die Induktion von Interferon- β zurückgeführt werden können. In Vero-Zellen war nach einer Infektion mit VSV*ncp- Δ G die Expression eines Reportergens noch 14 Tage später nachweisbar, nicht aber in A549-Zellen.

Gentherapeutische Vektoren, Respirationstrakt, Virus der vesikulären Stomatitis

II

Summary

Retroviral, adenoviral and adeno-associated vectors are commonly used for gene therapeutical approaches. However for gene therapy of lung diseases these vectors turned out to be inefficient. A major drawback of these vectors is that they are unable to infect polarized epithelial cells via the apical membrane.

The aim of this dissertation project was the generation of a viral vector that efficiently delivers genes into the respiratory epithelium and which can be used for treatment of lung diseases such as cystic fibrosis. VSV is a RNA virus which infects polarized cells from the basolateral membrane. It was previously shown that VSV pseudotypes containing the influenza C virus glycoprotein (HEF) could infect polarized epithelial cells from the apical membrane. In this work three mutants of the glycoprotein were generated (S71C, C652S, furin mutant) to improve the properties of the vector. All mutants were expressed at the plasma membrane and mediated infection of MDCK-I cells – except the furin mutant which was not proteolytically activated. In general, all mutants were less efficient compared to the native HEF protein. Therefore other viral glycoproteins were used for VSV pseudotyping, namely the AcMNPV-GP64, the LCMV-GP and the Ebola-Zaire-GP. These glycoproteins were also transported to the plasma membrane of BHK-21 cells and mediated pseudotype infection of polarized epithelial cells from the apical side. VSV*- Δ G (LCMV-GP) turned out to be the most efficient one with respect to both virus titer and apical infection.

A major disadvantage of VSV as a vector for substitution therapy is its cytopathogenicity which is attributed to the activities of the matrix protein (M). Previous work succeeded in generating less cytopathogenic VSV vectors (VSV*ncp and VSV*ncp- Δ G). In this work these mutants were characterized. VSV*ncp did not inhibit cellular protein expression – in contrast to VSV*cp – but it was still cytotoxic. After infection of Vero cells with VSV*ncp- Δ G, which did not express the VSV-G protein, the cytopathic effect was clearly diminished and less caspase-3/7 activity was induced. This leads to the idea that not only VSV-M but also VSV-G plays an important role in the pathogenesis of VSV. In interferon competent cells, like A549 cells, VSV*ncp- Δ G still shows cytotoxic characteristics and a slowed replication kinetic which is due to the induction of interferon- β . In Vero cells gene expression was still detectable 14 days after infection with VSV*ncp- Δ G, but not in A549 cells.

Gene therapeutic vectors, respiratory tract, vesicular stomatitis virus

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Gentherapie	1
1.2 Cystische Fibrose	2
1.2.1 Krankheitsbild	2
1.2.2 Therapie	3
1.3 VSV als Vektorsystem	6
1.3.1 Das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV)	6
1.3.2 VSV-Mutanten	9
1.3.3 VSV-Pseudotypen	10
1.4 Zielsetzung	11
2. Material	12
2.1 Bakterienstämme	12
2.2 Eukaryotische Zellen	12
2.3 Viren	12
2.4 Oligonukleotide	13
2.5 Plasmide	15
2.6 Standards	16
2.6.1 DNA-Größenstandards	16
2.6.2 Protein-Größenstandards	16
2.7 Enzyme	16
2.8 Antikörper	17
2.9 Substrate	17
2.10 Reagenzsysteme, Transfektionsreagenzien	18
2.11 Chemikalien	18
2.12 Medien, Puffer, Lösungen	21
2.12.1 Medien und Puffer für die Bakterienkultur	21
2.12.2 Medien und Puffer für die Zellkultur	21
2.12.3 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten mit DNA	23
2.12.4 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten mit Proteinen	24
2.13 Verbrauchsmaterialien	25
2.14 Technische Ausstattung	26
3. Methoden	28
3.1 Molekularbiologische Methoden	28
3.1.1 Plasmidpräparation	28
3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion	28

3.1.3 PCR-Mutagenese	29
3.1.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	30
3.1.5 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA	30
3.1.6 Dephosphorylierung	31
3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten	31
3.1.8 Herstellung chemokompetenter XL1-Blue-Bakterien	31
3.1.9 Transformation	32
3.1.10 Kolonie-PCR	32
3.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNA	33
3.1.12 Sequenzierung	33
3.2 Zytologische Methoden	33
3.2.1 Zellpassagen	33
3.2.2 Zellen einfrieren und auftauen	34
3.2.3 Ausschluss von Mykoplasmenkontaminationen	34
3.2.4 Kultivierung von Zellen auf Filtersystemen	35
3.2.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen	35
3.2.6 SEAP-Nachweis	35
3.2.7 Herstellung stabiler Zelllinien	35
3.2.8 Quantifizierung positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie	36
3.2.9 Luziferase-Nachweise	36
3.2.10 β -Galaktosidase-Nachweis	37
3.2.11 Lactat-Dehydrogenase-Nachweis	37
3.2.12 Nachweis der Caspase-Aktivität	38
3.2.13 Fixieren und Permeabilisieren von Zellen, Immunfluoreszenztest	38
3.3 Proteinchemische Methoden	39
3.3.1 SDS-PAGE	39
3.3.2 Western-Blot	39
3.3.3 Biotinylierung und Immunpräzipitation	40
3.4 Virologische Methoden	41
3.4.1 Herstellung und Vermehrung von VS-Viren	41
3.4.2 VSV-Pseudotypisierung	42
3.4.3 Virus-Titration, Plaque-Test	42
4. Ergebnisse	43
4.1 VSV-Pseudotypen	43
4.1.1 Das HEF-Protein des Influenza-C-Virus	43
4.1.2 Untersuchung weiterer Glykoproteine	47
4.1.2.1 GP64 des Baculovirus AcMNPV	47
4.1.2.2 Glykoprotein des LCMV	52

4.1.2.3 Glykoprotein des Ebola-Virus	53
4.1.2.4 Pseudotypisierung von VSV mit GP64, LCMV-GP und Ebo-GP	55
4.1.2.5 Infektionsstudien an polarisierten Epithelzellen	59
4.2 VSV-Mutanten	60
4.2.1 Charakterisierung des VSV*ncp	61
4.2.2 Integration einer RUC-GFP-Kassette in das VSV-Genom	70
4.2.3 VSV-Deletionsmutanten	71
4.3 Vorversuche zur Verwendung eines therapeutischen Gens im VSV-Vektor	74
4.3.1 Replikationsverhalten des VSV*ncp- Δ G-LacZ	74
4.3.2 Klonierung des mCFTR-Gens	75
5. Diskussion	77
5.1 VSV-Pseudotypen	77
5.1.1 Das HEF-Protein des Influenza-C-Virus	77
5.1.2 Untersuchung weiterer Glykoproteine	79
5.1.3 Infektion polarisierter Zellen mit VSV-Pseudotypen	81
5.2 VSV-Mutanten	81
5.2.1 Charakterisierung des VSV*ncp	81
5.2.2 VSV-Deletionsmutanten	83
5.2.3 Replikationsverhalten des VSV*ncp- Δ G-LacZ und Klonierung des mCFTR-Gens	85
5.3 Ausblick	85
6. Anhang	87
7. Literaturverzeichnis	92

Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumenprozent	HCV	Hepatitis-C-Virus
% w/v	Gewichtsprozent	HEF-Protein	Hämagglutination-Esterase-Fusions-Protein
AS	Aminosäuren	HIV-env	Hüllprotein des Humanen Immundefizienzvirus
A	Adenin	H ₂ O	Reinstwasser
Abb	Abbildung	HRSV	Humanes respiratorisches Synzytialvirus
AcMNPV	<i>Autographa californica multicausid nucleopolyhedrovirus</i>	INF	Interferon
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser	IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
as	<i>antisense</i>	JSRV	<i>Jaagsiekte Sheep Retrovirus</i>
bp	Basenpaare	kb	Kilobasen
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe-Virus	l	Liter
C	Cytosin	LacZ	Gen der β -Galaktosidase
°C	Grad Celsius	LASV	Lassa-Virus
cDNA	<i>complementary DNA</i>	LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
CF	Cystische Fibrose	LDH	Lactatdehydrogenase
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductanct regulator</i>	Luc	<i>Luciferase (Firefly)</i>
CMV	Cytomegalievirus	MARV	Marburg-Virus
d	<i>days</i> , Tage	min	Minute
Da	Dalton	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
DI	<i>defective interfering</i>	mol	Mol
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mRNA	<i>messenger RNA</i>
dNTP	Dinukleotidtriphosphat	NA	Neuraminidase
Ebo	Ebola-Virus	ncp	<i>not cytopathogenic</i>
ECL	Enzym-Chemolumineszenz	nm	Nanometer
<i>E. coli</i>	<i>Eschericha coli</i>	nt	Nukleotide
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	O. D.	Optische Dichte
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>	PFU	Plaque-bildende Einheiten
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)	Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	rev	<i>reverse</i>
FIV	Felines Immundefizienzvirus	RNA	Ribonukleinsäure
fwd	<i>forward</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
g	Gramm	RUC	<i>Renilla Luciferase</i>
G	Guanin	s	<i>sense</i>
GFP	grün-fluoreszierendes Protein	SARS-CoV	SARS (<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>) -Coronavirus
h	Stunden (hours)	SEAP	<i>secreted alkaline phosphatase</i>
HA	Hämagglutinin		

SeV	Sendai-Virus
SIV	Simian Immundefizienzvirus
SV40	Simian Virus Typ 40
sec	Sekunde
syn	synthetisch
T	Thymin
Tab	Tabelle
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
VLP	<i>Virus like particles</i>
VSV	Virus der vesikulären Stomatitis
WT	Wildtyp, nativ

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Vereinfachtes Modell der CF-Pathophysiologie.	2
Abbildung 2:	Darstellung des Atemweg-Epithels.	3
Abbildung 3:	Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung eines VS-Viruspartikels.	6
Abbildung 4:	Genom des VS-Virus.	7
Abbildung 5:	Infektionszyklus des VSV.	8
Abbildung 6:	Schematische Darstellung einer PCR-Mutagenese.	29
Abbildung 7:	Herstellung von VS-Viren.	41
Abbildung 8:	Schematische Darstellung des HEF-Proteins.	44
Abbildung 9:	Expression der HEF-Proteine in BHK-21-Zellen.	45
Abbildung 10:	Oberflächenbiotinylierung von MDCK-II-Zellen nach Transfektion der HEF-Konstrukte.	46
Abbildung 11:	Expressionsanalyse des GP64 mittels Immunfluoreszenztest.	49
Abbildung 12:	Untersuchung der Expression des GP64 bei unterschiedlichen Temperaturen.	50
Abbildung 13:	Expressionsanalyse des GP64syn in BHK-21-Zellen.	51
Abbildung 14:	Oberflächenbiotinylierung von BHK-21-Zellen nach Transfektion verschiedener GP64-Konstrukte.	51
Abbildung 15:	Expression des LCMV-GP in BHK-21-Zellen.	53
Abbildung 16:	Expressionsanalyse des Ebola-GP (natives Protein und Deletionsmutante) in BHK-21-Zellen.	55
Abbildung 17:	Schema zur Herstellung der Pseudotypen.	55
Abbildung 18:	Infektion von BHK-21-Zellen mit Pseudotypen (Kontrollen).	56
Abbildung 19:	Infektion von BHK-21-Zellen mit VSV*- Δ G (GP64)-Pseudotypen.	57
Abbildung 20:	Infektion von BHK-21-Zellen mit VSV*- Δ G (LCMV-GP)-Pseudotypen.	58
Abbildung 21:	Infektion von BHK-21-Zellen mit VSV*- Δ G (Ebo-GP)-Pseudotypen.	58
Abbildung 22:	Infektion von MDCK-II-Zellen mit verschiedenen VSV-Pseudotypen.	59
Abbildung 23:	Infektion von polarisierten MDCK-II-Zellen.	60
Abbildung 24:	Darstellung der VSV-Mutanten.	61
Abbildung 25:	Kinetik der replikationskompetenten VS-Viren.	62
Abbildung 26:	Kinetik der VSV- Δ G-Viren.	62
Abbildung 27:	Morphologische Veränderungen von Vero-Zellen nach VSV-Infektion.	63
Abbildung 28:	Expression eines Reporters nach Infektion von BHK-21- (A) und HBE-Zellen (B) mit VS-Viren.	64
Abbildung 29 :	Aktivierung des INF- β -Promotors in A549-, HBE- und BHK-21-Zellen nach Infektion mit verschiedenen VS-Viren.	65
Abbildung 30:	Caspase-Aktivität (A) und LDH-Freisetzung (B) nach Infektion von Vero-Zellen mit VS-Viren.	67
Abbildung 31:	Caspase-Aktivität (A) und LDH-Freisetzung (B) nach Infektion von BHK-21-Zellen mit VS-Viren.	68

Abbildung 32:	Darstellung des VSV*ncp-ΔG -Genoms mit LacZ-Kassette.	69
Abbildung 33:	Messung der β-Galaktosidase-Aktivität nach Infektion von Vero-Zellen mit VSV*ncp-ΔG-LacZ.	69
Abbildung 34:	Darstellung der generierten VSV-Genome mit RUC-GFP-Kassette.	70
Abbildung 35:	GFP-Expression nach Infektion von BHK-21-Zellen mit VSVcp-RUC-GFP.	70
Abbildung 36:	Luziferase-Aktivität nach Infektion von BHK-21-Zellen mit VSV-RUC-GFP.	71
Abbildung 37:	Hergestellte VSV-Deletionsmutanten.	71
Abbildung 38:	Immunfluoreszenz zum Nachweis der induzierbaren, stabilen Expression von VSV-Msyn und -G in CHO-E6-Zellen.	72
Abbildung 39:	Nachweis der Msyn- und G-Protein-Expression in der stabilen Zelllinie CHO-M-IRES-G mittels Western-Blot.	73
Abbildung 40:	Nachweis der VSV-Proteine im Überstand von CHO-M-IRES-G-Zellen.	73
Abbildung 41:	Infektion von induzierten BHK-G43-Zellen mit VSV*ncp-ΔG-LacZ (1 Pfu / 4 x 10 ⁴ Zellen).	74
Abbildung 42:	Replikation des VSV*ncp-ΔG-LacZ und des VSV*ncp-ΔG.	74
Abbildung 43:	Aktivierung des Interferon-β-Promotors nach Infektion von HBE-Zellen mit VSV*ncp-ΔG-LacZ und VSV*ncp-ΔG.	75
Abbildung 44:	Sequenzabschnitte des mCFTR-Gens im Plasmid pCR2.1.	75
Abbildung 45:	Bindungsstellen der Sequenzierprimer zur Analyse der mCFTR-Sequenz.	76
Tabelle 1:	Verwendung von viralen Vektoren in der Gentherapie (Lunge).	4
Tabelle 2:	Beispiele viraler Pseudotypen zur Therapie von Atemwegserkrankungen.	5
Tabelle 3:	Beispiele einiger VSV-Pseudotypen.	10
Tabelle 4:	Verwendete Zellkulturen.	34
Tabelle 5:	Durchflusszytometrische Analyse der HEF-Konstrukte in BHK-21-Zellen.	46
Tabelle 6:	Titration der VSV*-ΔG (HEF)-Pseudotypen auf MDCK-I-Zellen.	47
Tabelle 7:	Titer der VSV-ΔG-Pseudotypen.	59

1. Einleitung

1.1 Gentherapie

Bei Gentherapien werden Gene in Zellen eines Individuums eingebracht, um Erbkrankheiten bzw. Gendefekte zu behandeln. Ein genetischer Defekt liegt vor, wenn bei einem Lebewesen ein Gen fehlt oder es eine Mutation enthält, die dazu führt, dass das Genprodukt nicht gebildet wird oder seine Funktion nicht richtig ausüben kann. Durch den Transfer eines therapeutischen Gens sollen Gendefekte kompensiert und Krankheiten geheilt werden.

1990 wurde erstmalig eine Gentherapiestudie am Menschen mit viralen Vektoren zur Therapie des ADA (Adenosin-Deaminase)-Mangels durchgeführt (R. M. Blaese, USA; Kohn *et al.*, 1998). 1994 fand die erste Gentherapiestudie in Deutschland statt (Wittig *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zur Keimbahntherapie, die aus ethischen Gründen nicht erlaubt ist, werden bei der somatischen Gentherapie eingeführte Gene nicht von einer zur nächsten Generation weitergegeben. Das Einführen eines therapeutischen Gens, welches die Funktion eines defekten Gens übernimmt, kann zur Verbesserung der klinischen Symptome führen (Substitution). Eine andere Möglichkeit der Gentherapie besteht darin, zu stark exprimierte Gene zu inhibieren, indem man Gene für *antisense*-RNA oder für monoklonale Antikörper exprimiert (Inhibition). Außerdem können mit Hilfe der Gentherapie das Immunsystem moduliert oder z. B. in der Tumorthherapie Suizid- und Toxingene übertragen werden. Die therapeutischen Gene werden meist in isolierte Körperzellen übertragen, die dann wieder reinjiziert werden (*ex vivo*-Transfer). Eine direkte Verabreichung der Gene kann ebenfalls erfolgen (*in vivo*-Transfer).

Seit langem ist man bestrebt, ein therapeutisches Gen ohne infektiöse Agenzien in die Zellen zu bringen. Dies ließe sich durch künstlich verpackte oder sogar nackte DNA ohne Vektor umgehen. Neben einigen Vorteilen dieses nicht-viralen Transfers (geringe Zytotoxizität und Abwehrmechanismen durch Immunsystem) gibt es aber auch deutliche Nachteile: die von Zelltyp zu Zelltyp stark schwankenden Transfektionseffizienzen, die fehlende Zellspezifität, der mangelnde Schutz der DNA vor dem lysosomalen Abbau und die transiente Expression. Der Gentransfer kann mittels chemischer (z. B. Liposomen) oder physikalischer Methoden (z. B. Mikroinjektion, Elektroporation, Ultraschall) stattfinden.

Da Viren sich darauf spezialisiert haben, ihr Erbgut in Zellen einzuschleusen, versucht man, diese als Transportmittel für therapeutische Gene zu nutzen. Unterschiedliche Viren (z. B. Adenoviren, Lentiviren oder Herpesviren) besitzen verschiedene Transfereffizienzen und Zelltropismen und unterscheiden sich in ihrem Infektionsverlauf bzw. der Expressionsdauer.

1.2 Cystische Fibrose

1.2.1 Krankheitsbild

Die Cystische Fibrose (CF), auch unter dem Namen Mukoviszidose bekannt, ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Krankheit in Europa und in Nordamerika. 1946 wurde die Krankheit erstmals von Anderson und Hodges auf eine genetische Ursache zurückgeführt (Quinton, 1999). Das betroffene Genprodukt CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) konnte 1989 von Riordan *et al.* als ein epithelialer Chloridkanal identifiziert werden.

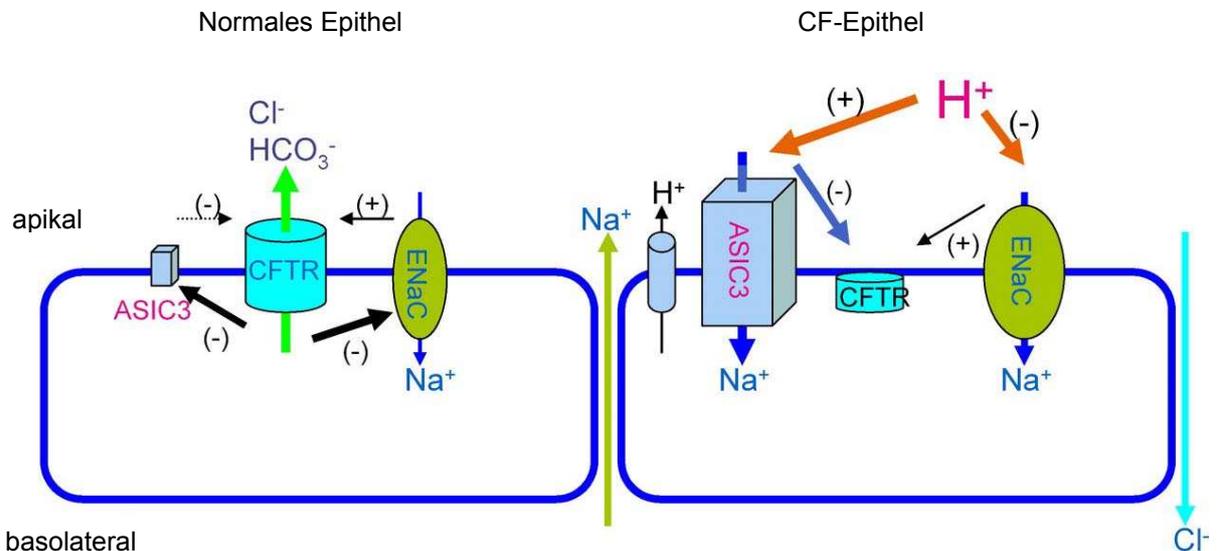


Abb. 1: Vereinfachtes Modell der CF-Pathophysiologie. Im normalen Epithel (links) reguliert u. a. der CFTR-Kanal den Cl-Fluss. Ist dieser Kanal in seiner Funktion gestört (rechts), kommt es zum verstärkten Einstrom von Na-Ionen in die Zelle und der pH-Wert des Lungensekrets wird sauer (aus: Su *et al.*, 2006).

Dieser inhibiert u. a. den epithelialen Natriumkanal (ENaC) und den säuresensitiven Ionenkanal (ASIC), so dass bei einem Gendefekt des CFTR-Kanals der Natriumfluss durch den ASIC größer wird und es somit letztendlich zu einem verstärkten Einstrom von Wasser in die Zelle kommt (Abb. 1). Den Sekreten in den Atemwegen wird dadurch Flüssigkeit entzogen und es entsteht ein zähes, klebriges Sekret, das in erster Linie den Schleimtransport der Flimmerhärchen stört. Zugleich entwickeln sich Infektionen, da Bakterien ebenfalls nicht entfernt werden und in den Atemwegen verbleiben. Neben der Lunge sind bei der Cystischen Fibrose auch die Bauchspeicheldrüse, die Leber, der Darm, das Herz, die Schweißdrüsen und der Reproduktionstrakt betroffen.

1.2.2 Therapie

Zur Behandlung der CF-Symptome werden derzeit u. a. künstlich zugeführte Enzyme für die Verdauung, entzündungshemmende Medikamente und Inhalations- sowie Physiotherapien eingesetzt. Des Weiteren wird eine intensive Antibiotika-Therapie bei bestehenden Infektionen bzw. zur Vorbeugung durchgeführt. Bei schwierigen Krankheitsverläufen ist eine Lungentransplantation die einzige Aussicht auf Heilung. Heute liegt die mittlere Lebenserwartung eines betroffenen Patienten bei über 40 Jahren. Die eigentlichen Ursachen der Cystischen Fibrose kann man aber bisher nicht beseitigen.

Gentherapiestudien zur Heilung der CF befinden sich seit einigen Jahren in klinischen Tests. Dabei soll ein gesundes Gen in die betroffenen Zellen eingeschleust werden und zur Synthese von normalem CFTR führen. Ein großes Hindernis sind die extrazellulären Barrieren des Atemwegepithels, wie z. B. der produzierte Schleim (Mucus) und dessen ziliärer Transport sowie die *tight junctions*.

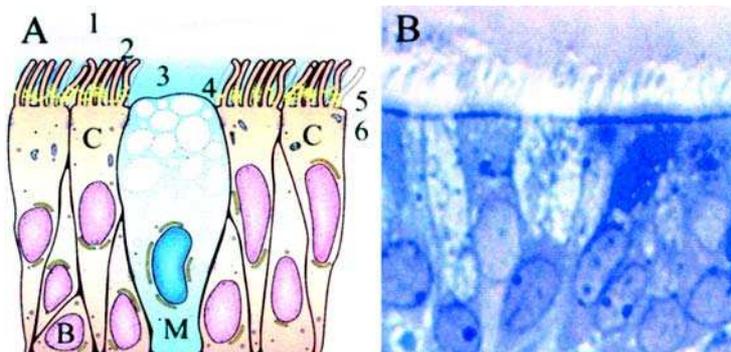


Abb. 2: Darstellung des Atemweg-Epithels. Das Epithel besteht aus Zilien-tragenden Zellen (C), Mucus-produzierenden Zellen (M) und basalen Epithelzellen (B). Die Barrieren des Epithels gegenüber Gentransfer-Vektoren sind (1) Mucus, (2) Zilienbewegung, (3) Oberflächenfluid, (4) Glykokalyx, (5) apikale Membran und (6) *tight-junctions* (aus: Pickles, 2004).

Bei Epithelien handelt es sich um ein- oder mehrlagige Zellschichten, die Verbindungen zwischen einem Gewebe und einem Lumen (z. B. Lunge) herstellen. Epithelzellen sind polar organisiert: die apikale Seite weist zum Lumen und die basolaterale Seite zu angrenzenden Zellen und dem darunter liegenden Gewebe (Abb. 2). Unterhalb der apikalen Domäne liegen die sogenannten *tight junctions*, die zum einen das Durchdringen von Ionen und Molekülen durch den Zellzwischenraum und zum anderen auch den Austausch der unterschiedlichen integralen Membranproteine zwischen der apikalen und basolateralen Domäne verhindern (Rodriguez-Boulan *et al.*, 1992). Der Viruseintritt in eine Zelle wird von Glykoproteinen, die in der Virushülle verankert sind, vermittelt. Das Vorhandensein geeigneter Rezeptoren in der jeweiligen Membran polarisierter Zellen ist daher von entscheidender Bedeutung (Compans, 1995).

Retrovirale und adenovirale Vektoren sowie adeno-assoziierte Viren (Tab. 1) konnten bisher nur mit geringem Erfolg eingesetzt werden, denn das Respirationsepithel ist aufgrund der oben erwähnten Barrieren oder durch das Fehlen geeigneter Virus-Rezeptoren gegenüber einer apikalen Infektion weitgehend resistent (Pickles, 2004).

Tab.1: Verwendung von viralen Vektoren in der Gentherapie (Lunge).

Viraler Vektor	Literatur	Vor- (+) und Nachteile (-)
Retroviren	Drumm <i>et al.</i> , 1990 Olsen <i>et al.</i> , 1992 Stanley <i>et al.</i> , 1991	<ul style="list-style-type: none"> • Stabiler Gentransfer (+) • Insertionsmutagenese (-) • Niedrige Titer (-) • Transfer nur in sich teilende Zellen (-) (Ausnahme: Lentiviren)
Adenoviren	Rosenfeld <i>et al.</i> , 1992 Zabner <i>et al.</i> , 1993 Crystal <i>et al.</i> , 1994	<ul style="list-style-type: none"> • Gentransfer auch in ruhende Zellen (+) • Hohe Titer erhältlich (+) • Immunogen (-) • Transfer nur transient (-) • Rekombinationsgefahr (-)
Adeno-assoziierte Viren	Flotte <i>et al.</i> , 2003 Moss <i>et al.</i> , 2004 Ostedgaard <i>et al.</i> , 2005	<ul style="list-style-type: none"> • Transfer auch in ruhende Zellen (+) • Hohe Titer erhältlich (+) • Geringe Kapazität (-) • Zufällige Integration ins Genom (-)

Mittels Pseudotypisierung viraler Vektoren konnte eine effizientere Infektion des respiratorischen Epithels hervorgerufen werden (Tab. 2). Es wurden auch bereits virale Vektoren, die auf dem respiratorischen Synzytialvirus (Zhang *et al.*, 2002) oder dem Sendai-Virus (Yonemitsu *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 2004; Griesenbach *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2005) basieren, experimentell eingesetzt. Doch sind v. a. die kurze Persistenz und die Immunantwort gegenüber den Vektoren, insbesondere bei wiederholter Applikation, weiterhin problematisch.

Tab.2: Beispiele viraler Pseudotypen zur Therapie von Atemwegserkrankungen.

Vektor	Glykoprotein	Literatur
Lentivirus (SIV)	SeV-F und -HN	Kobayashi <i>et al.</i> , 2003
Lentivirus (HIV)	JSRV-Env	Liu <i>et al.</i> , 2004
Lentivirus (HIV, FIV)	Ebo-GP	Medina <i>et al.</i> , 2003
Lentivirus (HIV)	Ebo-GP	Kobinger <i>et al.</i> , 2001
Lentivirus (FIV)	MARV-GP, Ebo-GP	Sinn <i>et al.</i> , 2003
Lentivirus (FIV)	Influenza D-GP75, Baculovirus-GP64	Sinn <i>et al.</i> , 2005

Ein paar Studien befassen sich seit einiger Zeit mit der Stammzell-Therapie; so wurde die Differenzierung von Lungenepithelzellen aus Knochenmark-Zellen publiziert (Krause *et al.*, 2001; Wang, 2005). Es wurden auch Versuche unternommen, den Gendefekt durch Reparatur- und *Trans-splicing*-Technologien zu beheben, doch mit geringem Erfolg (De Semir *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

Nicht-virale Ansätze versuchen über Liposomen in Aerosolen das intakte Gen in die Atemwege zu transferieren (Yoshimura, 1992; Caplen *et al.*, 1995). Die Behandlung mit mukolytischen Agenzien oder DNase sowie der Einsatz von z. B. EGTA, Natriumcaprat oder Dispase zur Öffnung der *tight junctions* setzt die oben genannten Barrieren des Atemwegepithels teilweise außer Kraft. Insgesamt sind seit der Klonierung des CFTR-Gens im Jahre 1989 über 20 klinische Studien durchgeführt worden (Doring *et al.*, 2007; Griesenbach *et al.*, 2006).

1.3 VSV als Vektorsystem

1.3.1 Das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV)

Das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) gehört zu der Familie *Rhabdoviridae*, die mit den Familien *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* und *Bornaviridae* in der Ordnung *Mononegavirales* zusammengefasst wird. Die Familie *Rhabdoviridae* umfasst fünf Genera, wobei VSV dem Genus *Vesiculovirus* zugeordnet wird. Das Virus der vesikulären Stomatitis ist ausschließlich auf dem amerikanischen Kontinent zu finden und es existieren zwei Serotypen: *New Jersey* und *Indiana*.

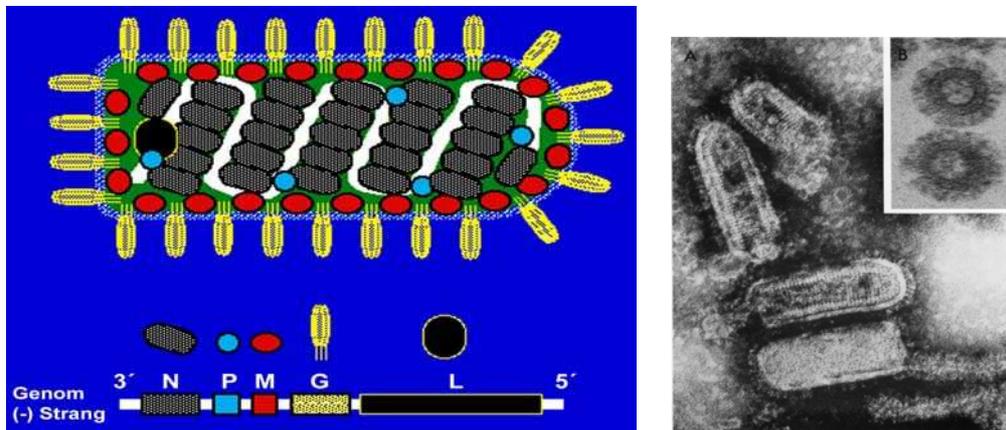


Abb. 3: Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung eines VSV-Partikels (aus: Wagner & Rose, *Fields Virology*, 3rd Edition, Chapter 37, 1996 und Wagner *et al.*, 1969).

VSV besitzt ein breites Wirtsspektrum und infiziert Pferde, Rinder und Schweine. Die Übertragung findet hauptsächlich durch Insekten statt; eine Übertragung von Tier zu Tier oder eine indirekte Übertragung über kontaminierte Gegenstände ist möglich, wenn Verletzungen der Haut vorliegen. Bei Tieren ist die Krankheit mit Symptomen wie Fieber, Bläschen (z. B. am Maul und an den Zitzen) und Lahmheiten begleitet. Die Erkrankung ist der FMD (*foot-and-mouth disease*, Maul- und Klauenseuche) klinisch sehr ähnlich und wie diese anzeigepflichtig.

Die infektiösen VSV-Partikel (180 nm lang, 65 nm Durchmesser) bestehen aus einem helikalen Nukleokapsid und einer Membranhülle, in die das Glykoprotein (G) in trimeren Komplexen eingelagert ist. An der Innenseite der Membran befindet sich das Matrixprotein (M). Das Nukleokapsid besteht aus den Proteinen N (60 kDa), P (40 kDa) und L (190 kDa) sowie der ca. 12 kb langen, einzelsträngigen RNA in Negativorientierung (Abb. 3). Die Gene

sind auf dieser in der Reihenfolge N-P-M-G-L linear angeordnet. Zwischen ihnen befinden sich intergenische Sequenzen. Dem 3'-Ende ist eine 47 Basen lange nichtkodierende *Leader*-Region vorgeschaltet und auf das 5'-Ende folgt ein 70 Basen langer nichtkodierender *Trailer*-Abschnitt (Abb. 4).

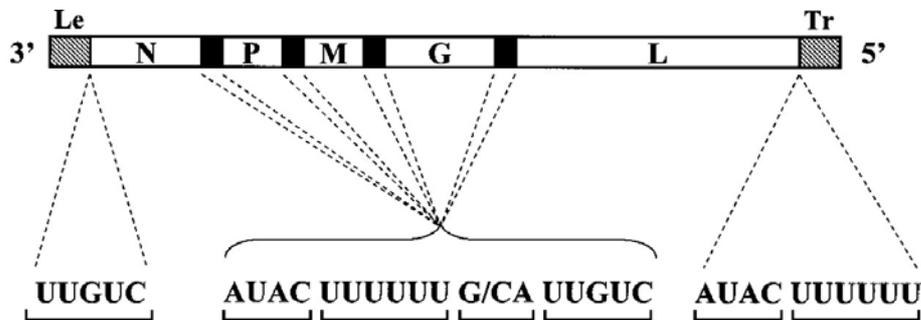


Abb. 4: Genom des VS-Virus. Die kodierenden Regionen für die fünf VSV-Gene sind durch regulatorische Sequenzen (Transkriptionsstop, Polyadenylierungssignal, intergenische Sequenz und Transkriptionsstart) getrennt. Die Transkriptionseinheiten sind durch sog. *Leader* (*Le*)- und *Trailer* (*Tr*)-Regionen flankiert (aus: Neumann *et al.*, 2002).

Der Replikationszyklus (Abb. 5) beginnt mit der Aufnahme des Viruspartikels durch die Wirtszelle. Das Glykoprotein (64-68 kDa, je nach Glykosylierungszustand) vermittelt die Adsorption des Virus an die Zielzelle, u. a. vermutlich über Phosphatidylserin (Carneiro *et al.*, 2006; Coil & Miller, 2004, 2005). Das Virus wird dann mittels Endozytose von der Zelle aufgenommen (Sun *et al.*, 2005). Außerdem ist das G-Protein an der Membranfusion beteiligt, die durch die Ansäuerung der Endosomen nach der Partikel Aufnahme induziert wird.

Nach Freisetzung des Kapsids finden die Replikation und die Transkription im Zytoplasma statt. Dabei bildet das Large-Protein (L) mit dem Nukleoprotein (N) und dem Phosphoprotein (P) die funktionelle Polymerase. Dem Phosphoprotein wird eine Beteiligung an der Transkription des viralen Genoms zugeschrieben, indem es die Wechselwirkung des N-Proteins mit der RNA vermindert und so das Genom für die Polymerase zugänglich macht. Das L-Protein besitzt die Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Zudem ist es vermutlich bei dem RNA-Capping, der Polyadenylierung der primären Transkripte und der Phosphorylierung der P-Proteine beteiligt (Gupta *et al.*, 2002; Barr *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997).

Das Matrixprotein (25-26 kDa) ist mit der Innenseite der Virusmembran assoziiert und stellt eine Verbindung zum Nukleokapsid her (Chong & Rose, 1993). Es ist ein multifunktionelles Protein, da es an der Regulation der Transkription, dem Knospungs-Prozess ("Budding") (Chong & Rose, 1994) und der Interferon-Inhibierung beteiligt ist (Ferran & Lucas-Lenard, 1997). Das M-Protein steht in Zusammenhang mit den zytopathogenen Effekten, die während einer VSV-Infektion bei den infizierten Zellen zu beobachten sind. Die Expression des M-Proteins führt unabhängig von anderen Viruskomponenten zu einer Abrundung der Zellen und einer Desorganisation des Zytoskeletts (Blondel *et al.*, 1990; Melki *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 1994).

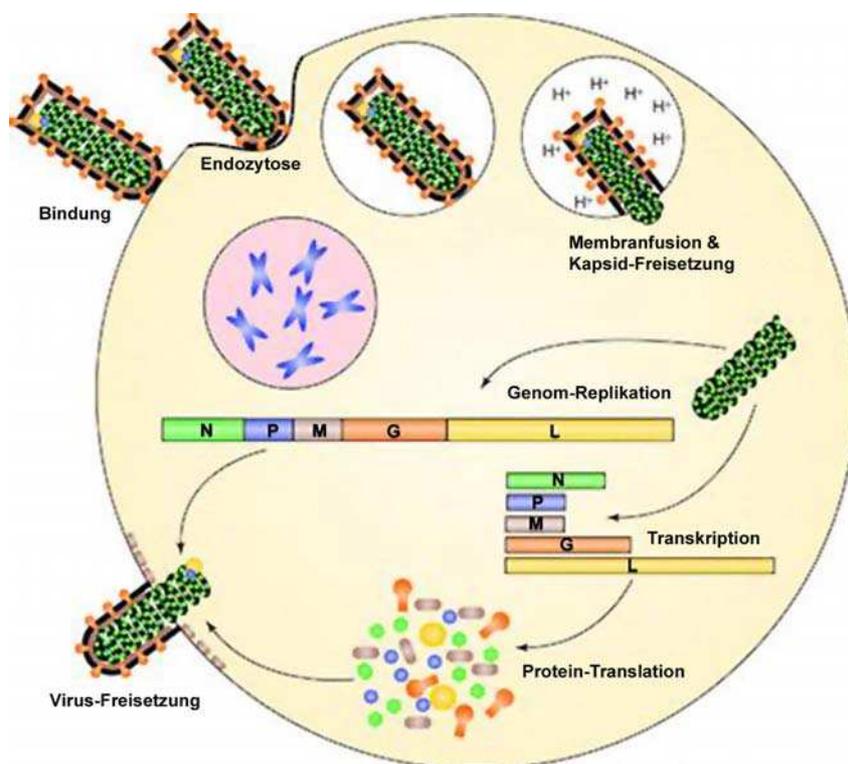


Abb. 5: Infektionszyklus des VSV.

(Quelle:http://www.bioweb.uncc.edu/Faculty/Grdzlishvili/index_files/image002.jpg)

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die zytopathogenen Effekte darauf zurückzuführen sind, dass das M-Protein die zelluläre Transkription hemmt (Black & Lyles, 1992; Ahmed & Lyles, 1998) und den Export von RNAs aus dem Kern verhindert (Her *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2000). Die Hemmung der zellulären RNA-Polymerasen korreliert mit der Apoptoseinduktion durch das VSV-M-Protein (Kopecky *et al.*, 2001; Gaddy & Lyles, 2005). Das M-Protein spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Bildung neuer Viruspartikel, indem es die Kondensation des Nukleokapsids bewirkt. Zudem kodiert das

VSV-M-Gen für zwei weitere Polypeptide (M2 und M3), welche ebenfalls für die Zellabrundung und die zytopathogenen Effekte bedeutsam sind (Jayakar & Whitt, 2002).

In der späten Phase des Replikationszyklus wird das Kapsid zur Plasmamembran transportiert, und neue Viruspartikel werden von der Zellmembran abgeschnürt (Das *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne bzw. die membran-nahe Stielregion des VSV-G-Proteins für den effizienten *Budding*-Prozess benötigt werden (Whitt *et al.*, 1989; Schnell *et al.*, 1998; Robison & Whitt, 2000; Jeetendra *et al.*, 2003). Von dem Virus der vesikulären Stomatitis ist bekannt, dass sowohl der Viruseintritt als auch die Virusfreisetzung hauptsächlich an der basolateralen Membran von polaren Epithelzellen stattfinden (Fuller *et al.*, 1984). Bei Mutation des basolateralen Adressiersignals in der zytoplasmatischen Domäne des VSV-G-Proteins (Thomas *et al.*, 1993) wird das Virus jedoch weiterhin vorwiegend an der basolateralen Membran freigesetzt (Zimmer *et al.*, 2002). Das M-Protein ist unabhängig von anderen Viruskomponenten in der Lage, Membranvesikel von der Zelle abzuschneiden (Justice *et al.*, 1995; Sakaguchi *et al.*, 1999) und es wird in infizierten Zellen unabhängig vom G-Protein zur basolateralen Membran transportiert (Bergmann & Fusco, 1988; Steinmann, 2004). Somit beeinflussen noch andere Faktoren die gerichtete Freisetzung des VS-Virus. Es wird vermutet, dass zelluläre Proteine oder ein Zusammenwirken viraler Faktoren bei der streng basolateralen Freisetzung der Viruspartikel eine Rolle spielen (Probst, 2005; Shahwan, 2006; Harty *et al.*, 2001; Jayakar *et al.*, 2004).

1.3.2 VSV-Mutanten

Das Virus der vesikulären Stomatitis kann auch persistierende Infektionen hervorrufen. An der Etablierung und Aufrechterhaltung dieses Status sind mehrere Mechanismen beteiligt. Zum einen spielen *defective interfering (DI) particles* (Holland & Villarreal, 1974) und temperatur-sensitive VSV-Mutanten (Preble & Youngner, 1975) bei der reduzierten Replikationsrate des Virus eine Rolle. Zum anderen trägt auch die Produktion von Interferon zum Erhalt eines persistenten Zustands bei (Rodriguez & Henle, 1964). Die Genome des infektiösen VSV und der *DI particles* verändern sich fortlaufend während der Virus-Persistenz (Holland *et al.*, 1979; O'Hara *et al.*, 1984). Es können z. B. Mutationen in den Genen für das P-, L- und M-Protein (Stanners *et al.*, 1977; Jordan *et al.*, 1989; Ahmed & Lyles, 1997; Desforgues *et al.*, 2001) nachgewiesen werden, die die Replikation und die Zytopathogenität des Virus sowie die Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes vermindern.

1.3.3 VSV-Pseudotypen

Pseudotypen sind Viren, die ein oder mehrere Hüllproteine eines anderen Virus in der Hülle tragen. Soll nur das fremde Glykoprotein eingebaut werden, so wird in dem Genom des Virus das Gen für das eigene Protein deletiert (z. B. VSV- Δ G) und das Gen für das fremde Protein stattdessen integriert oder *in trans* zur Verfügung gestellt. Durch die Pseudotypisierung eines Virus können dessen Eigenschaften hinsichtlich Zelltropismus, Viruseintritt und Stabilität verändert werden. Es wurden bereits zahlreiche VSV-Pseudotypen konstruiert, die Hüllproteine verschiedenster Viren in ihrer Hülle tragen (Tab. 3).

Tab. 3: Beispiele einiger VSV-Pseudotypen.

Genom	Hüllprotein	Literatur
VSV- Δ G	SARS-CoV-S	Fukushi <i>et al.</i> , 2005
VSV- Δ G/GP	Ebola-GP, MARV-GP, LASV-GP	Garbutt <i>et al.</i> , 2004
VSV-E2	BVDV-E2	Grigera <i>et al.</i> , 2000
VSV-Env	HIV-Env	Johnson <i>et al.</i> , 1997
VSV-Env, VSV- Δ G/Env	HIV-Env	Publicover <i>et al.</i> , 2005
VSV-Env	HIV-Env	Rose <i>et al.</i> , 2000
VSV-RSV-G oder -F	RSV-G oder -F	Kahn <i>et al.</i> , 1999
VSV- Δ G/RSV-G oder -F	RSV-G/-F	Kahn <i>et al.</i> , 2001
VSV- Δ G	Influenza C-HEF	Hanika <i>et al.</i> , 2005
VSV-HA oder -NA	Influenza-HA oder -NA	Kretzschmar <i>et al.</i> , 1997
VSV-HA	Influenza-HA	Roberts <i>et al.</i> , 1998
VSV-E1+E2	HCV-E1/E2	Ezelle <i>et al.</i> , 2002
VSV- Δ G/E1+E2	HCV-E1/E2	Tani <i>et al.</i> , 2007

Einige fremde virale Glykoproteine werden ohne Modifikationen relativ effizient in das Viruspartikel eingebaut (Schnell *et al.*, 1996). Für andere Glykoproteine (z. B. HIV-Env) trifft dies z. B. erst nach Veränderung der zytoplasmatischen Domäne zu.

Die Pseudotypisierung von VSV mit dem Glykoprotein des Influenza-C-Virus (HEF-Protein) führte zu einer erfolgreichen Infektion polarisierter Epithelzellen von der apikalen Seite her (Hanika *et al.*, 2005). Durch die Pseudotypisierung erlangte das Virus Eigenschaften, wie sie für Influenza-C-Viren typisch sind. Wie dieses bedurfte es der proteolytischen Aktivierung

durch Trypsin, darüber hinaus zeigte es eine sialinsäureabhängige Infektion und einen charakteristischen Zelltropismus. Chimäre des HEF-Proteins, die Teile des VSV-G-Proteins enthielten (zytoplasmatische Domäne, Transmembranregion oder Stielregion), wurden nicht effizienter in das Viruspartikel eingebaut und waren darüber hinaus z. T. fusionsdefekt.

1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieses Dissertations-Projektes war die Entwicklung viraler Vektoren für den effizienten Gentransfer in das respiratorische Epithel vor allem hinsichtlich einer möglichen Behandlung von Lungenkrankheiten (z. B. der Cystischen Fibrose).

Durch Pseudotypisierung von VSV mit fremden Glykoproteinen (z. B. AcMNPV-GP64, LCMV-GP oder Ebo-GP) sollte eine apikale Infektion von polarisierten Lungenepithelzellen erreicht werden. Dazu sollte zunächst überprüft werden, wie gut die Proteine exprimiert werden und ob sie für die Pseudotypisierung von VSV geeignet waren. Zur Vermehrung der VSV-Pseudotypen sollten Helferzelllinien etabliert werden.

Des Weiteren war beabsichtigt, VSV als Vektorsystem zu optimieren, denn ein wesentlicher Nachteil von VSV als Vektor für eine Substitutionstherapie ist seine hohe Zytopathogenität. Durch gezielte Mutagenese des M-Gens (Vorbild hierfür war das M-Gen von persistierenden VSV-Formen) konnte bereits ein weniger zytopathogenes rekombinantes VSV (VSV*ncp) hergestellt werden. In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen der Mutationen in Hinsicht auf Replikation, Zytotoxizität und Interferoninduktion untersucht werden. Durch weitere Modifikationen des Genoms (VSV- Δ M oder VSV- Δ M Δ G) sollte die Zytopathogenität und Immunogenität des Vektors noch stärker reduziert werden, um später eine wiederholte Applikation des Vektors bei therapeutischen Anwendungen zu ermöglichen. Um die Vermehrung solcher Deletionsmutanten zu ermöglichen, sollte eine Helferzelllinie hergestellt werden, die das Matrix- und/oder das Glykoprotein induzierbar exprimiert. Schließlich sollte in das VSV-Genom ein größeres Gen (z. B. LacZ) inseriert und die Auswirkungen hinsichtlich Replikation und Interferoninduktion untersucht werden. Dies ist wichtig, da bei einer Therapie der Cystischen Fibrose das therapeutische Gen (CFTR) ebenfalls sehr groß wäre und die Expressionsrate des Transgens für den therapeutischen Erfolg einer Gentherapie bedeutend ist.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

XL1-Blue MRF' (Stratagene)	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F', <i>proAB, lacI, qZ, ΔM15, Tn 10 (Tetr)</i>]
-------------------------------	--

2.2 Eukaryotische Zelllinien

Sofern nicht anders angegeben, stammen alle Zelllinien aus dem Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (TiHo).

BHK-21	<i>Baby hamster kidney cells</i> , fibroblastische Zellen aus der Niere des syrischen Goldhamsters <i>Mesocricetus auratus</i> (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)
BSR-T7	BHK-Zellen, stabil transfiziert mit Gen der T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des CMV-Promotors; Buchholz <i>et al.</i> , 1999 (Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann, Max-von-Pettenkofer-Institut, München)
BHK-G43	BHK-21-Zellen, die das VSV-G-Protein induzierbar exprimieren; Hanika <i>et al.</i> , 2005
MDCK-I/-II	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i> , Hundenierenepithelzellen
CHO-E6	<i>Chinese Hamster ovary cells</i> , Hamsterovarzellen
A549	Humane Alveolarepithelzellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)
HBE	Humane Bronchialepithelzellen; Cozens <i>et al.</i> , 1994
Vero	Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze

2.3 Viren

Die aufgeführten VS-Viren stammen von PD Dr. Gert Zimmer, TiHo Hannover.

VSV*	Zytopathogenes VSV (Stamm <i>Indiana</i>) mit GFP-Kassette
VSV*ncp	Nicht-zytopathogenes VSV mit GFP-Kassette
VSV*-ΔG	Zytopathogenes VSV mit deletiertem VSV-G-Gen und GFP-Kassette

VSV*ncp-ΔG	Nicht-zytopathogenes VSV mit deletiertem VSV-G-Gen und GFP-Kassette
MVA-T7	Modifiziertes Vaccinia Virus Ankara; Sutter <i>et al.</i> , 1995 (TiHo Hannover)
Baculovirus (AcMNPV)	Baculovirus-Überstand von infizierten Zellen (BD Biosciences)

2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech und Invitrogen bezogen.

Bezeichnung	Sequenz
HEF-Cys (<i>XhoI</i>)-s	CCGGCCCTCGAGTCATTTAGTTCTGGAGATGGCGATCCCAGA
HEF (S71C)-s	CTTTGGAGATTGCAGGACTGACAAAAGC
HEF (S71C)-as	TGTCAGTCCTGCAATCTCCAAAGCCAATC
HEF (Furin)-s	GTAACCAAACGTAAGAGGAGAATTTTTGAAT
HEF (Furin)-as	CAAAAATTCTCCTCTTACGTTTGGTTACAGT
HEF (Seq1)	CTACCTTTACCAAGGATGTGG
HEF (Seq2)	GTGATCTATGATTCATTTGG
GFP-s (<i>EcoRI</i>)	TTATGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT
GFP-as (<i>EcoRI</i>)	GGCCGGGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
IRES (<i>SpeI</i>)-s	CCGACCACTAGTCAATTCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTT
IRES (<i>SpeI</i>)-as	CCGACCACTAGTATCGTGTTTTTCAAAGGAAAACCCACGT
VSV-Msyn (<i>BamHI</i>)-s	CCGACCGGATCCATCATGAGCAGCCTGAAGAAGATCC
VSV-Msyn (<i>BamHI</i>)-as	CCGACCGGATCCTCACTTGAAGTGCCGGATGCTGTC
VSV-neo (<i>BstEII</i>)-s	GGCCTTGGTTACCATGATTGAACAAGATGGATTGCACG
VSV-neo (<i>NheI</i>)-as	GGCCTTGCTAGCTCAGAAGAAGTCTCAAGAAGGCG
VSV-neo (<i>BstEII</i>)-as	GGCCGGGTAACCTCAGAAGAAGTCTCAAGAAGGC
VSV-zeo (<i>BstEII</i>)-s	GGCCTTGGTTACCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTT
VSV-zeo (<i>BstEII</i>)-as	GGCCTTGGTAACCTCAGTCTGCTCCTCGGCCACGAAGT
GFP-s (<i>BstEII</i>)	GGCCGGGGTTACCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
GFP-as (<i>BstEII</i>)	GGCCGGGGTAACCTTACCTGTACAGCTCGTCCATGCCG
RUC-GFP (<i>XhoI</i>)-s	GGCCTCTCGAGAAGATGACTTCGAAAGTTTATGAT
RUC-GFP (<i>NheI</i>)-as	GGCCTTGCTAGCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCA
RUC-GFP (<i>MluI</i>)-s	CCTTCCACGCGTCACTATGACTTCGAAAGTTTATGATCCA
pAAV-lacZ (<i>XhoI</i>)-s	AATTAACCTCGAGATGTCGTTTACTTTGACCAACAAG

lacZ (<i>NheI</i>)-as	AATTAAGCTAGCTTATTTTTGACACCAGACCAACTG
lacZ (<i>HindIII-XhoI</i>)-s	AACCTTAAGCTTCTCGAGGTCACCATGTCGTTTACTTTGACCAACAAG
lacZ (<i>XbaI-NheI</i>)-as	AACCTTTCTAGAGCTAGCTTATTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTA
Ac-gp64 (<i>HindIII</i>)-s	TTGGCCAAGCTTAAGATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATG
Ac-gp64 (<i>EcoRI</i>)-as	TTGGCCGAATTCTTAATATTGTCTATTACGGTTTCTAATCAT
Ac-gp64 (<i>EcoRI</i>)-s	TTGGCCGAATTCAAGATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATG
Ac-gp64-stop(<i>EcoRI</i>)-as	TTGGCCGAATTCCTATATTGTCTATTACGGTTTCTAATCAT
LCMV-GP-as	GCTGGTCGCTGATGAGGCTG
Ebo-GP-s (<i>EcoRI</i>)	AAGGCCGAATTCGCCACAATGGGCGTTACAGGAATATTGCAG
Ebo-GP-as (<i>XhoI</i>)	AAGGCCCTCGAGCTAAAAGACAAATTTGCATATACA
Ebo-GP-s (<i>BamHI</i>)	AAGGCCGGATCCGCCACAATGGGCGTTACAGGAATATTGCAG
Ebo-GP-as (<i>BamHI</i>)	AAGGCCGGATCCCTAAAAGACAAATTTGCATATACA
Ebo-GP-delta-as	GACTCCAGCAATAGTATTTCTAGTGAGGTTTTTTTTAGTTTCCAGAA
Ebo-GP-delta-s	AAAAAAAACCTCACTAGAGCAGGACTGATCACAGGCGGGAGAGAAGAACT
Seq EboV-1	CAAGCTAAGAAGGACTTCTTC
pCAGGS-s	GTGCTGGTTGTTGTGCTGTC
pCAGGS-as	CCAGCCACCACCTTCTGATA
TA2	AATATAATTGAGGCCTCTTTGAGC
TA3	AGTCTAACTTCTAGCTTCTG
TA4	AGTCTTCAGCCTCTCACCATATCC
Flag (<i>SalI</i>)-as	GGTTAAGTCGACCTATTTATCGTCATCATCTTTGTA
<i>MluI</i> -s	CCGGCCACGCGTCACTATGCAGAAGTCGCCTTTGGA
<i>BssSI</i> -s	CCTAGGGAAGATGATGGTGAAGTAC
<i>BssSI</i> -as	CCATCGCTGATTCCCAACAATATGCC
Seq1b-s	GACCACAGGCATAATCATGG
<i>Clal</i> -s	ACTCTATTCTAAATTCATTCAGCTC
<i>Clal</i> -as	TTCAGAATCCGGAAGTACAGGACAGTCTC
Seq2a-s	CTCCTTAGTCCCTCAGA
<i>BspHI</i> -s	CTTCATTGTTGTTACCTTCATCTCC
<i>BspHI</i> -as	CTCTGCTCACAGATCGCATCAAGC
<i>XhoI</i> -as	CCGGCCCTCGAGCTAGAGACGGGTTTCTTGAAGTTC
T7-s	TAATACGACTCACTATAGGG
M13-rev	AGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
BGH-Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGGCTG

pTM1-s	CCTCGGTGCACATGCTTTAC
pTM1-as	CTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC
pGeneA-S	CTGCTATTCTGCTCAACCT
pEGFP-N1 fwd	GTCGTAACAACCTCCGCC
pEGFP-N1 rev	GTCCAGCTCGACCAGGATG
pEGFP-C1 fwd	GATCACTCTCGGCATGGAC
pEGFP-C1 rev	CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGG

2.5 Plasmide

pCR2.1-TOPO	Linearisierter Klonierungsvektor mit 3'-T-Überhängen (Invitrogen)
pCDNA3.1/zeo (+)	Expressionsvektor mit CMV-Promotor und Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons; Zeocin-Resistenzgen (Invitrogen)
pEGFP-C1	Plasmid für die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins in eukaryotischen Zellen (Clontech)
pIRES-hrGFP II	Expressionsvektor mit IRES-Sequenz und GFP-Kassette sowie einem flag-Tag; Geneticin-Resistenzgen (Stratagene)
pAAV-LacZ	Expressionsplasmid des AAV (Adeno-assoziiertes Virus)-Systems mit LacZ-Gen (Stratagene)
pGeneC, pSwitch	Expressionsvektoren, die zum GeneSwitch-System gehören; mit HygromycinB- und Zeocin-Resistenzgen (Invitrogen)
pCDNA3.1-HEF	pCDNA3.1-Vektor mit Gen des Influenza-C-Glykoproteins (HEF) (PD Dr. Gert Zimmer, Hannover)
pCDNA3.1-HEF (S71A)	pCDNA3.1-Vektor mit HEF-Mutante S71A (PD Dr. Gert Zimmer, Hannover)
pGA4-GP64syn	Plasmid pGA4 mit Gen des AcMNPV-Glykoproteins (GP64), codonoptimiert (GENEART GmbH)
pCR-LCMV-GP	Plasmid pCR-Script (Stratagene) mit Gen des LCMV-Glykoproteins; codonoptimiert (Prof. Dr. Dorothee von Laer, Frankfurt)
pCAGGS-Ebo-GP	Expressionsvektor mit Gen des Ebola-Glykoproteins (PD Dr. Elke Mühlberger, Marburg)
pCAGGS-Ebo-GP Δ	pCAGGS-Vektor mit Ebo-GP-Deletionsmutante (Natascha Kruse)
pVSV-XN2	Blueskript-Vektor mit VSV-Antigenom (Dr. John Rose, Yale)
pBS-N, -P, -L	Blueskript-Vektor mit N-, P- und L-Gen (Dr. John Rose, Yale)
pTM1-N, -P, -L	pTM1-Vektor mit N-, P- und L-Gen (PD Dr. Gert Zimmer, Hannover)
pTM1-M	pTM1-Vektor mit Gen für M-Protein (PD Dr. Gert Zimmer, Hannover)

pGeneC-M-IRES-G	pGeneC mit VSV-Msyn- und VSV-G-Gen (Dipl. Biol. Inga Probst, Hannover)
pCDNA3.1-VSV-G	pCR3.1-Vektor mit Gen des VSV-Glykoproteins (PD Dr. Gert Zimmer, Hannover)
pPCR-Script-Msyn	pPCR-Script-Vektor mit VSV-Msyn; codonoptimiert (GENEART GmbH)
pCDNA-RUC-GFP	Plasmid mit <i>Renilla</i> -Luziferase und GFP (Dr. Aladar Szalay, Würzburg)
p125-Luc	Reporterplasmid mit IFN- β -Promotor und Luziferase-Gen (Prof. Ph. D. Takashi Fujita, Japan)
pHM-LacZ6 control	Expressionsplasmid mit Gen der β -Galaktosidase (Roche Diagnostic)
pSEAP2-Control	Kontrollplasmid, welches das Gen der SEAP (secreted alkaline phosphatase) exprimiert (Clontech)
pCR2.1-mCFTR1ab/-2ab	pCR2.1-Vektor mit partieller cDNA des mCFTR-Gens (Dr. Brigitte Voges, Hannover)

2.6 Standards

2.6.1 DNA-Größenstandards

Lambda DNA/ <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III Marker, 3	MBI-Fermentas
---	---------------

2.6.2 Protein-Größenstandards

PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI-Fermentas
-------------------------------------	---------------

2.7 Enzyme

Restriktionsendonukleasen und Puffer	New England BioLabs Inc., MBI Fermentas
Alkalische Phosphatase CIAP (1 U/ μ l) und Puffer	MBI Fermentas
T4 DNA Ligase (5 U/ μ l) und Puffer	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μ l) und Puffer	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l) und Puffer	MBI Fermentas

dNTP, DEPC-Wasser, MgCl ₂ (25 mM), 100 x BSA	MBI Fermentas
---	---------------

2.8 Antikörper

Neben den Antikörpern sind auch die entsprechend eingesetzten Verdünnungen aufgeführt.

Kaninchen-Anti-VSV; polyklonal (Institut für Virologie, TiHo)	1:1000
Ratte-Anti-VSV-M; gegen den N-Terminus von VSV-M gerichtet (Institut für Virologie, TiHo)	1:100, 1:200
Maus-Anti-VSV-G ; monoklonal (Volker ter Meulen, Würzburg)	1:25, 1:50
Kaninchen-Anti-Influenza-C (Institut für Virologie, TiHo)	1:1000
Maus-Anti-GP64 (AcV5); monoklonal (Sigma-Aldrich)	1:50
Maus-Anti-GP64 (AcV1); monoklonal (eBioscience)	1:100
Maus-Anti-flag M2; monoklonal (Sigma)	1:1000
Maus-Anti-LCMV-GP; monoklonal (Prof. Dr. Dorothee von Laer, Frankfurt)	1:100
Ziege-Anti-Ebola-GP; monoklonal (Prof. Dr. Viktor Volchkov, University Claude Bernard Lyon, France)	1:200
Anti-Kaninchen-IgG-FITC (Sigma)	1:500
Anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (Sigma)	1:500
Anti-Kaninchen Biotin-Konjugat (Sigma)	1:2000
Anti-Maus-IgG-FITC (Sigma)	1:500
Anti-Maus-IgG-Cy3 (Sigma)	1:500
Anti-Maus-IgG-Rhodamin Red-X (Molecular Probes)	1:1000
Anti-Ratte-IgG-TRITC (Sigma)	1:200
Anti-Ziege-IgG-FITC (Sigma)	1:500
Streptavidin-Peroxidase für SDS-Gel (GE Healthcare UK)	1:1000, 1:2000
Anti-Maus-IgG/Peroxidase (DakoCytomation)	1:1000
Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (DynaL Biotech)	siehe Herstellerangaben

2.9 Substrate

Luciferin (Luciferase Assay System)	Promega
DeepBlueC (Bret2-Kit)	Perkin Elmer

Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce
BM Chemoluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche

2.10 Reagenzsysteme, Transfektionsreagenzien

QIAfilter Plasmid Purification Kit (Mini, Midi, Maxi, Maxi ^{endofree})	Qiagen
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick RCR Purification Kit	Qiagen
Dneasy Tissue Kit	Qiagen
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Reporter Lysis-Puffer	Promega
In situ β -Galactosidase Staining Kit	Stratagene
Beta-Glo Assay System	Promega
BM Chemiluminescence ELISA Substrate (AP)	Roche
Bret2-Kit	Perkin Elmer
CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega

2.11 Chemikalien

Acrylamidlösung 30 %	Roth
Acetyliertes Trypsin	Sigma
Agar	Roth
Agarose	Biozym
Aminocaprinsäure	Sigma
Ampicilin	Roth
APS (Ammoniumpersulfat)	BIO-RAD
Bakto-Trypton	Roth
Blocking-Reagenz	Roche
Borsäure	Roth

Bromphenolblau	Merck
BSA (Bovines Serumalbumin)	Roth
Calciumchlorid	Roth
Complete, Proteaseinhibitorcocktail	Roche
DABCO (1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-octane)	Sigma
DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid)	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) - Fertigpulver	GIBCO BRL
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltes Wasser	MBI Fermentas
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Doxycyclin	Sigma
DTT (1,4-Dithiotreitol)	Roth
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth
EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)-Fertigpulver	GIBCO BRL
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid-Lösung (1 %)	Sigma
FKS (Fetales Kälberserum)	Biochrom
Geneticindisulfat (G-418) 50 mg/ml	Calbiochem, PAA Laboratories
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Ham's F12 mit Glutamax Fertigpulver	Biochrom
Hefeextrakt	Roth
Hygromycin 50 mg/ml	Roche
Kaliumacetat	J. T. Baker
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kanamycin	Roth
Kristallviolett	Merck
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
Manganchlorid	Merck

Methanol	Roth
Mifepreston	Invitrogen
MOPS (3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Roth
Mowiol	Calbiochem
Natriumhydroxid	J. T. Baker
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
NaDesoxycholat	Roth
Nicht essentielle Aminosäuren 100 x	Biochrom AG, PAA Laboratories
NON IDET P40	Roche
Paraformaldehyd	Fluka
Penicillin	GIBCO BRL
Protein-A-Sepharose (Immobilisiert)	Sigma
Rubidiumchlorid	Merck
Saccharose	Roth
Seaplaque-Agarose	Biozym
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
Streptomycin	GIBCO BRL
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce
Streptavidin-Agarose (Immobilisiert)	Pierce
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin)	Roth
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Triton-X-100	Roth
Trypsin	Roth
Tween-20	Roth
Versen	Roth
Zeocin 30 mg/ml	Invitrogen

2.12 Medien, Puffer, Lösungen

2.12.1 Medien und Puffer für die Bakterienkultur

LB (Luria Bertani)-Medium	Bakto-Typton	10 g
	Natriumchlorid	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	Reinstwasser	ad 1 l

LB-Festagar: Es wurden 20 g Agar/l Medium zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium bei Raumtemperatur gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung wurde ein Antibiotikum zur Selektion zugesetzt (Endkonzentration Ampicillin: 50 µg/ml und Kanamycin: 30 µg/ml).

TFB (Transforming Buffer) I	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	Kaliumacetat	30 mM
	Rubidiumchlorid	100 mM
	Manganchlorid	50 mM

TFB II	MOPS	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	Rubidiumchlorid	10 mM

2.12.2 Medien und Puffer für die Zellkultur

DMEM, pH 6.9	DMEM-Pulvermedium	13,53 g
	NaHCO ₃	2,20 g
	Aqua bidest.	ad 1 l

EMEM, pH 7.0	EMEM-Fertigpulver	9,60 g
	NaHCO ₃	2,20 g
	Aqua bidest.	ad 1 l

Ham's	Ham's F12 mit Glutamax Fertigpulver	
-------	-------------------------------------	--

Den Medien wurden jeweils Antibiotika zugesetzt, je Liter: Penicillin: 0,06 g, Streptomycin: 0,05 g.

FKS	FKS wurde 60 min bei 56 °C inkubiert.	
Versen-Trypsin 0,125 %, pH 7.0	NaCl	8,00 g
	KCl	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	2,31 g
	KH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O	0,20 g
	CaCl ₂	0,13 g
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,10 g
	Trypsin	1,25 g
	Versen (Titriplex III)(EDTA)	1,25 g
	Streptomycin	0,05 g
	Penicillin	0,06 g
	Aqua bidest.	ad 1 l

1 x PBS , pH 7.5 (phosphat buffered saline)	NaCl	8,00 g
	KCl	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,20 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,10 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,13 g
	Aqua bidest.	ad 1 l

1 x PBSM	1 x PBS ohne MgCl ₂ und CaCl ₂
----------	--

DAPI-Färbelösung	DAPI in Ethanol gelöst, Endkonzentration: 1µg/ml.
------------------	---

Mifepriston (Stammlösung: 1 mM)	Die Stammlösung wurde in 100% Ethanol verdünnt, so dass die Konzentration 10 µM war. Dies wurde später zur Induktion der Zellen 1:1000 eingesetzt.
------------------------------------	--

Paraformaldehyd	Paraformaldehyd in PBSM bei 80°C gelöst; Endkonzentration: 3 %, Aliquots bei -20 °C gelagert.
-----------------	---

Glycin (0,1 M)	Glycin	0,75 g
	PBSM	ad 100 ml

Triton-X-100	Triton-X-100 in PBSM gelöst, Endkonzentration: 0,2 %.	
--------------	---	--

BSA	BSA in PBS gelöst, Endkonzentration: 1 %.	
-----	---	--

Mowiol	Mowiol	2,50 g
	Glycerol	6,00 g
	Reinstwasser	6,00 ml

Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 12 ml 0,2 M TRIS/HCl pH 8.5 hinzugefügt, bei ca. 50°C 10 Minuten gerührt und dann 15 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde DABCO gegeben, so dass die Endkonzentration 2,5% betrug. Von dieser Lösung wurden Aliquots bei -20°C eingefroren.

Acetyliertes Trypsin	1mg/ml in Kulturmedium, sterilfiltriert, bei -20°C gelagert. Für den Gebrauch wurde diese Lösung 1:200 verdünnt.	
----------------------	--	--

2.12.3 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten mit DNA

TE (Tris-EDTA)-Puffer	TRIS/HCl, pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

10 x TBE (Tris-Borat-EDTA)	TRIS	108,00 g
	Borsäure	53,40 g
	EDTA	7,40 g
	Reinstwasser	ad 1 l

10 x TAE-Puffer	TRIS	40 mM
	Natriumacetat	20 mM
	EDTA	2 mM
	Reinstwasser	ad 1 l

DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau	0,25 %
	Saccharose in H ₂ O	40 % (w/v)

Ethidiumbromid	Ethidiumbromid	1g
	Reinstwasser	ad 100 ml
Die Ethidiumbromid-Stammlösung wurde mit 1xTAE-Puffer verdünnt (Endkonzentration: 0,5 µg/ml).		

2.12.4 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten mit Proteinen

NP40-Lysispuffer (100 ml)	NaDesoxycholat	0,5 %
	TRIS	50 mM
	NaCl	150 mM
	NON IDET P40	1 %
In 50 ml NP 40-Lysis-Puffer wurde 1 Tablette Inhibitoren: Leupeptin, Pepstatin, PEFA Block 1:1000 gegeben.		

SDS-Probenpuffer 2 x	0,5 M TRIS/HCl pH 6.8	10 ml
	10 % SDS	20 ml
	Glycerin	10 ml
	H ₂ O	9 ml
	2 % Bromphenolblau	1 ml

DTT-Lösung (1 M)	DTT	3,09 g
	H ₂ O	20 ml

SDS-Laufpuffer 10 x	SDS	10 g
	TRIS	30 g
	Glycin	144 g
	H ₂ O	ad 1 l

Sammelgel (5 ml Ansatz)	H ₂ O	3,40 ml
	TRIS/HCl (1 M) pH 6.8	0,63 ml
	Acrylamidlösung 30 %	0,83 ml
	SDS 10 % (in H ₂ O)	50 µl
	APS 10 % (in H ₂ O)	50 µl
	TEMED	10 µl

Trenngel 10 % (10 ml Ansatz)	H ₂ O	4,00 ml
	TRIS/HCl (1,5 M), pH 8.8	2,50 ml
	Acrylamidlösung 30 %	3,30 ml
	SDS 10 % (in H ₂ O)	100 µl
	APS 10 % (in H ₂ O)	100 µl
	TEMED	16 µl

Anoden-Puffer I, pH 9.0	1 M TRIS	300 ml
	Methanol/Ethanol	200 ml
	H ₂ O	500 ml

Anoden-Puffer II, pH 7.4	1 M TRIS	25 ml
	Methanol/Ethanol	200 ml
	H ₂ O	770 ml

Kathodenpuffer, pH 9.0	1 M TRIS	25 ml
	Aminocapronsäure	5,25 g
	Methanol/Ethanol	200 ml
	H ₂ O	770 ml

Blocking-Reagenz	Pulver	0,50 g
	PBSM	100 ml

Protein-A-Sepharose (50 %)	Die Sepharose wurde in Wasser suspendiert und über Nacht quellen gelassen. Dann wurde diese dreimal mit Wasser gewaschen und bei 4 °C gelagert.	
----------------------------	---	--

2.13 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Nunc
96-Loch-Platten	Costar, Nunc
6-, 24-Napf-Platten, Zellkulturschalen (60 mm, 10 cm)	Greiner

Transwell-Membran-Einsätze (1,0 µm)	Greiner
Sterilfilter	Schleicher & Schuell
Filterpapier, Nitrocellulose	Schleicher & Schuell

2.14 Technische Ausstattung

Analysenwaagen TYP 1712 MP 8, Lauda 100	Sartorius
Aspirette	Hirschmann
Autoklav Typ A5	Webeco
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech
Blot-Transferkammer	Keutz
Brutschrank B16	Heraeus
CO ₂ -Inkubator	Heraeus
ChemiDoc EQ	Bio-Rad
Elektrophoresesystem	Keutz
Platten-Lesegerät GENios Pro	Tecan
Durchflusszytometer Coulter EpicsXL	Beckman Coulter
Flockeneisbereiter	Jürgens
Kühl- und Gefriergeräte	Liebherr
Mikroskope	
- Lichtmikroskope	Zeiss, Leica
- Fluoreszenzmikroskop Axiophot 2	Zeiss
Mikrowellengerät MWS 2820	Bauknecht
pH-Meter	Jürgens
Pipetten Research Family	Eppendorf
Pipettierhilfe	Brand
Proteingelkammer	Amersham Pharmacia, Biometra
Rührer	IKA Labortechnik
Schüttelinkubator Typ 3033	GFL
Schwenktisch	Keutz
Spannungsquelle Power Pac 200	BioRad
Sterilbank NUAIRE Klasse 2	Nuaire

Thermomixer compact	Eppendorf
Thermoblock	Liebisch
Thermocycler Primus 25/96	MWG Biotech
Tiefkühlschrank -86C ULT Freezer	Thermo Forma
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph
UV-Transilluminator	UVP
Schüttelgerät („Vortex“)	Heidolph
Vakuumpumpe Speed Vac Savant	Savant Instruments
Wasseraufbereitungssysteme (Umkehrosmose, Fistream Cyclon)	SG, Sanyo
Wasserbad	GFL
Widerstand-Messgerät Millicell-ERS	Millipore
Zentrifugen	
- Tischzentrifugen (5417R, 5417C)	Eppendorf
- Megafuge 1,0R	Heraeus
- Optima LE-80K Ultracentrifuge	Beckman Coulter

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit dem „QIAfilter Plasmid Purification Kit“ oder dem „Pure Yield Plasmid Midiprep System“ durchgeführt. Hierbei erfolgte nach alkalischer Lyse der Bakterien eine Aufreinigung der DNA über Anionen-Austausch-Säulen.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente dazu, eine bestimmte DNA-Sequenz zu vervielfältigen. Dazu wurden zwei Primer benötigt, welche flankierend an den *Sense*- bzw. *Antisense*-Strang der DNA banden. Als Polymerasen wurde die *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* oder die *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (mit Korrekturlese-Funktion) verwendet. Der *Pfu*-PCR-Ansatz sah folgendermaßen aus:

Wasser	ad 50 µL
10 x Pfu-Puffer+MgSO ₄	5 µL
10 mM dNTP	1 µL
DNA (50-100 ng)	x µL
Sense-Primer (10 µM)	2 µL
Antisense-Primer (10 µM)	2 µL
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	1 µL*

* Die Polymerase wurde erst dazugegeben, nachdem der restliche Ansatz ca. 30 s bei 75 °C erhitzt wurde ("hot start"). Die Ansätze wurden jeweils auf Eis zusammenpipettiert.

Temperatur [°C]	dT [°C]	Zeit	Zyklen
Heizdeckel: 110			
75		„hot start“	
95		2:00 min	
95		0:30 min	10
56*1	- 0,2/Zyklus	0:30 min	

72		x min*2	
95		0:30 min	8
54		0:30 min	
72		x min*2 + 10 s	
72		7:00 min	
Heizdeckel aus			
4		∞	

*1Die *Annealing*-Temperatur korreliert mit der Schmelztemperatur der verwendeten Primer;
 $T_m = 69,3 \text{ }^\circ\text{C} + 0,41 \times (\%G+C) \text{ }^\circ\text{C}$ bei pH 7,0, 165 mM NaCl.

*2 Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA- Abschnittes. Für die *Pfu*-Polymerase wurde mit 500 nt/min gerechnet.

3.1.3 PCR-Mutagenese

Punktmutationen wurden mit Hilfe von Primern in die DNA eingefügt, wobei diese die Mutation in ihrer Sequenz enthielten und von Nukleotiden flankiert waren, die an die DNA binden konnten. Zwei Fragmente wurden unter den Bedingungen der *Pfu*-PCR amplifiziert (s. 3.1.2) und anschließend miteinander hybridisiert. Die äußeren Primer dienten dann zur Vervielfältigung des gesamten Konstruktes (Abb. 6).

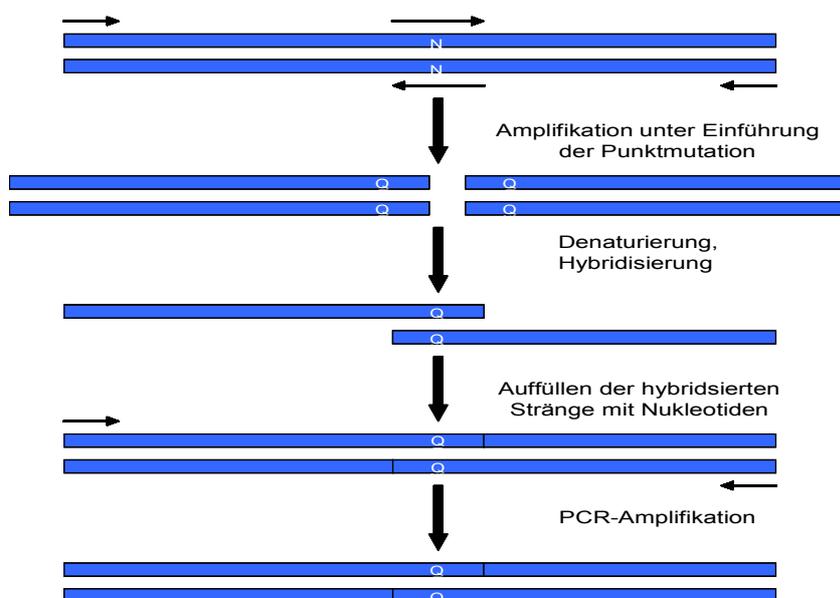


Abb. 6: Schematische Darstellung einer PCR-Mutagenese. Die DNA-Abschnitte sind in Form von Balken und die Primer als Pfeile dargestellt.

Standard-Reaktionsansatz und -Reaktionsablauf der Hybridisierung:

Wasser	ad 46 μL
10 x <i>Pfu</i> -Polymerase-Puffer + MgSO_4	5 μL
10 mM dNTP	1 μL
Matrize 1* (ca. 100 ng)	x μL
Matrize 2*	x μL
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/ μl)	1 μL

*Die Matrizen wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt.

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Heizdeckel 110		
95	1 min	
95	1 min	2
60	1 min	
72	2 min/kb	
72	7 min	

Nach der Hybridisierung wurden die Primer zugefügt und das Standard-*Pfu*-Polymerase-Programm durchgeführt (s. 3.1.2).

3.1.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA kann mit Hilfe von Restriktionsenzymen an definierten Sequenzmotiven gespalten werden. Die Aktivität der Enzyme wird in Units angegeben (1 U = 1 μg DNA/h). Für die Spaltung von Vektor-DNA wurden 3-5 μg DNA mit 10 U Enzym für 1 h bei optimaler Temperatur (meist 37 °C) inkubiert.

3.1.5 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA lässt sich in einem Agarose-Gel, welches einem elektrischen Feld ausgesetzt ist, der Größe nach auftrennen (Sambrook & Russell, 2001). Es wurden 1 – 2 % (v/w) Agarose in TBE- bzw. TAE-Puffer (für analytische bzw. präparative Gele) aufgekocht und dann in die Gelkammern gegossen. Die DNA konnte nach der Auftrennung bei 100 V bzw. 80 V und Inkubation des Gels im Ethidiumbad bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht werden. Durch den Einsatz von Größenstandards konnten die Fragmentgrößen bestimmt werden. Bei einem präparativen Gel wurden nach elektrophoretischer Auftrennung die

Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ aus dem Gel eluiert.

3.1.6 Dephosphorylierung

Eine Dephosphorylierung (Entfernung der terminalen 5'-Phosphatgruppen) von gespaltener Vektor-DNA wurde durchgeführt, um bei der nachfolgende Ligation die möglichen Religationsereignisse des geschnittenen Vektors zu minimieren. Direkt nach der Isolierung aus dem Gel wurde die DNA (50 μ l, ca. 5 μ g) mit 2 μ l der alkalischen Phosphatase CIAP sowie 6 μ l des entsprechenden Puffers für 30-60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ gereinigt.

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Um eine Ligation von zwei DNA-Fragmenten durchführen zu können, müssen diese kompatible Enden besitzen. Zudem sollte in einem Ligationsansatz zwischen Plasmid und Insert ein molares Verhältnis von ca. 1:5 vorliegen. Die Ligation erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase und dem geeigneten Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 – 20 μ l für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14 °C.

3.1.8 Herstellung chemokompetenter XL1-Blue-Bakterien

Mit einer Kolonie *E. coli* XL1-Blue wurden 10 ml LB-Medium (Tet^R) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 250 ml frisches LB-Medium wurden mit 5 ml dieser Vorkultur angeimpft und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 15 min auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation (15 min bei 4000 rpm, 4 °C) wurden die Pellets zunächst in 75 ml TFB I-Puffer und nach erneutem Zentrifugieren in 10 ml TFB II-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden in 100 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

3.1.9 Transformation

Beim Hitzeschock (nach Sambrook & Russell, 2001) wurde der Transformationsansatz (DNA + kompetente Zellen) nach 30-minütiger Inkubation auf Eis kurzzeitig (30 – 40 sec) auf 42 °C erhitzt, so dass die Salz-DNA-Komplexe in die Zellen aufgenommen werden konnten. Danach erfolgte eine Zugabe von 250 µl LB-Medium und eine Inkubation im Schüttler bei 37 °C für 1 h. Schließlich wurde der Ansatz auf antibiotikahaltigem LB-Agar ausplattiert.

3.1.10 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente dazu, positive Bakterienklone, die das gewünschte rekombinante Plasmid enthielten, zu identifizieren. Die Primer wurden dabei meist so gewählt, dass ein Primer im Insert und einer im Vektor band. Ein Ansatz für 12 Reaktionen sah folgendermaßen aus:

Wasser	132 µl
10 x <i>Taq</i> -Puffer	18 µl
25 mM MgCl ₂	14,4 µl
10 mM dNTP	3,6 µl
<i>Sense</i> -Primer (10 µM)	5,4 µl
<i>Antisense</i> -Primer (10 µM)	5,4 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	1,2 µl

Je 15 µL dieses Ansatzes wurden in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Des Weiteren wurden in Reaktionsgefäße jeweils 250 µL LB-Medium mit Selektionsantibiotikum vorgelegt. Dann wurden die Kolonien von der Agarplatte gepickt und in den entsprechenden PCR-Ansätzen suspendiert. Mit der gleichen Spitze wurden die LB-Kulturen angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Als Positivkontrolle für die PCR dienen Aliquots (ca. 3 µl) der Ligationsansätze.

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Heizdeckel: 110		
95	2:00 min	
95	0:30 min	20
55	0:30 min	

72	x min*	
72	5:00 min	
Heizdeckel aus		
4	∞	

* Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes. Für die *Taq*-Polymerase wurde mit 2000 nt/min gerechnet.

Nach der PCR wurden die Proben mittels einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese untersucht (siehe 3.1.5). Von positiven Klonen wurden LB-Übernachtskulturen angesetzt.

3.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, wurde die Absorption der Probe bei 260 nm mit dem Gene Quant RNA/DNA Calculator gemessen und nach folgender Formel berechnet: $OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{DNA-Menge in } \mu\text{g/mL}$.

3.1.12 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der MWG-Biotech AG (Martinsried) durchgeführt. Dazu wurden ca. 1 - 2 μg DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

3.2 Zytologische Methoden

3.2.1 Zellpassagen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in T₇₅-Kulturflaschen mit 20 ml des entsprechenden Mediums bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert (Tab. 4). Im Abstand von ca. 3 Tagen wurden die Zellen passagiert: Zunächst wurden die Zellen mit 1x PBSM gewaschen, dann mit Trypsin/EDTA abgelöst und schließlich im Medium resuspendiert. Danach wurde ein Teil dieser Suspension in eine neue Kulturflasche mit Medium gegeben. Die restlichen Zellen konnten für anstehende Experimente ausgesät werden, nachdem mit der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt worden war.

Tab. 4: Verwendete Zellkulturen.

Zelllinie	Medium
BHK-21	EMEM, 10 % FKS
BSR-T7	EMEM, 10 % FKS
BHK-G43	EMEM, 10 % FKS +Hygromycin, Zeocin
MDCK-I	EMEM, 10 % FKS
MDCK-II	EMEM, 10 % FKS
CHO-E6	DMEM + Ham's, 10 % FKS
HBE	DMEM + Ham's, 10 % FKS
A549	Ham's, 10 % FKS
Vero	DMEM, 10 % FKS

3.2.2 Zellen einfrieren und auftauen

Um Zellen einzufrieren, wurden diese mit Trypsin/EDTA abgelöst und sedimentiert (1000 rpm, 10 min, 4 °C). Dann wurden diese in DMSO-haltigem Zellkulturmedium (10 % DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden in Aliquots bei -80 °C gelagert. Für weitere Verwendungen wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut, sedimentiert (um toxisch wirkendes DMSO zu entfernen) und in frischem Medium aufgenommen.

3.2.3 Ausschluss von Mykoplasmenkontaminationen

Alle laufenden Zellkulturen sind regelmäßig auf Mykoplasmenkontaminationen überprüft worden. Die Zellen wurden dazu einen Tag vorher auf Deckgläschen in einer 24-Kavitätenplatte subkonfluent ausgesät. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit je 200 µl DAPI-Lösung für 15 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen, mit Mowiol eingedeckelt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die DAPI-Lösung ist ein Fluorochrom, das an DNA bindet. Wenn hellblau leuchtende Punkte auf der Zellmembran sichtbar waren, wies dies auf eine Kontamination mit Mykoplasmen hin. Alle 2 Monate wurde zusätzlich im Labor ein Mykoplasmen-ELISA nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.4 Kultivierung von Zellen auf Filtersystemen

Um die Infektion von polarisierten Epithelzellen durch VSV-Pseudotypen zu untersuchen, wurden MDCK-II-Zellen auf sog. Transwell-Membraneinsätzen ausgesät (ca. 3×10^5 Zellen/ml), so dass sie darauf zu einer polaren Zellschicht wachsen konnten. Durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes wurde die Polarität der Zellen über drei Tage hinweg überprüft. Nach vollständiger Ausbildung der Zellschicht wurde die Virussuspension apikal oder basal appliziert. Die Filter wurden später aus dem Einsatz mit einem Skalpell herausgeschnitten und mit Mowiol eingedeckelt.

3.2.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so ausgesät (ca. 2×10^5 Zellen/ml), dass sie später 90-95 % konfluent waren. Hierbei wurde antibiotikafreies Medium verwendet. Die Transfektion mit Lipofectamine 2000 erfolgte nach Angaben des Herstellers: Die DNA und das Lipofectamine wurden getrennt voneinander in Medium aufgenommen und anschließend zusammen bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Dann wurde der Transfektionsansatz zu den ausgesäten Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel wurde nach einigen Stunden oder erst am nächsten Tag durchgeführt. Die Proteinexpression wurde 12-48 h später nachgewiesen.

3.2.6 SEAP-Nachweis

Um die Transfektionseffizienz von Zellen zu bestimmen, wurde das Plasmid pSEAP2 kotransfiziert. Am nächsten Tag wurde dann ein Aliquot des Zellüberstandes (50 μ l) mit dem „BM Chemiluminescence ELISA Substrate (AP)“ auf SEAP (*secreted alkaline phosphatase*)-Aktivität hin untersucht. Die Probe wurde 1:4 mit Puffer verdünnt, bei 65 °C für 30 min inaktiviert und sedimentiert. Dann erfolgte nach Herstellerangaben die Zugabe des Substrats CSPD*. Dieses wurde dephosphoryliert und Licht bei der Wellenlänge von 477 nm emittiert.

3.2.7 Herstellung stabiler Zelllinien

Bei der Herstellung einer induzierbaren, stabilen Zelllinie mit dem „GeneSwitch-System“ wurde folgendermaßen vorgegangen: 24 h nach einer Kotransfektion der Plasmide pGene

(mit Zielgen) und pSwitch wurden dem Kulturmedium Selektionsantibiotika zugefügt (Zeocin und Hygromycin; Endkonzentration: 1000 µg/ml). Dann wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert, bis einige Tage später die nicht transfizierten Kontrollzellen gestorben waren. Um aus einer Zellsuspension monoklonale Zellkulturen herzustellen, wurde das Verfahren der sog. limitierenden Verdünnung angewendet. Hierbei wurden die Zellen so verdünnt, dass sich ca. 5 Zellen/ml Medium befanden. Diese Suspension ließ sich dann in eine 96-Napf-Platte verteilen (200 µl/Napf). Nach ca. 2 Wochen wurde die Expression der Klone überprüft und positive Klone wurden in 24-Napf-Platten und schließlich in Kulturflaschen expandiert.

Für die Isolation von positiven CHO-M-IRES-G-Zellen wurden die „Dynabeads Sheep anti-mouse“ oder „-anti-rabbit IgG“ nach Herstellerangaben in Kombination mit einem primären Antikörper, der gegen das VSV-G-Protein gerichtet war, verwendet. Der polyklonale Zweitantikörper war dabei mit Magnetkügelchen gekoppelt. So konnte die Zellsuspension nach Inkubation mit dem Erst- und Zweitantikörper in einen Magneten gestellt und dadurch positiv selektioniert werden.

3.2.8 Quantifizierung positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie

Eine durchflusszytometrische Analyse transfizierter oder infizierter Zellen wurde entweder 24 h oder 48 h nach der Transfektion durchgeführt. Wenn GFP-Expression nachgewiesen werden sollte, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst, pelletiert (1000 rpm, 10 min, 4 °C) und in PBS aufgenommen. Wenn Antigene nachgewiesen werden sollten, wurden die Zellen bei 4 °C gewaschen, mit Erst- und Zweitantikörper für jeweils 1 h bei 4 °C inkubiert und dann abgelöst und in PBS aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit dem FACS Coulter EpicsXL (Durchflusszytometer).

3.2.9 Luziferase-Nachweise

Firefly-Luziferase (24-Napf-Platte) zum Nachweis der Aktivierung des Interferon-β-Promotors

Das Enzym Luziferase katalysiert die Oxidation von Luziferin unter Abgabe eines Photons. Um die Aktivität der *Firefly*-Luziferase nachzuweisen, wurden die Zellen in 24-Napf-Platten ausgesät, mit pLuc-125 transfiziert sowie nach 4 oder 16 h infiziert und am folgenden Tag mit PBS gewaschen und abgelöst. Dann wurden ca. 2×10^5 Zellen in 100 µl „Reporter Lysis-Puffer“ resuspendiert und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 10 µl

davon in eine 96-Napf-Platte gegeben. Anschließend wurden 50 µl Luziferin pro Napf hinzugefügt und die Chemilumineszenz sofort mit dem Plattenlesegerät GENios Pro gemessen.

Renilla-Luziferase-GFP

Zum Nachweis der *Renilla*-Luziferase-Aktivität wurde das „Bret2-Kit“ nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden die Zellen in 96-Napf-Platten ausgesät, infiziert und am nächsten Tag mit PBS gewaschen und mit 50 µl PBS überschichtet. Danach erfolgte die Zugabe des Substrats (50 µl) durch den Injektor des Plattenlesegerätes und die Messung des emittierten Lichts bei ca. 410 nm und 515 nm.

3.2.10 β-Galaktosidase-Nachweis

Der Nachweis von β-Galaktosidase-Aktivität (von transfizierten oder infizierten Zellen) wurde nach Herstellerangaben mit dem „In situ β-Galactosidase Staining Kit“ oder dem „Beta-Glo Assay System“ durchgeführt. Für den Nachweis der β-Galaktosidase mittels „In situ β-Galactosidase Staining Kit“ wurden die Zellen 24 oder 48 h nach der Infektion nach Herstellerangaben fixiert und mit einer X-Gal-Lösung gefärbt. Für das „Beta-Glo Assay System“ wurden 1×10^5 Zellen mit 500 µl Lysis-Puffer inkubiert, bevor 100 µl der Probe mit 200 µl der Substrat-Lösung nach Herstellerangaben versetzt wurden. Das Substrat wurde durch die β-Galaktosidase in Luziferin und Galaktose gespalten. In einem zweiten Schritt spaltete die im Puffer vorhandene *Firefly*-Luziferase das Luziferin und es wurde Licht emittiert.

3.2.11 Lactat-Dehydrogenase-Nachweis

Um die Zytotoxizität von verschiedenen VS-Viren zu bestimmen, wurden die Zellen in einer 24-Kavitäten-Platte ausgesät und am folgenden Tag für eine Stunde bei 37°C infiziert. Danach wurde das Medium erneuert und die Überstände nach bestimmten Zeitabständen geerntet. Mit dem „CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay“ wurde die Aktivität der freigesetzten Lactat-Dehydrogenase (LDH) nach Herstellerangaben nachgewiesen d. h., dass 50 µl des Kulturüberstandes mit 50 µl Substratlösung versetzt und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurden. Als Positivkontrolle (100 % freigesetzte LDH) wurden nicht infizierte Zellen lysiert. Der Test basierte auf der Umsetzung von Lactat durch die LDH, was schließlich nach weiteren Reaktionen die Freisetzung des

fluoreszierenden Resorufin zur Folge hatte. Alle Proben wurden mit dem Plattenlesegerät ausgewertet.

3.2.12 Nachweis der Caspase-Aktivität

Die Caspase-3/7-Aktivitäten von infizierten Zellen wurden mit dem „Caspase-Glo 3/7 Assay“ nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen in 24-Kavitäten-Platten ausgesät und am nächsten Tag für eine Stunde infiziert. Nach bestimmten Zeitabständen wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, hierbei wurden adhärente und abgelöste Zellen vereinigt. Dann wurden zwischen 1×10^4 und 5×10^4 Zellen in 50 μ l Medium aufgenommen, mit 50 μ l Substratlösung versetzt und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem Test setzten die Caspasen ein Substrat um und stellten somit ein weiteres Substrat für eine im Puffer vorhandene Luziferase her. Das von dieser Luziferase emittierte Licht wurde mit dem Plattenlesegerät ausgewertet.

3.2.13 Fixieren und Permeabilisieren von Zellen, Immunfluoreszenztest

Die in 24-Napf-Platten auf Deckgläschen transfizierten oder infizierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit 250 μ l 3 %igem Paraformaldehyd (PFA) überschichtet und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Zellrasen mit PBS-Glycin gewaschen und damit für 5 min inkubiert, um das restliche PFA zu inaktivieren. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBSM gewaschen und in einer feuchten Kammer für Immunfluoreszenztests weiter verwendet oder einmal mit Wasser gewaschen und mit Mowiol sofort eingedeckelt (bei GFP-Expression). Um die Zellen zu permeabilisieren, wurde eine Triton-X-100-Behandlung nach der Fixierung mit PFA durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 250 μ l der Lösung überschichtet und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBSM.

Die auf Deckgläschen fixierten (und evtl. permeabilisierten) Zellen wurden in einer sog. „feuchten Kammer“ mit Antikörpern inkubiert. Dazu wurde eine Petrischale mit befeuchtetem Filterpapier und Parafilm ausgelegt und die entsprechenden Antikörperverdünnungen (in 1% BSA) tröpfchenweise darauf pipettiert. Die Deckgläschen wurden mit Hilfe einer Pinzette mit den Zellen nach unten auf diese Tropfen aufgebracht und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Deckgläser zurück in die 24-Napf-Schalen überführt, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Zweit-Antikörper im Dunkeln (falls mit

Fluoreszenzmarkern gekoppelt) inkubiert. Vor dem abschließenden Eindeckeln der Deckgläser wurden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit Aqua dest. gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und ausgewertet.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 SDS-PAGE

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt (nach Laemmli, 1970). Man versetzte die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer, so dass diese eine negative Gesamtladung erhielten und somit zur positiven Anode durch das Gel wandern konnten. Zur besseren Auftrennung durchliefen die Proben zwei unterschiedlich zusammengesetzte Gele (Sammel- und Trenngel).

Die fertigen Gele wurden in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Für reduzierende Bedingungen wurde den Proben zusätzlich 10 % 1 M DTT zugesetzt, welches vorhandene Disulfidbrücken zwischen den Peptidketten zerstörte; anschließend wurden diese für 3 min bei 95 °C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bis zum Einlaufen der Proben ins Trenngel bei 80 V, anschließend bei 110 V, bis der Farbstoff des Probenpuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

3.3.2 Western-Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe der "Semi-Dry-Blot"-Technik (Kyhse-Andersen, 1984) transferiert. Auf die Graphitplatte (Anode) der Blotkammer wurden 6 Blatt Filterpapier (getränkt in Anodenpuffer I), 3 Blatt Filterpapier (getränkt in Anodenpuffer II), Nitrozellulose (getränkt in H₂O), Trenngel und 9 Blatt Filterpapier (getränkt in Kathodenpuffer) gelegt. Die Kammer wurde mit der oberen Graphitplatte (Kathode) geschlossen und der Transfer erfolgte für 1 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm². Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden anschließend durch Inkubation mit Blocking-Reagenz über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Anschließend wurde der Blot dreimal für jeweils 10 min mit PBS-Tween gewaschen.

Danach erfolgte die Inkubation für 1 h mit dem Primär-Antikörper, welcher in PBSM verdünnt wurde. Anschließend wurde wieder 3 x 10 min mit PBS-Tween gewaschen. Der Enzymgekoppelte oder Biotin-konjugierte Zweitantikörper wurde ebenfalls für 1 h mit der Membran inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran erneut, wie oben beschrieben, gewaschen. Falls der Sekundär-Antikörper mit HRP (*horseradish peroxidase*), einer Peroxidase aus Meerrettich, gekoppelt war, wurden die Proteine direkt mit dem „Super Signal West Dura Extended Duration Substrate“ oder dem „BM Chemoluminescence Blotting Substrate“ nachgewiesen. Wenn ein Biotin-konjugierter Zweitantikörper verwendet wurde, fand noch vorher eine Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase statt. Die spezifische Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des ChemiDoc EQ-Gerätes, einer tiefgekühlten CCD-Kamera, detektiert.

3.3.3 Biotinylierung und Immunpräzipitation

Der Zellrasen in der 6-Napf-Platte wurde dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Oberflächenproteine durch eine Inkubation mit frisch angesetzttem Sulfo-NHS-Biotin (0,5 mg/ml PBS, 250 µl/Napf) bei 4 °C für 20 min unter leichtem Schwenken markiert. Zur Inaktivierung überschüssigen Biotins wurden die Zellen mit 0,1 M Glycinlösung gewaschen und nachfolgend mit dieser für 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde erneut mit kaltem PBS gewaschen. Für die Zellyse wurden 0,6 ml NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren in jede Vertiefung gegeben und für 10 - 30 min auf Eis gestellt. Mit einer Pipette wurden die abgelösten Zellen resuspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 rpm für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand (ca. 500 µl) wurde in ein neues 1,5 ml-Röhrchen gegeben und entweder mit a) 50 µl Protein-A-Sepharose und einem Antikörper gegen das Oberflächenprotein oder mit b) Streptavidin-Agarose über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Ansätze bei 14000 rpm für 3 min abzentrifugiert und mit NP40-Lysispuffer ohne Proteaseinhibitoren dreimal gewaschen. Nun wurden auf die Sedimente 50 µl 2 x SDS-Probenpuffer gegeben und es erfolgte ein zehnmütiges Erhitzen bei 95 °C. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min wurde der Überstand abgenommen und konnte für die SDS-PAGE verwendet oder bei -20 °C gelagert werden. Die Detektion der biotinylierten Proteine erfolgte später durch eine einstündige Inkubation bei RT entweder mit a) Streptavidin-Peroxidase oder mit b) einem Antikörper gegen das Oberflächenprotein und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Es folgte eine dreimalige jeweils zehnmütige Inkubation mit PBSM-Tween und ein einmaliges Waschen mit PBS. Der gebundene Peroxidasekomplex konnte nach ein- bzw. fünfminütiger Inkubation mit „Super

Signal West Dura Extended Duration Substrate“ oder „BM Chemoluminescence Blotting Substrate“ sichtbar gemacht werden.

3.4 Virologische Methoden

3.4.1 Herstellung und Vermehrung von VS-Viren

Zur Herstellung von VS-Viren wurden T7-exprimierende Zellen (z. B. BSR-T7 oder mit MVA-infizierte BHK-21-Zellen) mit mehreren Plasmiden transfiziert: ein Plasmid, welches das VSV-Antigenom enthielt und 3 weitere Plasmide, die für die Proteine N, P und L kodierten. Falls Deletionsmutanten generiert werden sollten, wurden noch dementsprechend weitere Plasmide transfiziert, die diese deletierten Gene (z. B. M und G) exprimierten (Abb. 7). Zwei Tage nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit.

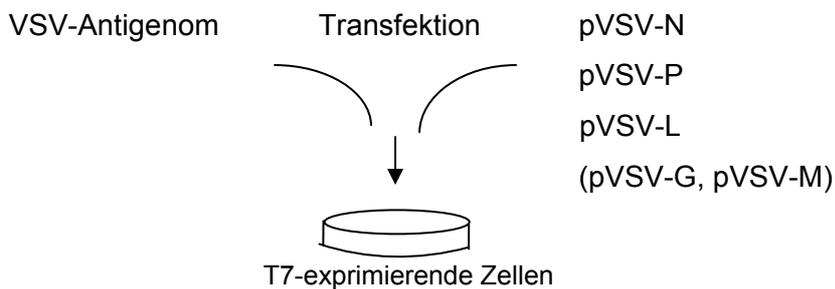


Abb. 7: Herstellung von VS-Viren.

Zur Vermehrung der VS-Viren wurden BHK-21-Zellen oder im Falle von VSV- Δ G-Viren induzierte BHK-G43-Zellen verwendet. Die Vermehrung der Viren erfolgte in 6-Napf-Platten oder T₇₅-Kulturflaschen. Ein oder zwei Tage nach der Infektion wurde der virushaltige Überstand abgenommen und von Zelltrümmern durch Zentrifugation sowie durch Filtration von evtl. noch vorhandenem MVA befreit. Anschließend wurden Aliquots bei -80 °C weggefroren. Wenn eine höhere Viruskonzentration benötigt wurde, wurden die Viruspartikel noch mittels Saccharose-Kissen (20 % Saccharose in PBS-M) und Zentrifugation angereichert.

3.4.3 VSV-Pseudotypisierung

Um VSV-Pseudotypen zu konstruieren, die in ihrer Hülle ein heterologes Glykoprotein tragen, wurden zunächst BHK-21-Zellen mit dem Gen für das fremden Glykoprotein in 6-Napf-Platten transfiziert. Nach ca. 20 h erfolgten eine Infektion mit VSV*cp- Δ G (250 μ l/Napf) und ein Neutralisierungsschritt (1 h mit Anti-VSV-Serum (1:1000) bei 37 °C, 500 μ l/Napf), um Helfervirus zu entfernen. Nach einem Tag wurde der Überstand auf BHK-21- oder MDCK-I-Zellen gegeben (und im Falle von HEF mit Trypsin aktiviert), um zu sehen, ob diese von den Pseudotypen infiziert werden konnten. Ein Teil des Überstandes wurde nochmals vorher mit Anti-VSV-Serum inkubiert. Die Infektion konnte anhand der GFP-Expression nachgewiesen werden.

3.4.4 Virus-Titration, Plaque-Test

Die Virustiter wurden entweder mittels Infektion von BHK-21- oder MDCK-I-Zellen in 96-Napf-Platten und anschließender GFP-Expression ermittelt. Alternativ wurden Plaque-Tests durchgeführt. Dazu wurden Zellen in 24- oder 6-Napf-Platten ausgesät und am folgenden Tag mit verschiedenen Virus-Verdünnungen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde eine Agarose-Medium-Mischung hergestellt: Seaplaque-Agarose wurde mit H₂O angesetzt (1,8 %), aufgekocht und dann 1:1 mit doppeltkonzentriertem Medium gemischt. Nach der Infektion wurden die Zellen mit der Agarose-Medium-Mischung (42 °C) überschichtet, für ca. 15 min bei 4 °C und dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die erstarrte Agarose mit Kristallviolett überschichtet. Nach einigen Stunden wurde das Kristallviolett wieder abgenommen und die Näpfe kurz mit Wasser gespült. Dann wurde die erstarrte Agarose aus den Näpfen entfernt. Nun konnte man den infizierten Zellrasen mit den Virus-Plaques sehen und den Titer (in PFU/ml) errechnen.

4. Ergebnisse

4.1. VSV-Pseudotypen

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines VSV-Vektors für gentherapeutische Einsätze in der Lunge. Dazu sollte VSV mit fremden Glykoproteinen pseudotypisiert werden, um später eine apikale Infektion polarisierter Lungenepithelzellen zu ermöglichen.

4.1.1. Das HEF-Protein des Influenza-C-Virus

Die Influenza-C-Viren gehören zu der Familie *Orthomyxoviridae*. Es handelt es sich um behüllte Viren mit einem segmentierten Genom, dessen einzelsträngige RNA von negativer Polarität ist. Das Influenza-C-Virus wird wie alle Influenza-Viren aerogen übertragen und infiziert die Epithelien des oberen Respirationstraktes (Taylor, 1951). Die Erkrankung tritt vor allem bei Kindern auf und äußert sich in milden, grippeähnlichen Symptomen (Francis *et al.*, 1950; Dykes *et al.*, 1980). Häufig kommt es aber zu einem inapparenten Verlauf der Erkrankung, nur selten zu schweren Verlaufsformen (Darke *et al.*, 1957).

Das Oberflächenglykoprotein HEF (Herrler *et al.*, 1979, 1981; Pfeifer & Compans, 1984) liegt als trimere Komplex vor (Waterson *et al.*, 1963; Herrler *et al.*, 1981; Hewat *et al.*, 1984). Es wird als Polypeptid von 88 kDa synthetisiert (HEF0) und durch zelluläre Trypsin-ähnliche Proteasen in die Untereinheiten HEF1 (432 AS, 57 kDa) und HEF2 (209 AS, 25 kDa) gespalten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden bleiben (Herrler *et al.*, 1979; Rosenthal *et al.*, 1998). HEF ist ein Klasse-I-Membranprotein mit einer N-terminalen hydrophoben Signalsequenz, einem Fusionspeptid und einem Membrananker (Herrler *et al.*, 1981; Formanowski & Meier-Ewert, 1988; Herrler & Klenk, 1991). Der sehr kurze zytoplasmatische Anteil besteht aus drei Aminosäuren (Arginin, Threonin und Lysin). Das HEF-Protein unterliegt zahlreichen ko- und posttranslationalen Modifikationen, die seine Struktur und Funktion entscheidend beeinflussen. Die HEF2-Untereinheit wird am Cystein in der Nähe des C-Terminus mit Stearinsäure acyliert (Veit *et al.*, 1990). Das Glykoprotein vereinigt die drei biologischen Aktivitäten Hämagglutination, Esterase und Fusion (Vlasak *et al.*, 1987; Herrler *et al.*, 1988). Influenza-C-Viren erkennen die seltene N-Acetyl-9-O-Acetylneuraminsäure (Neu5,9Ac2) als Rezeptordeterminante auf zellulären Glykoproteinen und Glykolipiden (Herrler *et al.*, 1991; Zimmer *et al.*, 1992). Die Aktivität der Serin-Esterase, die die 9-O-Acetylgruppe von Rezeptordeterminanten zerstört (Herrler *et al.*, 1985), spielt beim Viruseintritt sowie bei der Virusfreisetzung eine entscheidende Rolle (Strobl & Vlasak,

1993; Vlasak *et al.*, 1989; Hofling *et al.*, 1996). Nach der Bindung an den Rezeptor wird das Virus mittels Endozytose aufgenommen. Die Ansäuerung des Endosomes führt zur Freilegung der fusogenen Domäne des HEF-Proteins und somit zur Fusion von Endosomenmembran und Virushülle.

Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass das Glykoprotein des Influenza-C-Virus in VSV-Partikel eingebaut wurde. Dadurch erhielten die VSV-Pseudotypen die Fähigkeit, polarisierte Epithelzellen von der apikalen Plasmamembran zu infizieren (Hanika *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit sollten die VSV*- Δ G (HEF)-Pseudotypen weiter optimiert werden. Da die Esteraseaktivität die Rezeptoren auf der Zelloberfläche zerstört, ist eine wiederholte Vermehrung auf einer Helferzelllinie nicht möglich. Um dieses Problem zu lösen, wurde eine Mutation in das aktive Zentrum des HEF-Proteins eingefügt (S71C). Ein weiterer Nachteil von HEF ist die notwendige Zugabe von Trypsin zur Zellkultur, damit HEF proteolytisch aktiviert wird. Um dieses zu ändern, sollte die Spaltstelle in eine Furin-Spaltstelle (KRKRR) umgewandelt werden. Furin ist eine ubiquitär vorkommende Protease in tierischen Zellen, so dass eine Aktivierung des Glykoproteins mit Trypsin entfallen würde. Des Weiteren sollte eine Acylierungsmutante (C652S) hergestellt werden, die nicht mit Stearinsäure modifiziert werden würde (Veit *et al.*, 1990, 1996, Reverey *et al.*, 1996). Der Acylierungszustand eines viralen Proteins kann einen Einfluss auf die Assoziation mit *lipid rafts* und auf die Infektiosität eines Virus haben (Wagner *et al.*, 2005).

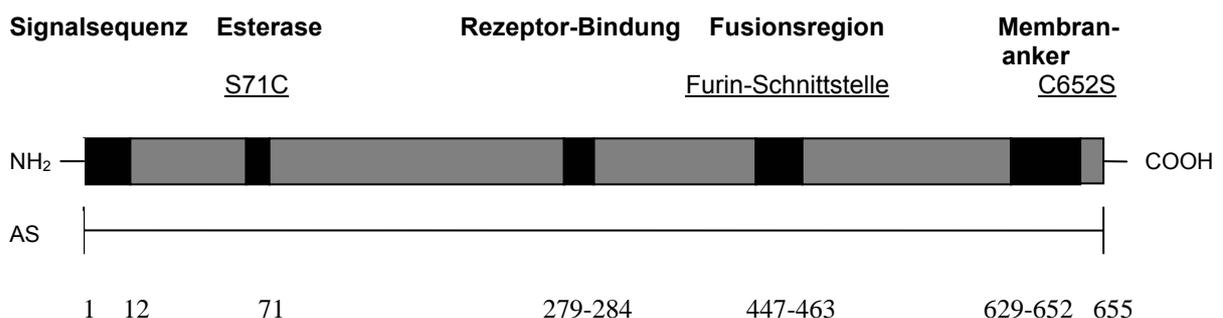


Abb. 8: Schematische Darstellung des HEF-Proteins. Die verschiedenen funktionellen Regionen (schwarz, fett) und die veränderten Sequenzabschnitte (unterstrichen) sind gekennzeichnet (nach: Herrler & Klenk, 1991).

Die Mutationen des HEF-Proteins (Abb. 8) wurden mittels Mutagenese-PCR in die Originalsequenz des pCDNA3.1-HEF eingefügt. Anschließend wurde die Oberflächenexpression in BHK-21-Zellen untersucht. Da die Bildung neuer VSV-Partikel an

der Zellmembran stattfindet, müssen auch die einzubauenden heterologen Glykoproteine an die Zelloberfläche gelangen. Es ist zudem gezeigt worden, dass vier Mutationen schon den Transport des HEF-Proteins zur Zelloberfläche und damit auch den Einbau in Virus-Partikel inhibieren können (Szepanski *et al.*, 1994; Oeffner *et al.*, 1999; Hanika *et al.*, 2005). Nach transienter Expression der HEF-Mutanten in BHK-21-Zellen konnte mittels Immunfluoreszenztest und Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass alle Mutanten zur Zelloberfläche transportiert wurden (Tab. 5 und Abb. 9). Die Mutante HEF (S71A), welche ebenfalls die Esterase-Funktion betrifft, wurde zum Vergleich mit herangezogen.

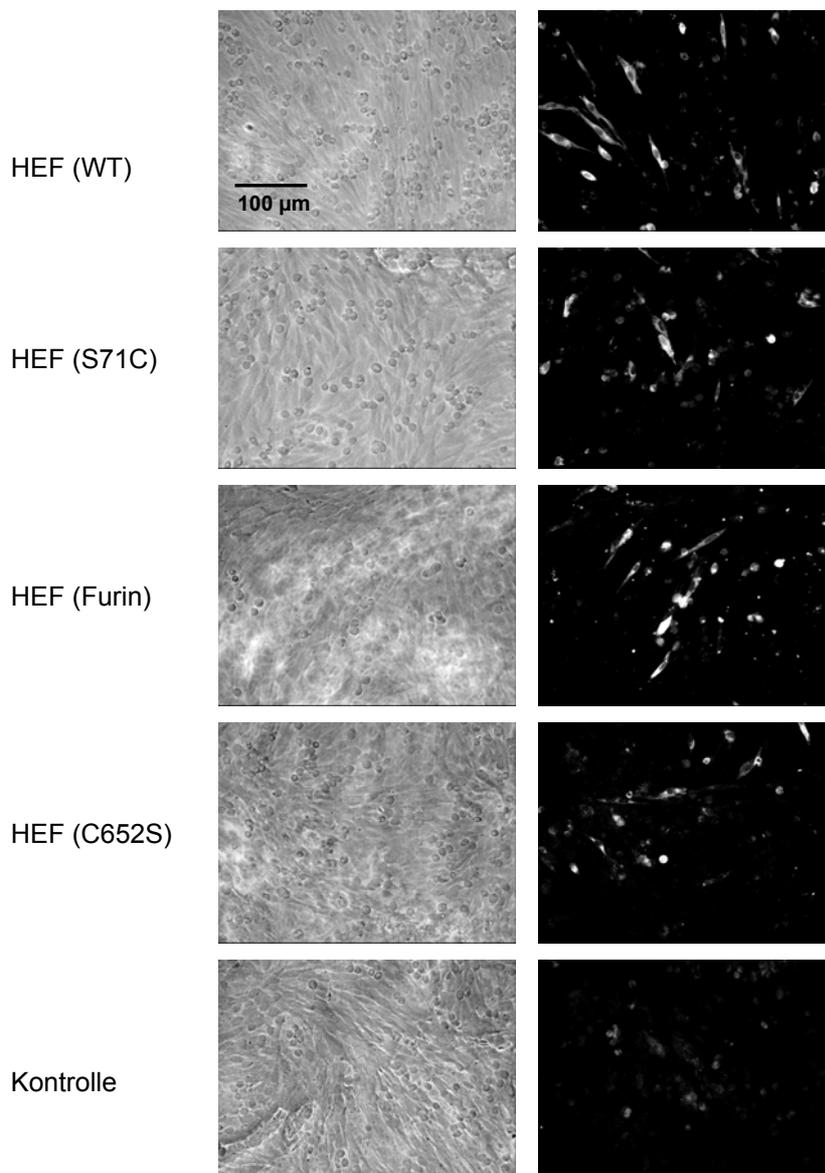


Abb. 9: Expression der HEF-Proteine in BHK-21-Zellen. Die Zellen wurden transfiziert und nach 24 h fixiert und nicht permeabilisiert. Der Immunfluoreszenztest wurde mit einem Kaninchen-Serum durchgeführt, welches gegen Influenza-C-Virus gerichtet war.

Tab. 5: Durchflusszytometrische Analyse der HEF-Proteine in BHK-21-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit einem gegen Influenza-C-Virus gerichteten Serum und Anti-Kaninchen-IgG-FITC gefärbt. Es sind die Ergebnisse aus drei Parallelansätzen als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Glykoprotein	Anteil positiver Zellen (in %)	Fluoreszenzintensität
HEF (WT)	24,65 ± 0,35	150,10 ± 1,41
HEF (S71C)	16,75 ± 0,92	88,35 ± 1.06
HEF (S71A)	12,30 ± 1,13	106,50 ± 0,71
HEF (Furin)	21,90 ± 3,68	136,90 ± 10,47
HEF (C652S)	13,05 ± 0,78	111,15 ± 4,74

Die Expression der Konstrukte an der Zelloberfläche fiel unterschiedlich aus. Am besten wurde das authentische HEF-Protein zur Oberfläche transportiert, gefolgt von der Furin-Mutante, der Esterase-Mutante S71C und der C652S-Mutante. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine Oberflächenbiotinylierung in MDCK-II-Zellen durchgeführt (Abb. 10). Dazu wurden die Zellen transfiziert und 24 h später mit Sulfo-NHS-Biotin inkubiert, welches mit freien Aminogruppen von Proteinen reagiert. Das Substrat ist nicht membrangängig, so dass ausschließlich Oberflächenproteine markiert wurden.

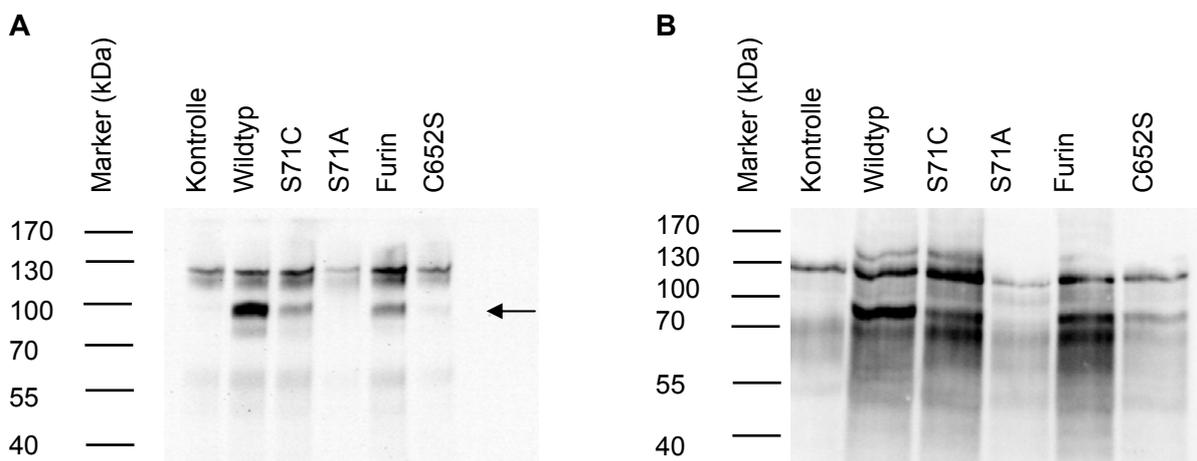


Abb. 10: Oberflächenbiotinylierung von MDCK-II-Zellen nach Transfektion der HEF-Konstrukte. Die Zellen wurden transfiziert, 24 h später biotinyliert und lysiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Protein-A-Sepharose und Anti-Influenza-C-Antikörper. Nach Auftragen der Proben auf ein SDS-Gel und Transfer auf Nitrocellulose erfolgte eine Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase. **A** nicht reduzierende Bedingungen **B** reduzierende Bedingungen.

Danach wurden die Zellen lysiert, mit Kaninchen-Anti-Influenza-C-Antikörper inkubiert (Immunpräzipitation) und die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Übertragen auf Nitrozellulose wurde diese mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert, welches an Biotingruppen bindet. In diesem Experiment konnte unter reduzierenden Bedingungen festgestellt werden, dass HEF (Furin) entgegen den Erwartungen ebenso wie die anderen Konstrukte ohne Zugabe von Trypsin ungespalten an der Oberfläche exprimiert wurde (Abb. 10 B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine der HEF-Mutanten besser an die Oberfläche transportiert wurde als das native Glykoprotein.

Die Verwendung der HEF-Mutanten für die Pseudotypisierung von VSV ergab, dass alle Mutanten außer der HEF (Furin)-Mutante eine Infektion von MDCK-I-Zellen vermittelten, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz (Tab. 6). Obwohl die C652S-Mutante schwächer an der Oberfläche exprimiert wurde als die S71C-Mutante, waren mehr infektiöse Pseudotypen nachweisbar. Mit der Furin-Mutante ließen sich hingegen gar keine infektiösen Pseudotypen herstellen. Mit dem nativen HEF-Protein konnten immer noch die höchsten, wenn auch insgesamt sehr niedrigen Titer (im Vergleich mit VSV*-ΔG (G)) erreicht werden.

Tab. 6: Titration der VSV*-ΔG (HEF)-Pseudotypen auf MDCK-I-Zellen. Die virushaltigen Überstände wurden mit Trypsin aktiviert, verdünnt und auf MDCK-I-Zellen titriert. Nach 24 h wurde anhand der GFP-Expression die Zahl der exprimierenden Zellen und somit der Virustiter ermittelt. Die Ergebnisse aus parallelen Ansätzen sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben.

Virus	Titer ($\log_{10} \text{ ml}^{-1}$)
VSV*-ΔG (HEF (WT))	4,8 ± 0,3
VSV*-ΔG (HEF (S71C))	2,6 ± 0,3
VSV*-ΔG (HEF (Furin))	-
VSV*-ΔG (HEF (C652S))	4,4 ± 0,5
VSV*-ΔG (G)	7,6 ± 0,3

4.1.2 Untersuchung weiterer Glykoproteine

4.1.2.1 GP64 des Baculovirus AcMNPV

Baculoviren sind filamentöse Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom und gehören zur Familie *Baculoviridae*. Ihr Hauptwirt sind Mottenlarven (Sherman & McIntosh, 1979). Baculoviren werden hauptsächlich über kontaminierte Blätter übertragen, die von Insekten

gefressen werden. Das bestuntersuchte Baculovirus ist *Autographa californica multicausid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Die Virus-Partikel benötigen für eine Infektion das Glykoprotein GP64 (Blissard & Wenz, 1992), welches sich an den Enden des fadenförmigen Virions befindet. GP64 ist sowohl für die Knospung der Virionen aus der Zelle (Oomens & Blissard, 1999; Wang *et al.*, 1998) als auch für die Infektion von weiteren Zellen im Infektionszyklus (Monsma *et al.*, 1996) notwendig. GP64 ist ein Typ-I-Membranprotein und besteht aus 512 Aminosäuren, besitzt eine N-terminale Signalsequenz von 20 Aminosäuren, eine Oligomerisations- und eine Fusionsdomäne (Monsma & Blissard, 1995) sowie eine hydrophobe Transmembrandomäne am C-terminalen Ende. Zudem wird das Protein glykolysiert und palmitoyliert (Zhang *et al.*, 2003). Eine Trimerisierung ist wichtig für den Transport zur Zelloberfläche (Markovic *et al.*, 1998).

Das Glykoprotein des Baculovirus wurde bereits in mehreren Studien zur Pseudotypisierung von anderen Viren verwendet. Zum Beispiel konnten rekombinante HRS (Humanes Respiratorisches Synzytialvirus)-Viren erzeugt werden, bei denen die Gene für die Hüllproteine SH, G und F durch das GP64-Gen ersetzt wurden (Oomens & Wertz, 2004). Auch Lentiviren bauen das GP64-Protein in ihre Virushülle ein (Kumar *et al.*, 2003; Schaubert *et al.*, 2004; Guibinga & Friedmann, 2005; Kang *et al.*, 2005). Sinn *et al.* (2005) zeigten, dass FIV (Felines Immundefizienzvirus) respiratorische Epithelzellen von apikal infizieren konnte, wenn es mit dem Glykoprotein des Baculovirus pseudotypisiert worden war. Des Weiteren zeigten Kremer *et al.* (2007), dass ein lentiviraler Vektor mit GP64 die Atemwege nicht effizienter infizieren konnte als ein mit VSV-G pseudotypisierter Vektor nach LPC (Lysophosphatidylcholin)-Behandlung.

Um die Expression des GP64 und die Pseudotypisierung von VSV untersuchen zu können, wurde zunächst das Gen für GP64 aus virushaltigem Zellkulturüberstand per PCR amplifiziert. Dies gelang erst nach Aufreinigung des Überstandes mit Hilfe des „DNeasy Tissue Kits“. Das Gen wurde daraufhin in verschiedene Vektoren (pGeneC, pIRES-hrGFP11, pCDNA3.1) kloniert. Diese besitzen jeweils unterschiedliche Eigenschaften: so gehört das Plasmid pGene zu einem induzierbaren Expressionssystem, welches bei der Etablierung stabiler Zelllinien von Vorteil ist. Das Plasmid pIRES-hrGFP11 besitzt hingegen eine GFP-Kassette, welches eine schnelle Identifizierung exprimierender Zellen erlaubt. Das GP64 wurde ohne Stop-Codon in den Vektor pIRES-hrGFP11 kloniert, so dass ein *Flag*-Epitop in das Protein inseriert wurde.

Die Expression des GP64 wurde in BHK-21-Zellen einen Tag nach Transfektion mit Hilfe eines Immunfluoreszenztest untersucht. Hierbei wurden zwei Antikörper verwendet (AcV1

und AcV5), die GP64 erkennen. Mit diesen kommerziellen Antikörpern war GP64 jedoch nicht in den transfizierten Zellen nachweisbar. Mit Hilfe des Konstruktes pIRES-hrGFPII-GP64 konnte aber anhand des an der zytoplasmatischen Domäne inserierten *Flag*-Epitops die Expression nachgewiesen werden (Abb. 11). Die Lokalisation des Proteins ähnelte der eines an der Zelloberfläche befindlichen Proteins.

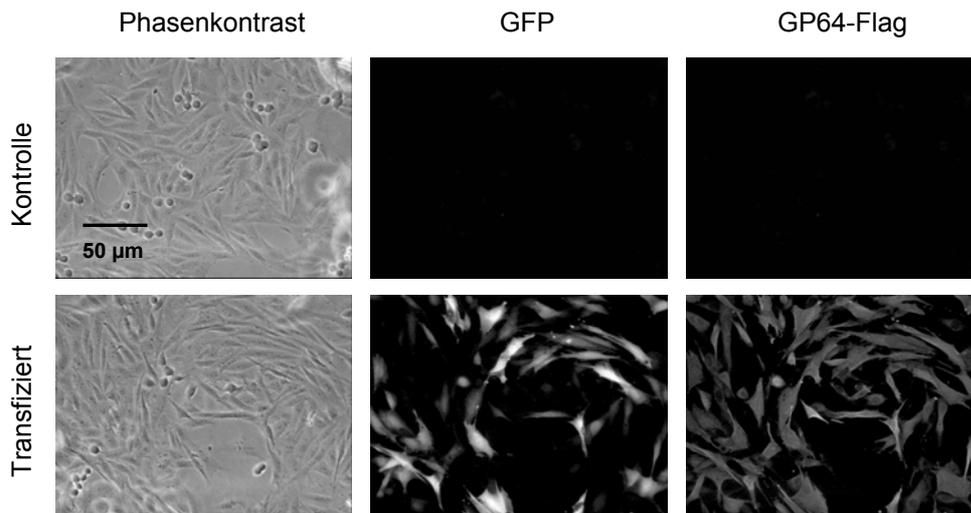


Abb. 11: Expressionsanalyse des GP64 mittels Immunfluoreszenztest. BHK-21-Zellen wurden mit pIRES-hrGFPII-GP64 transfiziert und 24 h später fixiert und permeabilisiert. Der indirekte Immunfluoreszenztest wurde mit Maus-Anti-Flag M2 durchgeführt.

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Inkubationstemperatur nach der Transfektion einen Einfluss auf die Expressionsrate des GP64 in BHK-21-Zellen haben würde. Denn Baculoviren infizieren natürlicherweise Insektenzellen, in denen u. a. andere Temperaturen herrschen als in Säuger-Zellen. So haben Oomens & Wertz (2004) gezeigt, dass die Oberflächenexpression und die Synzytien-Formation von HRSV-GP64-Pseudotypen bei 33 °C höher waren. Wie in Abb. 12 zu sehen, war jedoch die Expression bei 37 °C in diesem Versuchsansatz nach wie vor besser als bei 33 °C. Auch eine längere Inkubation (2 Tage) nach Transfektion hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis der Immunfluoreszenz (Ergebnisse nicht gezeigt).

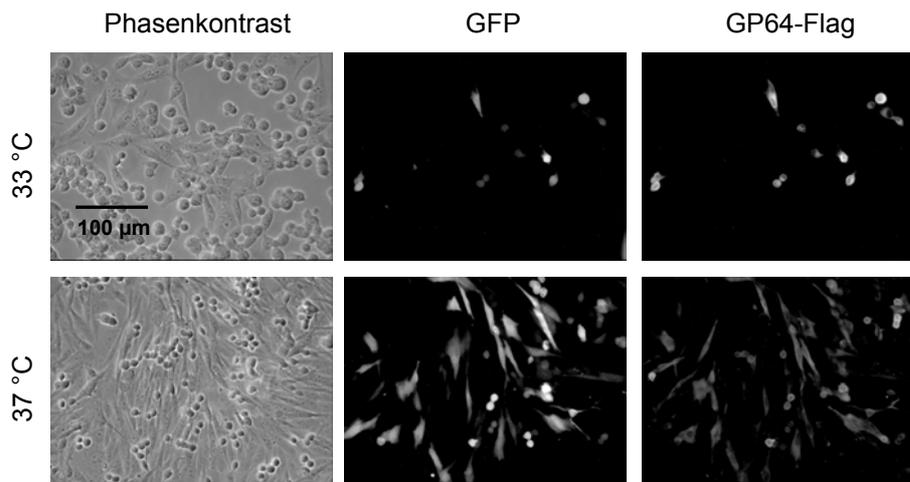


Abb. 12: Expression des GP64 bei unterschiedlichen Temperaturen. BHK-21-Zellen wurden mit pIRES-hrGFPII-GP64 transfiziert und 24 h später fixiert, permeabilisiert und mit Maus-Anti-Flag M2 gefärbt.

Um die Expressionsrate des GP64 zu erhöhen, wurde ein synthetisches GP64 (GP64syn) bezogen. Dieses ist an die Codon-Verwendung in Säuger-Zellen angepasst. Kryptische, also im Verborgenen liegende Spleißstellen, wurden ebenfalls entfernt. Dieses synthetische Glykoprotein wurde wiederum in drei verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Das GP64syn wurde dieses Mal mit Stop-Codon in den Vektor pIRES-hrGFPII eingefügt, so dass das *Flag*-Epitop nicht in das Protein inseriert wurde (im Gegensatz zum oben beschriebenen Fall). Dies sollte die Möglichkeit ausschließen, dass das Epitop die Expression oder später die Pseudotypisierung von VSV negativ beeinflusst. Die Expression in BHK-21-Zellen zeigte, dass das codon-optimierte GP64 zur Zelloberfläche transportiert wurde. Mit dem pIRES-hrGFPII-Konstrukt und dem kommerziellen Antikörper AcV1 war eine Färbung zu sehen (Abb. 13).

Es wurde zusätzlich eine Oberflächenbiotinylierung nach Transfektion der GP64-Konstrukte in BHK-21-Zellen durchgeführt (Abb. 14). Die transfizierten Zellen wurden dazu mit Sulfo-NHS-Biotin inkubiert, lysiert und mit Streptavidin-Agarose inkubiert. Dann wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit Anti-GP64-Antikörper (AcV5) und Anti-Maus-IgG/Peroxidase behandelt. Mit dieser Methode konnte das GP64 in BHK-21-Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt war die Expression des synthetischen GP64 stärker als die des nativen GP64. Beim Konstrukt pCDNA 3.1-GP64 war jedoch ebenfalls eine starke Bande zu erkennen, bei den Konstrukten pIRES-hrGFPII-GP64 und pGene-GP64 waren die Signale schwächer. Die Expressionsrate des GP64 scheint somit auch vom verwendeten Vektor abhängig zu sein.

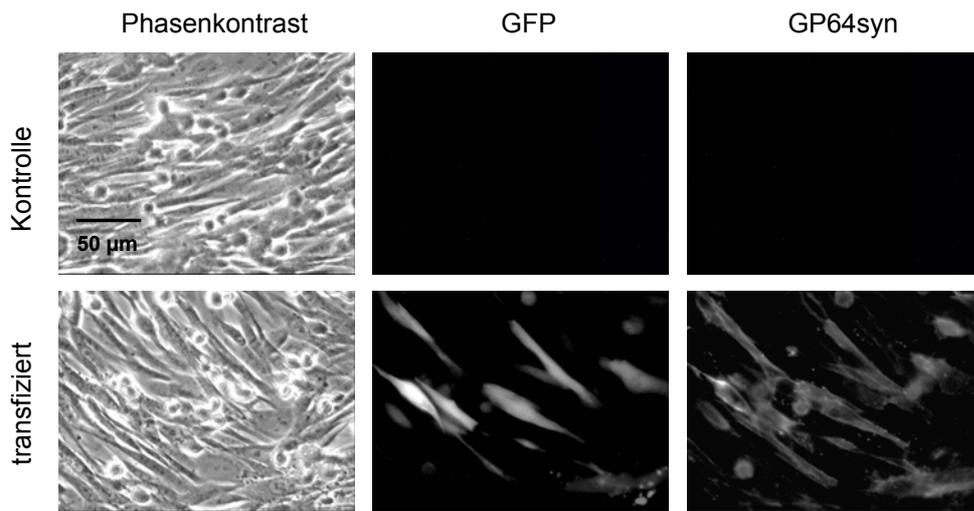


Abb. 13: Expressionsanalyse des GP64syn in BHK-21-Zellen. Die Zellen wurden mit pIRES-hrGFP^{II}-GP64syn transfiziert und 24 h später fixiert, nicht permeabilisiert, und mit Maus-Anti-GP64 (AcV1) behandelt.

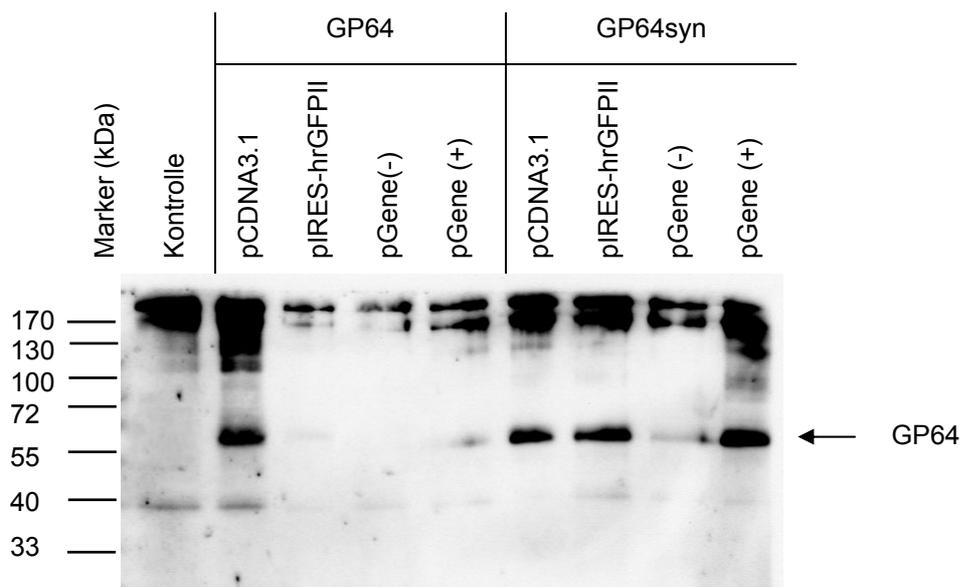


Abb. 14: Oberflächenbiotinylierung von BHK-21-Zellen nach Transfektion verschiedener GP64-Konstrukte. Die Zellen wurden transfiziert und im Fall von pGene-GP64 induziert (+) oder nicht induziert (-). 24 h später wurden die Zellen biotinyliert und lysiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Streptavidin-Agarose. Nach Auftragen der Proben auf ein SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen und Transfer auf Nitrocellulose erfolgte eine Inkubation mit Maus-Anti-GP64 (AcV5) und Anti-Maus-IgG/Peroxidase.

4.1.2.2 Glykoprotein des LCMV

Das LCMV gehört zur Familie *Arenaviridae* und dort zum Genus *Arenavirus*. Der natürliche Wirt des Virus ist die Maus (Popescu *et al.*, 1979). Durch das LCMV werden chronische Infektionen meist ohne Symptome ausgelöst. Die Übertragung des Virus auf den Menschen erfolgt durch die Aufnahme virusbelasteten Materials über den Mund oder die Atemwege sowie durch direkten Tierkontakt oder Bisse. Beim Menschen kommt es zu grippalen Infekten, Meningitis oder sogar tödlichen Krankheitsausbrüchen (Deibel *et al.*, 1975).

Die pleomorphen Viruspartikel sind umhüllt und besitzen ein segmentiertes, einzelsträngiges *ambisense*-RNA-Genom aus zwei Segmenten (L = large; 7,5 kb, S = small; 3,5 kb). *Ambisense* bedeutet, dass negativ- und positiv-orientierte Abschnitte sich abwechseln (Romanowski *et al.*, 1985). Die Virus-Partikel enthalten zudem große und kleine RNA-Moleküle sowie zelluläre Ribosomen und nicht-genomische RNAs (Pedersen, 1973).

In die Virushülle sind zwei Glykoproteine (GP-1 und -2) als Tetramere eingelagert. Das LCMV infiziert ein sehr breites Spektrum von Zellen verschiedener Spezies über die Bindung seines Hüllproteins GP-1 an den Rezeptor Alpha-Dystroglykan auf der Zelloberfläche (Cao *et al.*, 1998). GP-2 enthält eine Fusions- und eine Transmembrandomäne (Kunz *et al.*, 2003). Die beiden Proteine entstehen durch Spaltung des Vorläuferproteins GP-C (Buchmeier *et al.*, 1987). Die Spaltung durch eine Subtilase-ähnliche Protease ist nicht essentiell für die Oberflächenexpression (Kunz *et al.*, 2003), aber für die Infektion (Beyer *et al.*, 2003).

Das LCMV-GP kann in Lentiviren (Sandrin *et al.*, 2002; Kobinger *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2005) und in VSV (Bruns & Lehmann-Grube, 1984) eingebaut werden. Die Infektion von polarisierten Epithelzellen wurde allerdings bisher nicht untersucht. Jedoch ist bekannt, dass LCMV MDCK-Zellen infizieren kann (Jacobson *et al.*, 1979).

Für die Studien wurde das Gen des LCMV-GPsyn (codon-optimiert) in verschiedene Vektoren kloniert. Dazu wurde es aus dem Ursprungsvektor pCR-LCMV-GP mit Stop-Codon in die Plasmide pGene, pIRES-hrGFPII und pCDNA3.1 ligiert. Für die Expressionsanalysen wurden BHK-21-Zellen verwendet. Einen Tag nach Transfektion ließ sich das Glykoprotein mit Hilfe der Immunfluoreszenz an der Oberfläche der Zellen nachweisen, unabhängig davon, welcher Vektor verwendet wurde (Abb. 15).

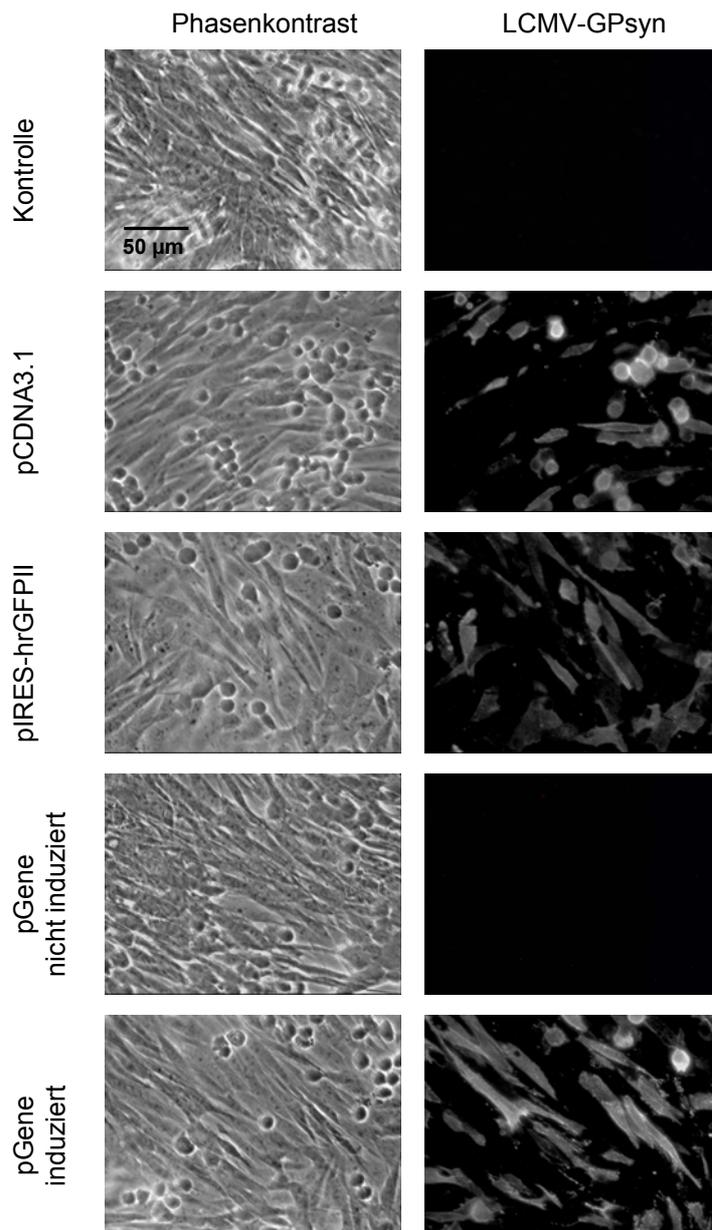


Abb. 15: Expression des LCMV-GPsyn in BHK-21-Zellen. 24 h nach Transfektion der verschiedenen LCMV-GPsyn-Konstrukte wurden die Zellen fixiert und nicht permeabilisiert. Der indirekte Immunfluoreszenztest wurde mit Maus-Anti-LCMV-GP durchgeführt. Nach der Transfektion des pGene-LCMV-GPsyn wurden die Zellen mit Mifepriston induziert (+) oder nicht induziert (-).

4.1.2.3 Glykoprotein des Ebola-Virus

Ebolaviren gehören zur Familie *Filoviridae* innerhalb der Ordnung *Mononegavirales*. Ihre natürlichen Wirte sind vermutlich Fledermäuse (Gonzales *et al.*, 2007). Sie infizieren Menschen und grüne Meerkatzen. Die Übertragung erfolgt durch Kontakt mit dem Blut infizierter Tiere bzw. durch direkten Kontakt von Mensch zu Mensch. Ebolaviren infizieren

Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen (z. B. des Blutgefäßsystems und der Leber). Die Ebola-Infektion verursacht Hämorrhagisches Fieber und hat eine hohe Lethalitätsrate (Mwanatambwe *et al.*, 2001). Das Ebola-Virus ist fadenförmig und hat einen Durchmesser von 80 nm und eine durchschnittliche Länge von 805 nm. Das Nukleokapsid ist helikal und enthält die einzelsträngige, negativ-orientierte RNA als Genom. Das Glykoprotein (GP) in der Virus-Hülle wird von zwei offenen Leserahmen kodiert und entsteht durch *RNA-Editing* (Sanchez *et al.*, 1996). Es ist ein Homotrimer mit der Größe von ca. 170 kDa und gehört zu den Typ-I-Membranproteinen. Auf dem Weg zur Zelloberfläche wird es durch Furin in GP1 (140 kDa) und GP2 (26 kDa) gespalten, welche über Disulfidbrücken verbunden bleiben (Volchkow *et al.*, 1998). GP1 ist für die Zellbindung zuständig und enthält am C-terminalen Ende eine muzinähnliche Domäne, die für die Zytotoxizität des Glykoproteins verantwortlich gemacht wird (Yang *et al.*, 2000). GP2 enthält am N-terminalen Ende eine hydrophobe Aminosäuresequenz, die die Fusion vermittelt (Malashkevich *et al.*, 1999). Die Spaltung des Ebo-GP ist für seine Expression bzw. die Virus-Infektion nicht essentiell (Wool-Lewis *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2007).

Das Glykoprotein wurde bereits in verschiedene Pseudotypen eingebaut, z. B. in VSV und Lentiviren (Takada *et al.*, 1997 + 2003; Ito *et al.*, 2001; Garbutt *et al.*, 2004; Sandrin *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2002). Es wurde beschrieben, dass der Einbau des Ebo-GP in lentivirale Vektoren eine apikale Infektion polarisierter Epithelzellen vermittelte (Sinn *et al.*, 2003).

Für die Experimente wurde der Expressionsvektor pCAGGS verwendet. Dieser enthält einen Hühner- β -Aktin-Promotor, ein Intron und ein CMV-IE-Enhancer-Element. Zum einen wurde das native Ebola-Glykoprotein (nicht codonoptimiert) verwendet und zum anderen wurde eine Deletionsmutante des Ebola-Glykoproteins hergestellt. Dieser fehlen die Aminosäuren 299 – 489, welche die muzinähnliche Domäne bilden. Die Deletion dieser Region erhöhte die Glykoprotein-Prozessierung, die Inkorporation in retrovirale Partikel und die virale Transduktion (Jeffers *et al.*, 2002).

Zur Überprüfung der Expression in BHK-21-Zellen wurde ein Immunfluoreszenztest durchgeführt. Beide Ebola-Glykoproteine waren an der Oberfläche der Zellen nachweisbar (Abb. 16).

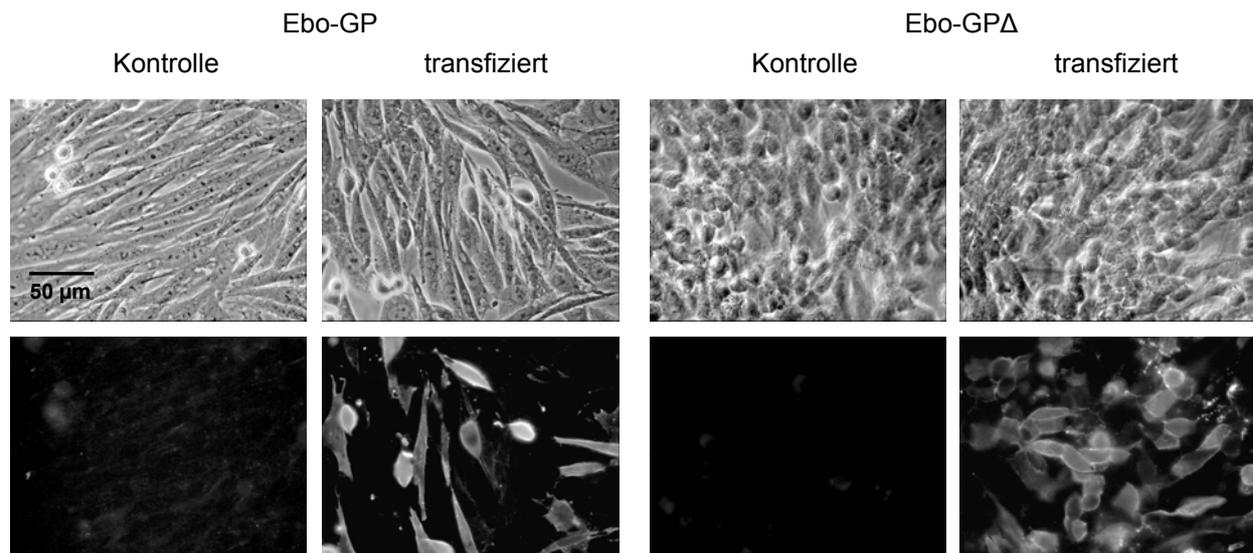


Abb. 16: Expressionsanalyse des Ebola-GP (natives Protein und Deletionsmutante) in BHK-21-Zellen. Die Zellen wurden transfiziert und 24 h später fixiert und nicht permeabilisiert. Der Immunfluoreszenztest wurde mit Ziege-Anti-Ebo-GP durchgeführt.

4.1.2.4 Pseudotypisierung von VSV mit GP64, LCMV-GP und Ebo-GP

Für die folgenden Untersuchungen wurden die vorher untersuchten Konstrukte der verschiedenen Glykoproteine verwendet. Die Vorgehensweise zur Herstellung der Pseudotypen ist in Abb. 17 dargestellt.

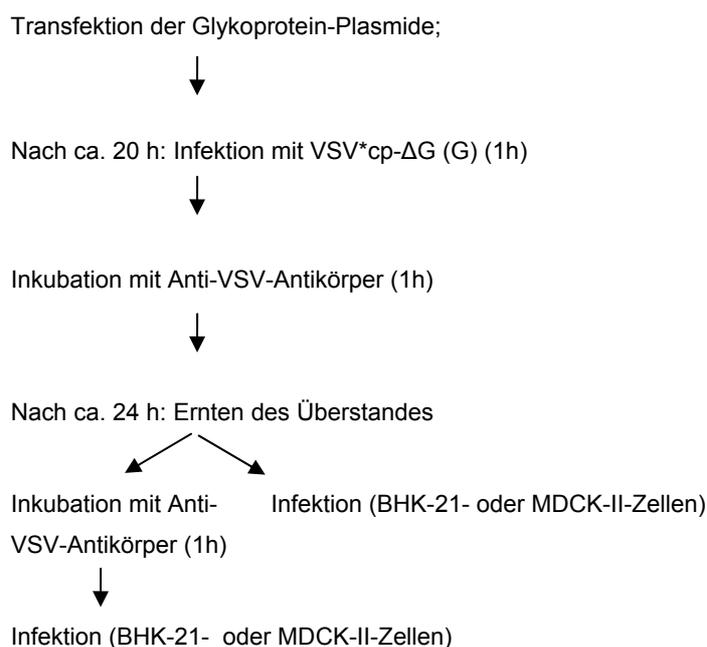


Abb. 17: Schema zur Herstellung der Pseudotypen. BHK-21-Zellen wurden transfiziert und mit Helfervirus infiziert. Danach wurde der virushaltige Zellkulturüberstand neutralisiert (+) oder nicht neutralisiert (-) und BHK-21- oder MDCK-II-Zellen infiziert.

Nach Transfektion der Glykoproteingene wurden die Zellen mit Helfervirus infiziert. Um auszuschließen, dass sich nach der Infektion noch Helfervirus im Zellkulturüberstand befand, wurden die Zellen nach der Infektion mit einem Anti-VSV-Antikörper behandelt (Abb. 17). Wie man anhand der Negativkontrolle in Abb. 18 (links) sehen kann, war dieser erste Neutralisierungsschritt erfolgreich, ebenso die Neutralisierung der Viren der Positivkontrolle am nächsten Tag (rechts). Es konnte dementsprechend keine GFP-Expression mehr nachgewiesen werden.

In Abb. 19 ist zu erkennen, dass GP64 eine Infektion vermittelte, unabhängig von dem verwendeten Expressionsvektor. Durch den Vergleich des neutralisierten (+) und nicht neutralisierten (-) Überstandes ließ sich zeigen, dass die Infektion spezifisch auf das GP64 zurückzuführen war. Insgesamt konnten mit dem synthetischen GP64 mehr infektiöse Pseudotypen hergestellt werden (Tab. 7).

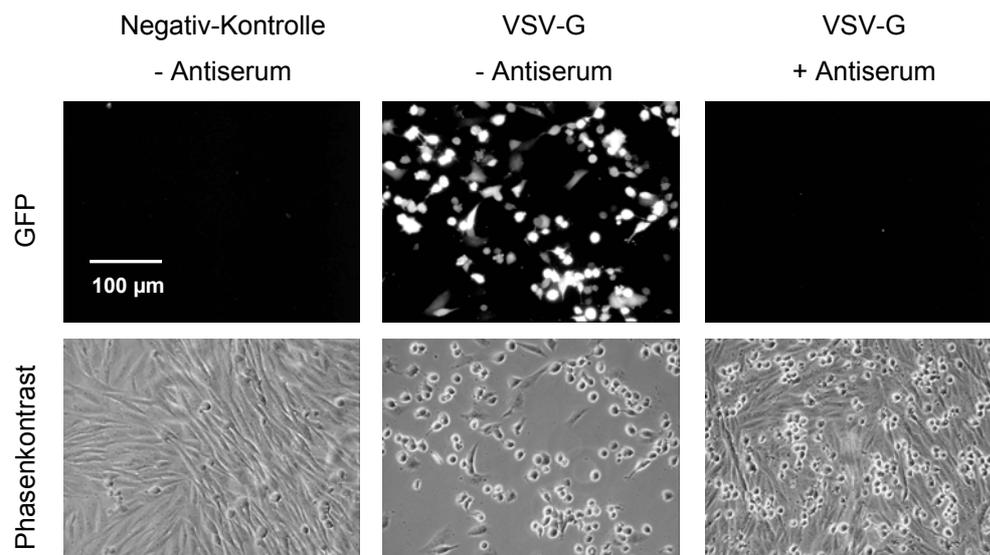


Abb. 18: Infektion von BHK-21-Zellen mit Pseudotypen (Kontrollen). Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte BHK-21-Zellen verwendet, die mit VSV*- Δ G (G) infiziert wurden. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit pCDNA3.1-VSV-G transfiziert und infiziert. Mit den virushaltigen Zellkulturüberständen wurden dann entweder direkt neue BHK-21-Zellen infiziert oder der Überstand wurde vorher noch einmal mit Antiserum behandelt (siehe dazu auch Abb. 17). Anhand der GFP-Expression wurde die Infektiösität der Pseudotypen ermittelt.

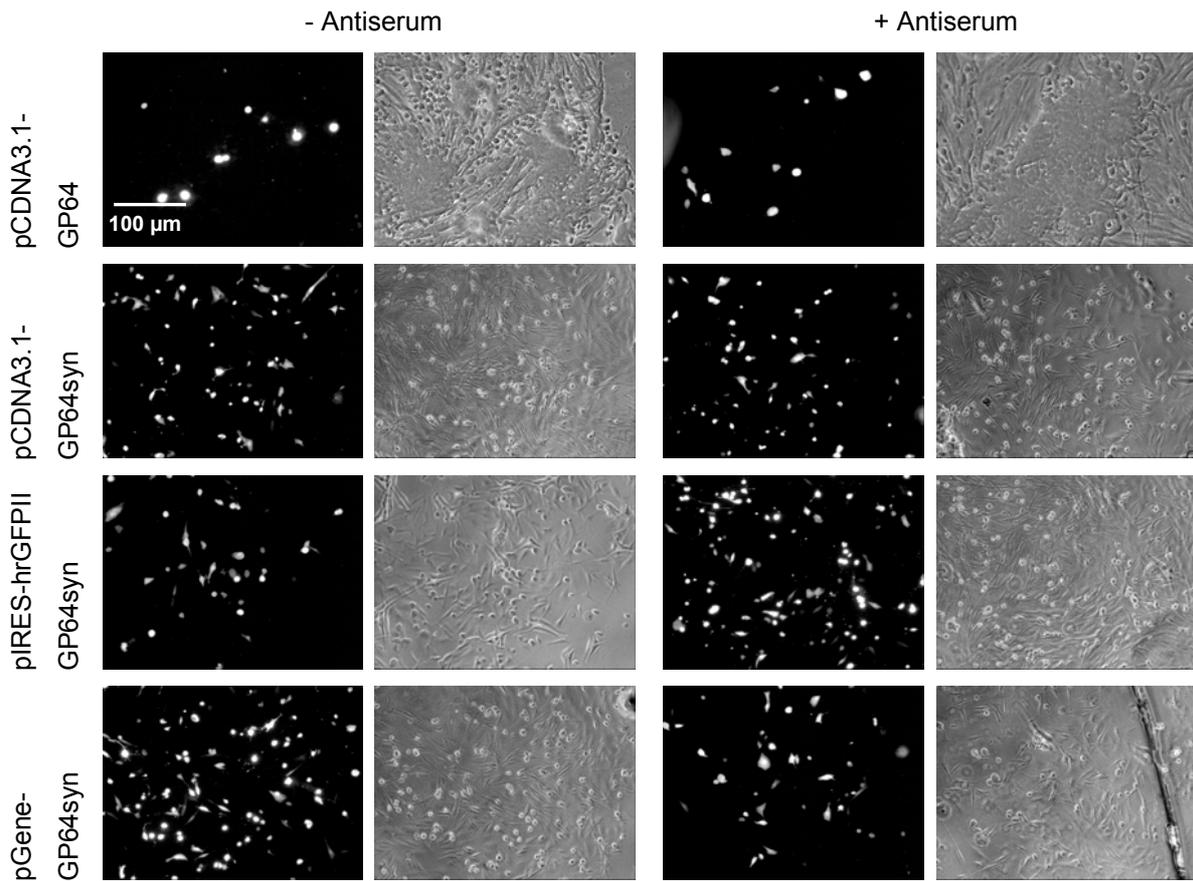


Abb. 19: Infektion von BHK-21-Zellen mit VSV*- Δ G (GP64)-Pseudotypen. Nach Transfektion von BHK-21-Zellen mit den verschiedenen GP64-Konstrukten wurden die Zellen mit VSV*- Δ G (G) infiziert und mit Antiserum behandelt. Der unverdünnte Zellkulturüberstand wurde mit VSV-Antiserum behandelt (+) oder nicht behandelt (-) und dann verwendet, um BHK-21-Zellen zu infizieren. Die Zellen wurden 24 h später fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Mit dem LCMV-GPsyn konnten ebenfalls erfolgreich VSV-Pseudotypen hergestellt werden (Abb. 20). Der Titer der generierten VSV-Pseudotypen war ähnlich hoch wie der der VSV*- Δ G (GP64syn)-Pseudotypen (Tab. 7).

Das authentische Ebola-GP vermittelte nur in geringem Maße eine Infektion, obwohl davon ausgegangen werden konnte, dass das Protein mit dem Vektor pCAGGS an der Zelloberfläche exprimiert wurde (Abb. 16). VSV-Pseudotypen, die mit der Deletionsmutante hergestellt worden waren, infizierte die Zellen effizienter und man erhielt höhere Titer als mit dem nativen Glykoprotein (Abb. 21 und Tab. 7).

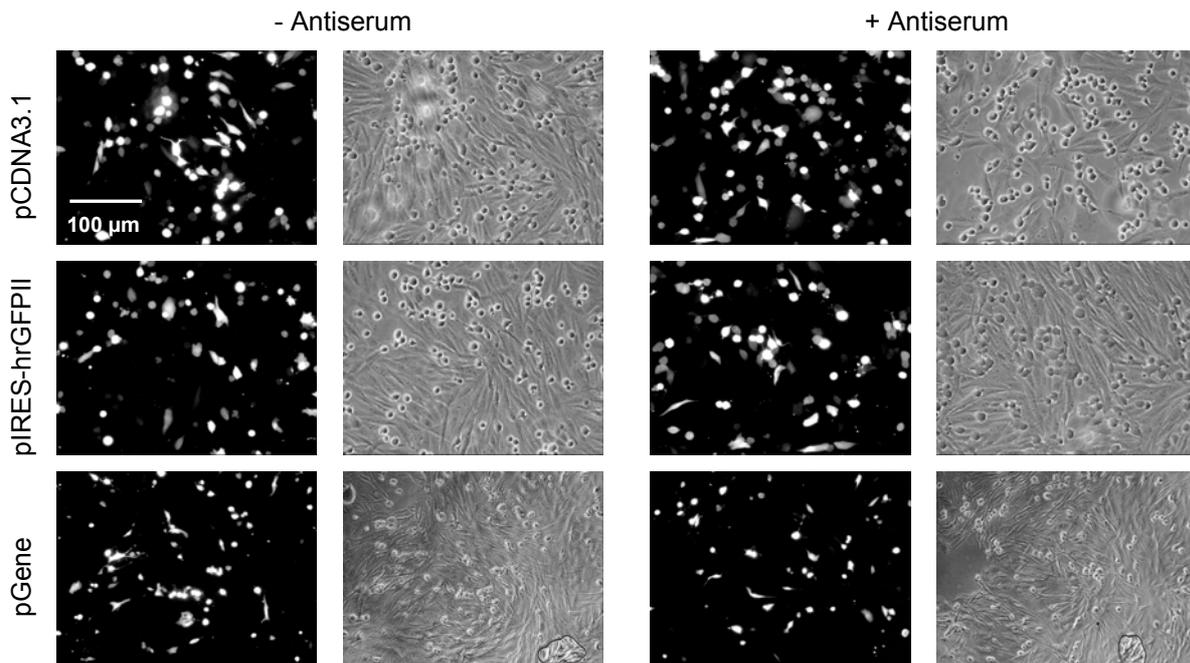


Abb. 20: Infektion von BHK-21-Zellen mit VSV*- Δ G (LCMV-GPsyn)-Pseudotypen. Nach Transfektion von BHK-21-Zellen mit den verschiedenen LCMV-GPsyn-Konstrukten wurden die Zellen mit VSV*- Δ G (G) infiziert und mit Antiserum behandelt. Mit dem unverdünnten Zellkulturüberstand (mit oder ohne Antiserum-Behandlung) wurden BHK-21-Zellen infiziert. Die Zellen wurden 24 h später fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

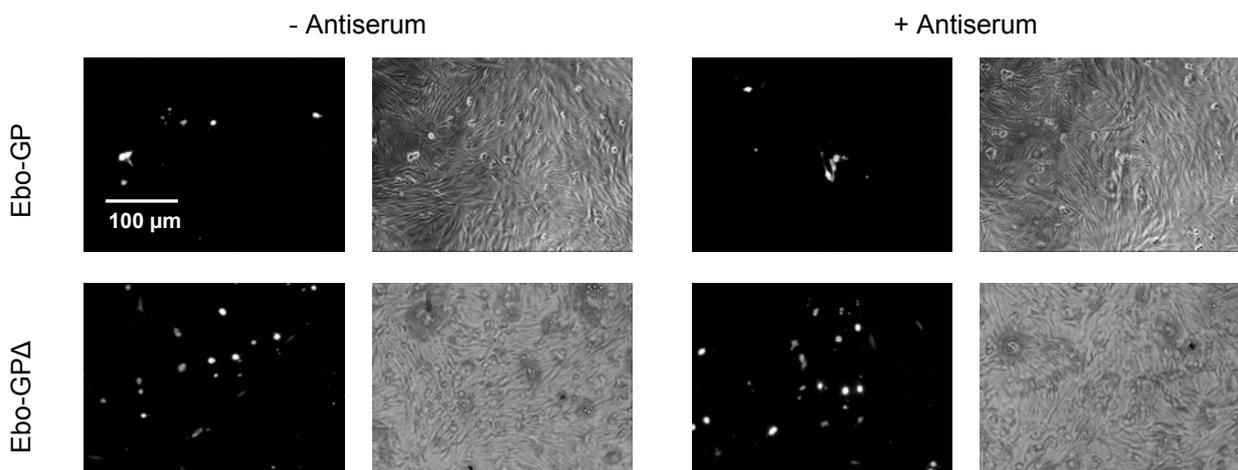


Abb. 21.: Infektion von BHK-21-Zellen mit VSV*- Δ G (Ebo-GP)-Pseudotypen. Nach Transfektion von BHK-21-Zellen mit den verschiedenen Ebo-GP-Konstrukten wurden die Zellen mit VSV*- Δ G (G) infiziert und mit Antiserum behandelt. Mit dem unverdünnten Zellkulturüberstand (mit oder ohne Antiserum-Behandlung) wurden BHK-21-Zellen infiziert. Die Zellen wurden 24 h später fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Tab. 7: Titer der VSV*- Δ G-Pseudotypen. Mit Hilfe der pCDNA3.1-Konstrukte wurden in BHK-21-Zellen VSV-Pseudotypen hergestellt. Die virushaltigen Überstände wurden verdünnt und dazu verwendet, um BHK-21-Zellen zu infizieren. Am nächsten Tag wurden anhand der GFP-Expression die Titer (Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Parallelansätzen) bestimmt.

Virus	Titer ($\log_{10} \text{ ml}^{-1}$)
VSV*- Δ G (VSV-G)	$6,2 \pm 0,5$
VSV*- Δ G (GP64)	$2,6 \pm 0,3$
VSV*- Δ G (GP64syn)	$5,0 \pm 0,5$
VSV*- Δ G (LCMV-GPsyn)	$5,3 \pm 0,3$
VSV*- Δ G (Ebo-GP)	$2,8 \pm 0,3$
VSV*- Δ G (Ebo-GP Δ)	$3,9 \pm 0,3$

4.1.2.5 Infektionsstudien an polarisierten Epithelzellen

BHK-21-Zellen sind Fibroblasten und weisen in Zellkultur einen unpolaren Charakter auf. Deshalb wurden im nächsten Experiment MDCK-II-Zellen verwendet, die auch in Zellkultur zu einer polarisierten Zellschicht wachsen. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit den mittels pCDNA-3.1-Konstrukten hergestellten Pseudotypen infiziert. Die MDCK-II-Zellen konnten mit VSV*- Δ G (G) infiziert werden (Abb. 22), obwohl VSV polarisierte Zellen nur von der basolateralen Plasmamembran infiziert (Fuller *et al.*, 1984). Dies zeigte, dass sich die Zellen auf den Deckgläsern nicht zu einer polarisierten Zellschicht entwickeln konnten.

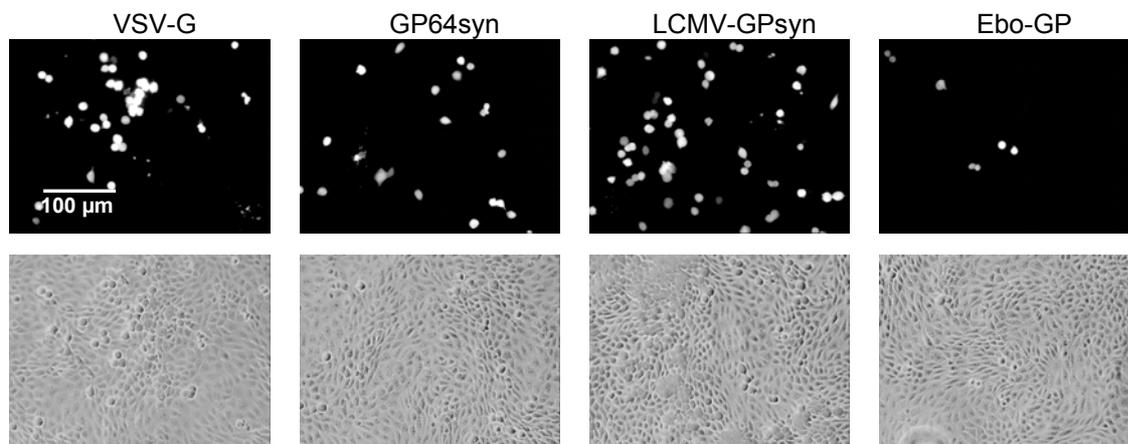


Abb. 22: Infektion von MDCK-II-Zellen mit verschiedenen VSV-Pseudotypen. Die MDCK-II-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und im konfluenten Zustand mit den unverdünnten Pseudotypen infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Daher wurde die Infektion mit auf Filtern gewachsenen MDCK-II-Zellen wiederholt (Abb. 23). Die Zellen wurden drei Tage lang auf Filtereinsätzen (Porengröße 1 μm) kultiviert und die Polarität des Zellrasens durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes überprüft. Wenn die Zellen polar waren, wurden sie von der basalen oder apikalen Seite mit den VSV-Pseudotypen infiziert (unverdünnte Überstände, Titer: s. Tab. 7). Die VSV*- ΔG (G)-Viren infizierten die Zellen bevorzugt von der basolateralen Seite. Alle Pseudotypen mit den heterologen Glykoproteinen vermittelten eine Infektion von der apikalen und basolateralen Membran, wobei das LCMV-GPsyn am effizientesten war, gefolgt von GP64syn und Ebo-GP Δ .

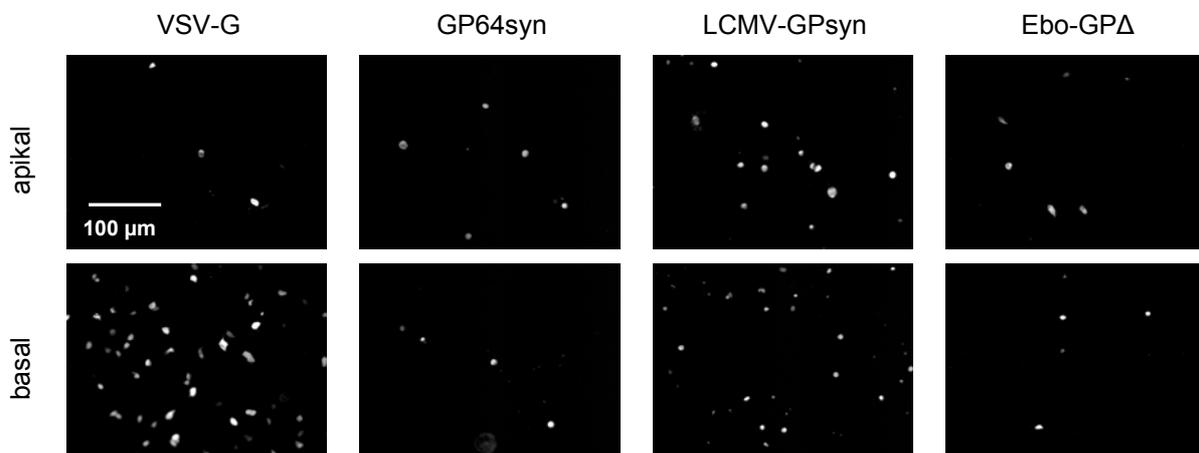


Abb. 23: Infektion von polarisierten MDCK-II-Zellen. Die Zellen wurden auf Filtersystemen ausgesät und für drei Tage bei 37°C kultiviert. Dann erfolgte eine Infektion mit den VSV-Pseudotypen (apikal oder basolateral) für ca. 6 h. Die GFP-Expression wurde 24 h später nachgewiesen.

4.2 VSV-M-Mutanten

Die Zytopathogenität von VSV beruht hauptsächlich auf dem VSV-M-Protein. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits eine VSV-Mutante hergestellt. Diese enthält mehrere Mutationen im M-Gen (M33A, M51R, T133A, V221F, S226R), welche z. T. auch in persistierenden VSV-Formen zu finden sind (Desforgues *et al.*, 2001). Für die folgenden Untersuchungen wurden replikationskompetente und –inkompetente Mutanten verwendet, die entweder das Mncp-Protein (VSV*ncp, VSV*ncp- ΔG) oder das native M-Protein (VSV*cp, VSV*cp- ΔG) enthielten (Abb. 24).

VSV*cp



VSV*cp-ΔG



VSV*ncp



VSV*ncp-ΔG



Abb. 24: Darstellung der VSV-Mutanten. Die oben gezeigten Genome enthielten das native VSV-M-Gen, die unteren das VSV-Mncp-Gen. Zudem wurden jeweils replikationsinkompetente Viren (VSV-ΔG) verwendet.

4.2.1 Charakterisierung des VSV*ncp

Zunächst wurden die Replikationskinetiken von den verschiedenen Viren (VSV*cp, VSV*cp-ΔG, VSV*ncp, VSV*ncp-ΔG) mit BHK-21-, HBE- und A549- bzw. BHK-G43-Zellen untersucht. Die Infektion erfolgte mit einer MOI = 0,05. Nach 0, 6, 12, 24 und z. T. auch 48 h wurde der Überstand geerntet und die Viren anschließend auf BHK-21-Zellen titriert (Abb. 25 und 26). VSV*cp erreichte in HBE- und A549-Zellen nach 24 h einen höheren Titer als die VSV-M-Mutante (VSV*ncp). In BHK-21-Zellen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Kinetiken der Viren festzustellen (Abb. 25). Ebenso wuchsen die replikationsinkompetenten Viren (VSV*cp-ΔG, VSV*ncp-ΔG) zu ähnlich hohen Titern auf induzierten BHK-G43-Zellen heran. Auf nicht induzierten BHK-G43-Zellen konnten sich diese Viren allerdings nicht vermehren (Abb. 26).

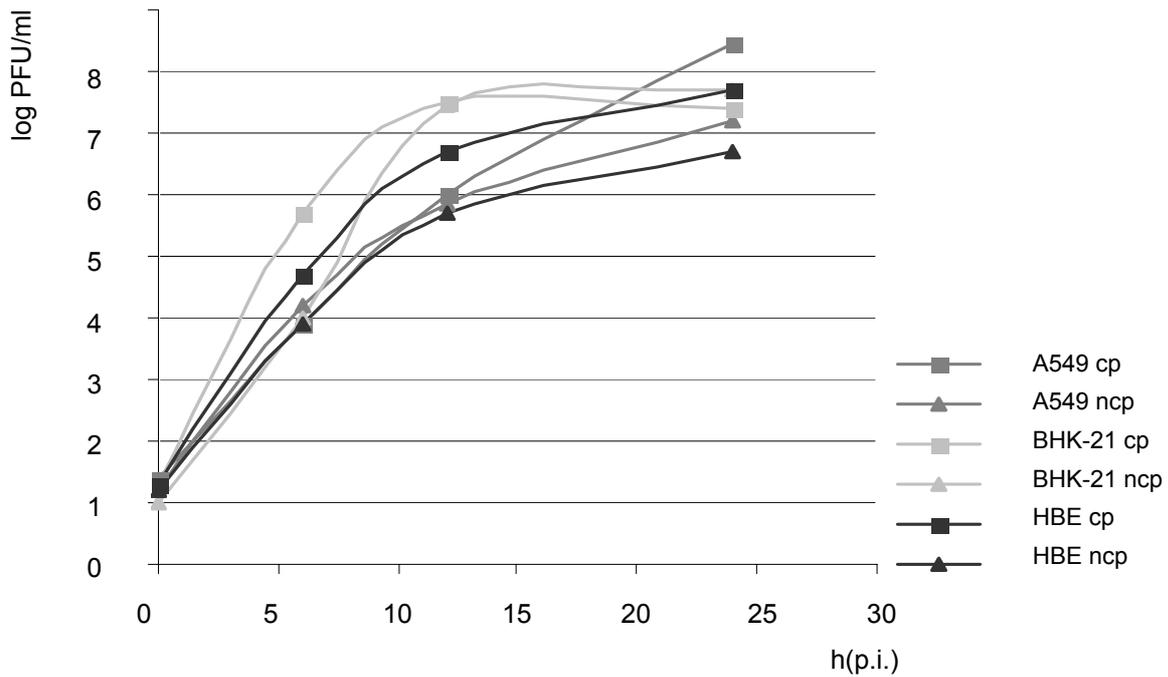


Abb. 25: Kinetik der replikationskompetenten VS-Viren. Die Zellen wurden mit einer MOI = 0.05 infiziert und die im Überstand befindlichen Viren nach verschiedenen Zeitpunkten auf BHK-21-Zellen titriert (cp = VSV*cp, ncp = VSV*ncp).

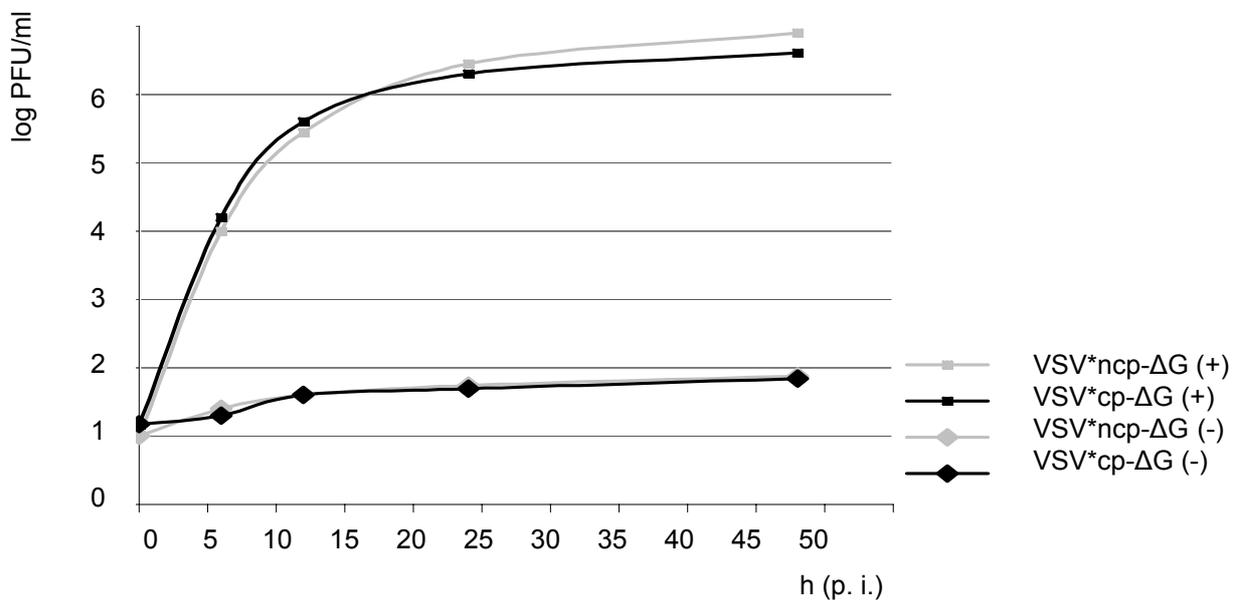


Abb. 26: Kinetik der VSV-ΔG-Viren. Nach Infektion von induzierten (+) und nicht induzierten (-) BHK-G43-Zellen (MOI = 0.05) wurden die im Überstand befindlichen Viren auf BHK-21-Zellen titriert.

Wenn Vero-Zellen mit den vier verschiedenen VS-Viren (VSV*cp, VSV*ncp, VSV*cp-ΔG und VSV*ncp-ΔG) infiziert wurden, ließen sich bereits 24 h später morphologische Veränderungen der infizierten Zellen feststellen (Abb. 27). VSV*cp bewirkte, dass sich die Zellen schnell abrundeten und viele Zellen ihre Adhärenz verloren. Dieser Effekt war nach einer Infektion mit VSV*ncp ähnlich. Die Zellen, die mit VSV*cp-ΔG infiziert wurden, rundeten sich ebenfalls ab, lösten sich aber weniger stark vom Untergrund ab. Die Zellen, die mit VSV*ncp-ΔG infiziert wurden, wiesen nur geringfügig morphologische Veränderungen nach 24 h auf.

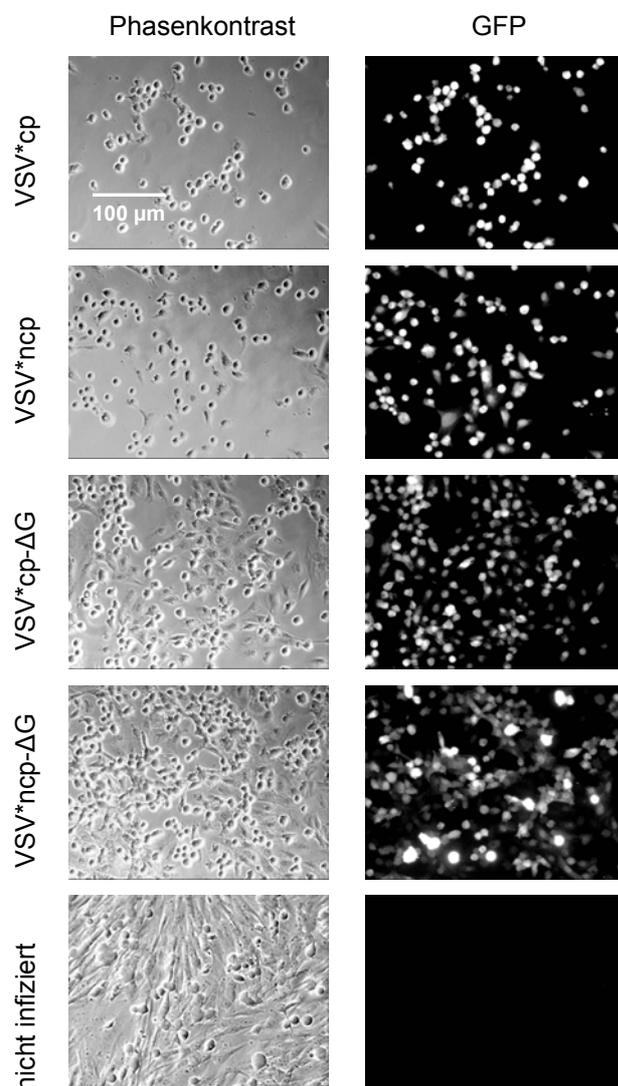


Abb. 27: Morphologische Veränderungen von Vero-Zellen nach VSV-Infektionen. Die Zellen wurden mit einer MOI = 1 (VSV*cp, VSV*ncp) oder MOI = 3 (VSV*cp-ΔG und VSV*ncp-ΔG) infiziert und nach 24 h fixiert. Infizierte Zellen waren an der GFP-Expression zu erkennen.

Da das VSV-M-Protein die zelluläre Transkription inhibiert (Black & Lyles, 1992), wurde in einem weiteren Experiment untersucht, in welchem Maße die verschiedenen VS-Viren einen sog. „Host shut off“, also die Abschaltung der zellulären Proteinexpression, induzieren. Dazu wurden BHK-21- und HBE-Zellen mit VSV infiziert (MOI = 3, 2 h) und anschließend mit dem

Plasmid pHM-LacZ transfiziert. Nach ca. 16 h wurde die Aktivität der β -Galaktosidase im Zelllysat mit Hilfe eines lumineszierenden Substrats nachgewiesen. Als Positivkontrolle dienten nicht infizierte Zellen, die mit dem Reporterplasmid transfiziert wurden. Im Gegensatz zu dieser Kontrolle führten VSV*cp und VSV*cp- Δ G zu einer deutlichen Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität (fast vollständig). VSV*ncp zeigte nur noch eine geringe und VSV*ncp- Δ G keine „Host-shut-off“-Aktivität. Es wurden mit BHK-21- und HBE-Zellen ähnliche Ergebnisse erzielt (Abb. 28).

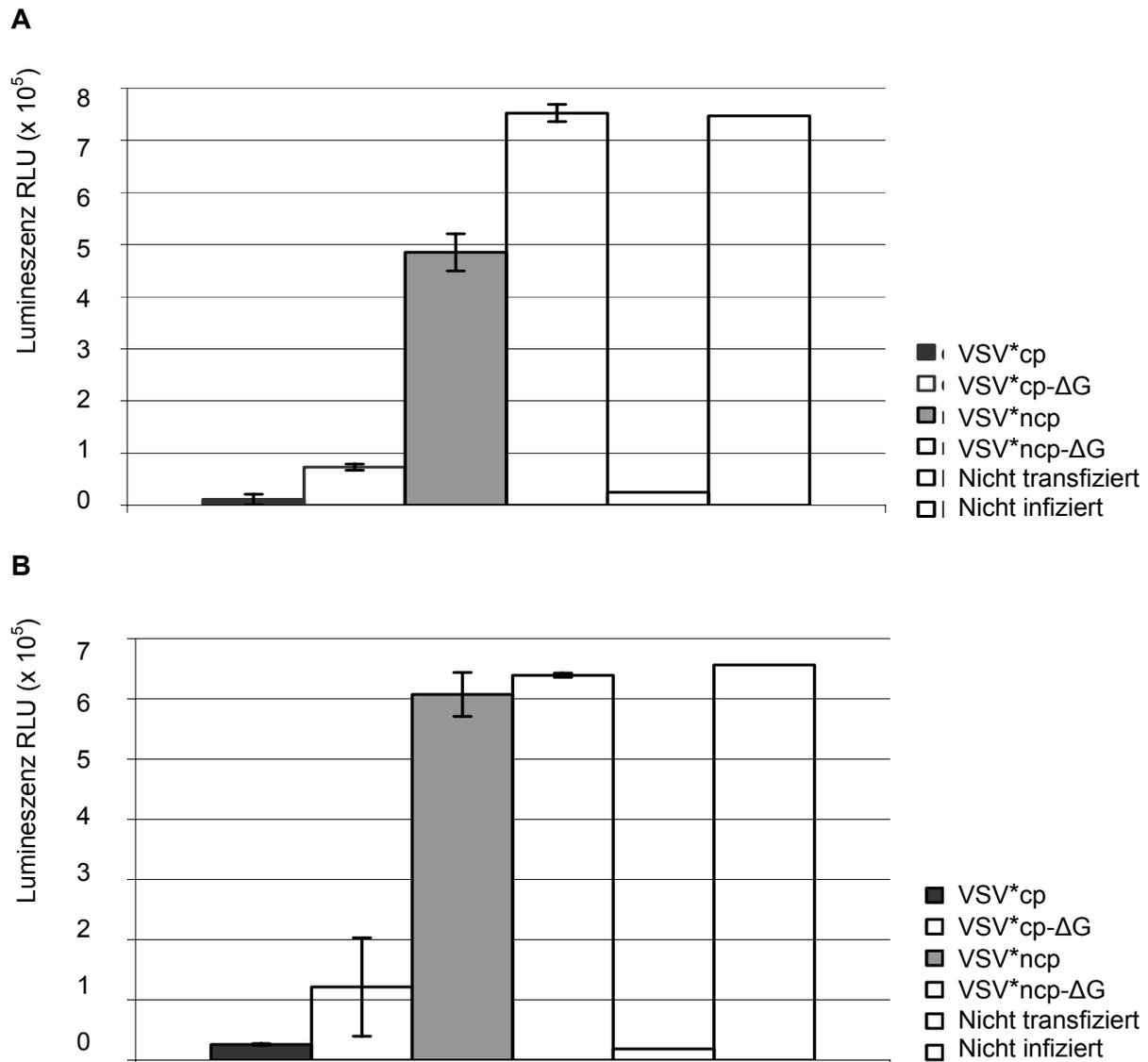


Abb. 28: Expression eines Reportergens nach Infektion von BHK-21- (A) und HBE-Zellen (B) mit VS-Viren. Die Zellen wurden zunächst infiziert und 2 h später mit pHM-LacZ transfiziert. Nach ca. 16 h wurde die β -Galaktosidase-Aktivität im Zelllysat gemessen. Mittels Durchflusszytometrie wurden die infizierten Zellen quantifiziert und die Ergebnisse der β -Galaktosidase-Expression normalisiert.

Als nächstes wurde der Interferon-Gehalt nach einer VSV-Infektion ermittelt, da beschrieben wurde, dass VSV-M die Interferonsynthese inhibiert (Ferran & Lucas-Lenard, 1997). Dazu wurde das Reporterplasmid p125-luc, welches das *Firefly*-Luziferase-Gen unter der Kontrolle eines INF- β -Promotors enthält, in HBE-, A549- und BHK-21-Zellen transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienzen wurden die Zellen zusätzlich mit einem weiteren Reporterplasmid (pSEAP2) transfiziert.

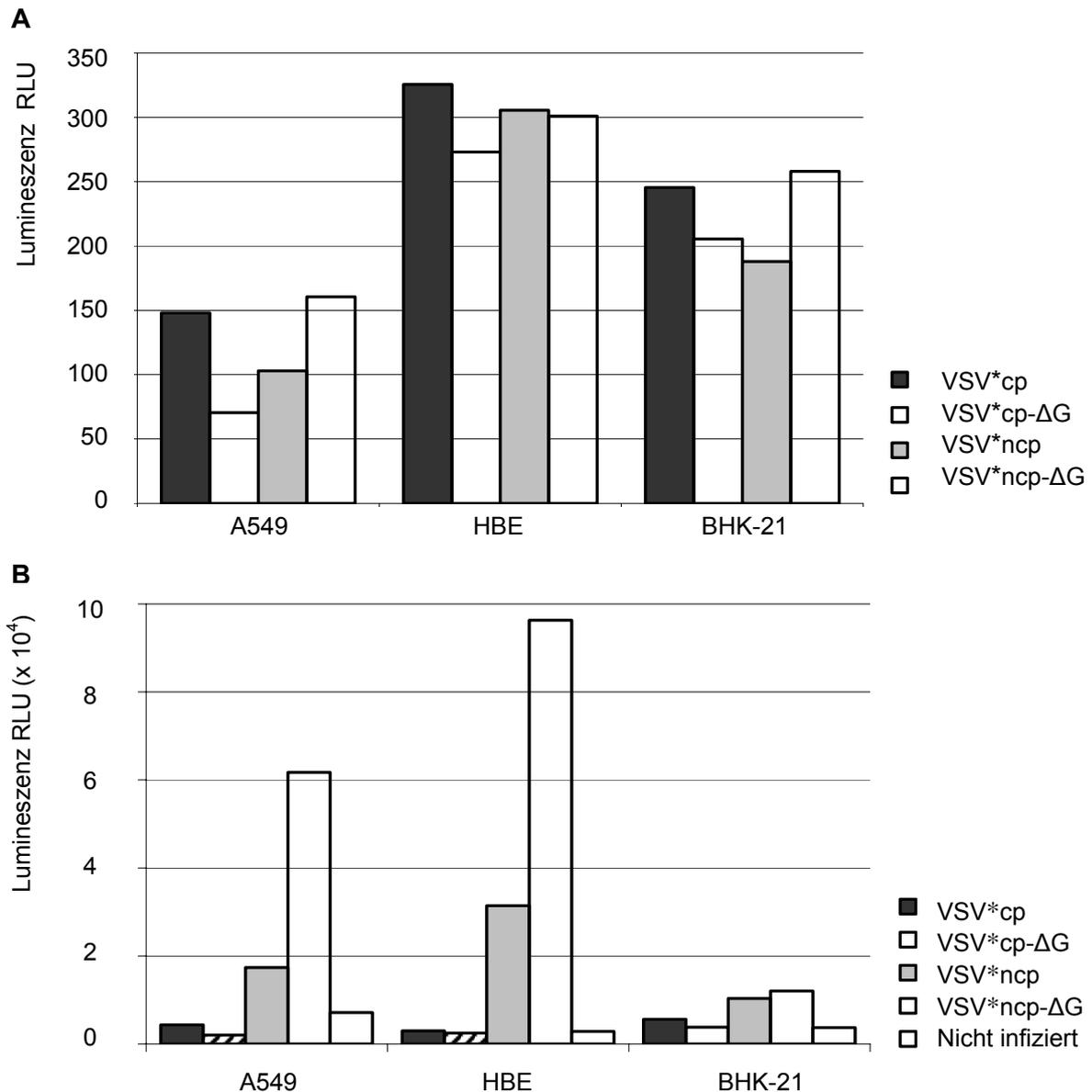


Abb. 29: Aktivierung des INF- β -Promotors in A549-, HBE- und BHK-21-Zellen nach Infektion mit verschiedenen VS-Viren. Die Zellen wurden transfiziert (p125-Luc) und am nächsten Tag infiziert. Nach ca. 16 h wurde die Luziferase-Aktivität gemessen und anhand der Transfektionskontrolle mit pSEAP (A) normalisiert (B).

Nach ca. 16 h wurden die Zellkulturüberstände auf SEAP-Aktivität überprüft und die Zellen mit den verschiedenen Viren infiziert. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 3, um sicherzustellen, dass möglichst alle Zellen infiziert wurden. Nach weiteren 16 h wurden alle Zellen pelletiert und anschließend entweder für die Durchflusszytometrie in PBS aufgenommen oder für den Interferon-Test lysiert. Die Durchflusszytometrie zeigte, dass ca. 80 – 100 % der Zellen infiziert waren. Nach Berücksichtigung der Menge der infizierten Zellen und der Transfektionseffizienzen ergaben die Messungen in A549- und HBE-Zellen, dass die Viren mit dem mutierten VSV-M-Protein den Interferon- β -Promotor stärker aktivierten als VSV*cp und VSV*cp- Δ G. Darüber hinaus induzierte VSV*ncp- Δ G mehr Promotor-Aktivität als VSV*ncp. In den BHK-21-Zellen wurde hingegen keine Aktivierung des IFN- β -Promotors nachgewiesen (Abb. 29).

Die zytotoxischen Eigenschaften des M-Proteins führen dazu, dass infizierte Zellen apoptotisch werden (Kopecky *et al.*, 2001). Ein typisches Merkmal der Apoptose ist, dass Caspasen aktiviert werden und die Zellen ihre Membranintegrität verlieren. Deshalb wurde in dem nächsten Versuchsansatz zum einen die Aktivität der Caspasen-3 und -7 in den lebenden Zellen gemessen. Zum anderen wurde die LDH (Lactat-Dehydrogenase)-Aktivität im Zellüberstand nach einer Infektion bestimmt, welche ein Maß für die Membranintegrität ist. LDH wird von Zellen freigesetzt, deren Zellmembran beschädigt ist (als Folge einer sekundären Nekrose).

Die Infektion von Vero- und BHK-21-Zellen erfolgte mit einer MOI von 1 (VSV*cp, VSV*ncp) oder 3 (VSV*cp- Δ G und VSV*ncp- Δ G). Die Aktivität der Caspasen stieg nach einer Infektion mit VSV*cp und VSV*ncp in Vero-Zellen schon nach 24 h erheblich an, wobei sie nach einer Infektion mit VSV*cp höher war. Die VSV-G-Deletionsmutanten induzierten eine deutlich geringere Caspase-3,7-Aktivität (Abb. 30A). Die Aktivität der freigesetzten LDH spiegelten diese Ergebnisse wieder, nur zeitlich versetzt. Nach 48 h war die maximale LDH-Aktivität erreicht (Abb. 30B).

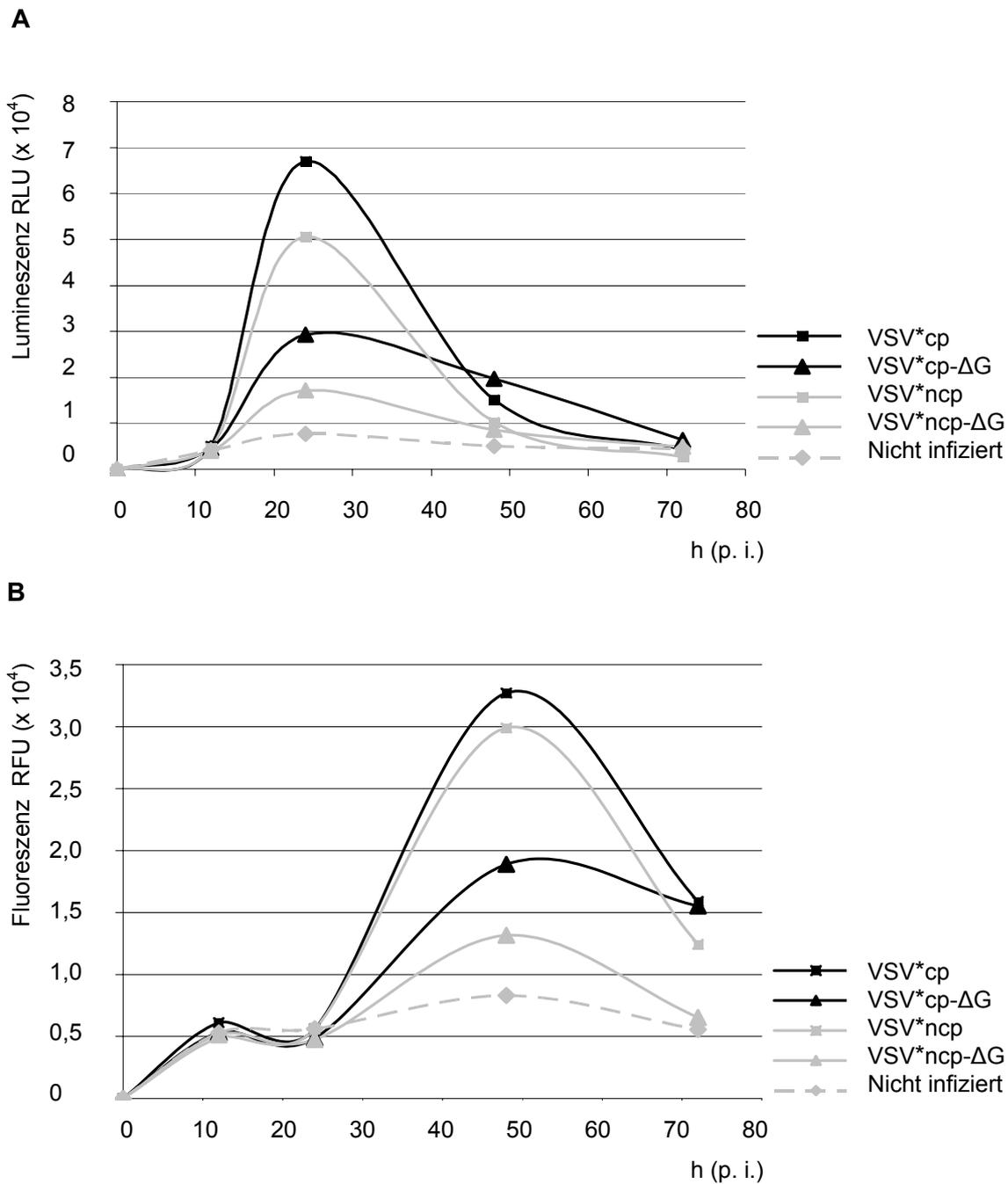


Abb. 30: Caspase-Aktivität (A) und LDH-Freisetzung (B) nach Infektion von Vero-Zellen mit VS-Viren. Die Infektion erfolgte mit einer MOI = 1 (VSV*cp, VSV*ncp) oder MOI = 3 (VSV*cp-ΔG und VSV*ncp-ΔG). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Caspase- oder LDH-Aktivität der Zellen bestimmt.

In BHK-21-Zellen riefen die Infektionen mit VSV*ncp bzw. VSV*ncp-ΔG eine höhere Caspase-Aktivität hervor als die mit VSV*cp bzw. VSV*cp-ΔG (Abb. 31A). Ähnlich verhielt es sich mit den LDH-Aktivitäten, die zwischen 48 h und 72 h den höchsten gemessenen Wert erreichten (Abb. 31B).

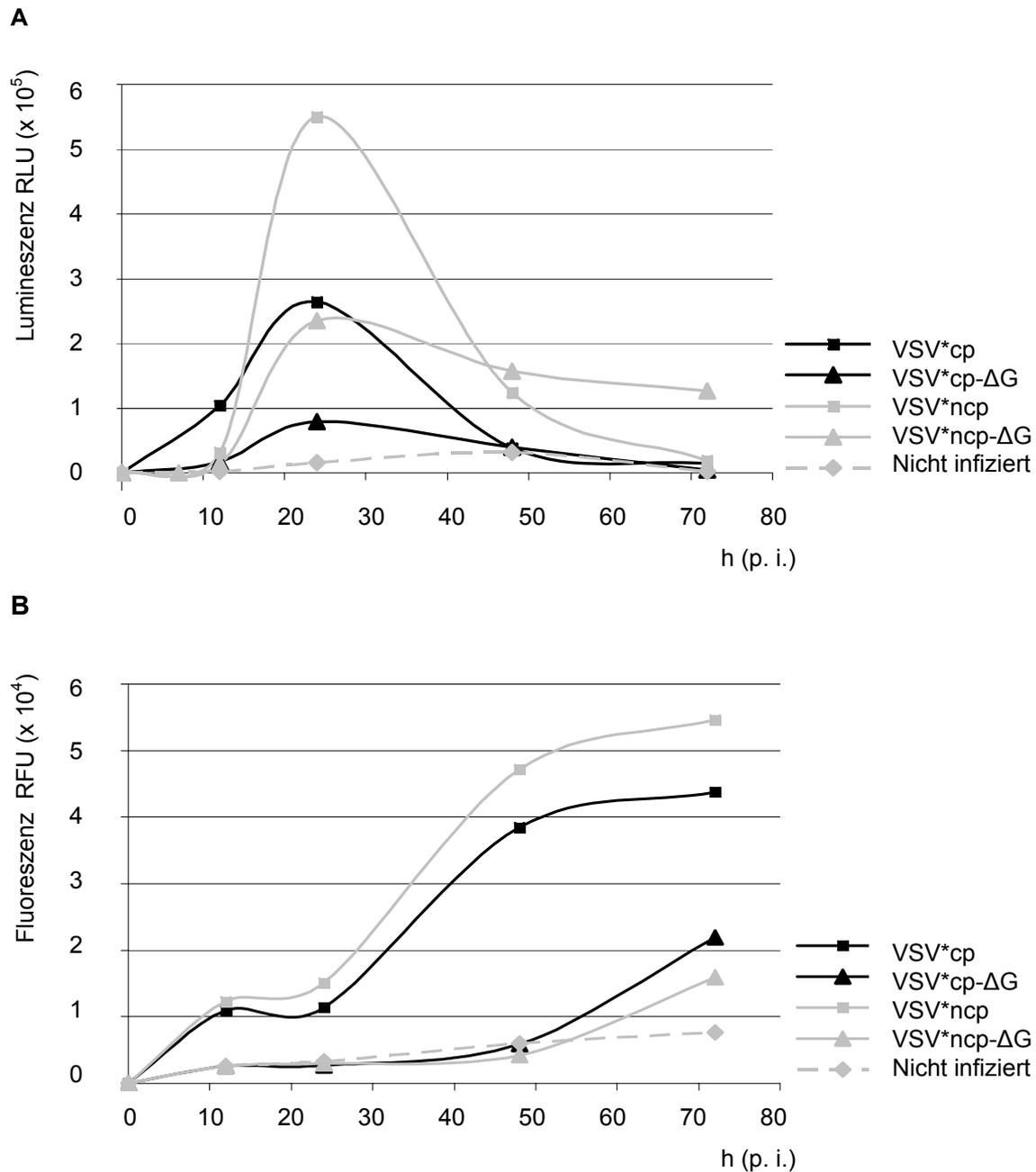


Abb. 31: Caspase-Aktivität (A) und LDH-Freisetzung (B) nach Infektion von BHK-21-Zellen mit VS-Viren. Die Infektion erfolgte mit einer MOI = 1 (VSV*cp, VSV*ncp) oder MOI = 3 (VSV*cp- Δ G und VSV*ncp- Δ G). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Caspase- oder LDH-Aktivität der Zellen bestimmt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass VSV*ncp- Δ G von allen untersuchten VS-Viren am wenigsten Apoptose induzierte und die Expression eines Reportergens am wenigsten inhibierte. Doch ist die Dauer der Expression eines Transgens ein wichtiges Kriterium in der Gentherapie. Zu diesem Zweck wurde das Virus VSV*ncp- Δ G-LacZ hergestellt (Abb. 32). Das LacZ-Gen wurde aus dem pAAV-LacZ-Vektor amplifiziert und

zunächst in dem pCDNA3.1-Vektor sequenziert, bevor es in das VSV-Genom eingefügt wurde. Das Virus wurde verwendet, um die Expressionsrate eines Reportergens in Vero- und A549-Zellen nach einer Infektion zu bestimmen. Die Zellen wurden mit einer MOI = 3 infiziert und die Aktivität der β -Galaktosidase nach verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb. 33).

VSV*ncp- Δ G-LacZ



Abb. 32: Darstellung des VSV*ncp- Δ G -Genoms mit LacZ-Kassette.

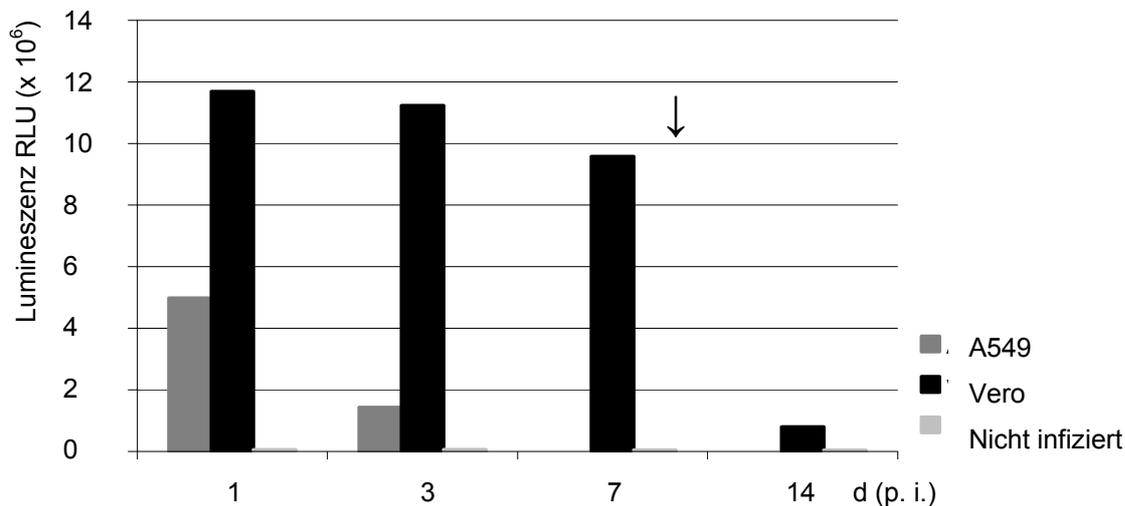


Abb. 33: Messung der β -Galaktosidase-Aktivität nach Infektion mit VSV*ncp- Δ G-LacZ. Vero- und A549-Zellen wurden infiziert (MOI = 3) und am 7. Tag p. i. umgesetzt (1:4, durch Pfeil markiert). Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert und die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

Die Expression der β -Galaktosidase nahm mit der Zeit ab, doch betrug diese in Vero-Zellen 7 Tage nach der Infektion noch ca. 78 % des Ausgangswertes. Am 7. Tag wurden die Zellen 1:4 umgesetzt. Weitere 7 Tage später (14 Tage p. i.) war die Expression ca. 1/14 des anfänglichen Expressionswertes (Abb. 33). Die Expression in A549-Zellen hingegen war schon 3 Tage nach der Infektion um mehr als ein Drittel gesunken und danach nicht mehr detektierbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass VSV*ncp- Δ G in Vero-Zellen eine anhaltende Expression gewährleistet, solange die Zellen nicht verdünnt werden.

4.2.2 Integration einer RUC-GFP-Kassette in das VSV-Genom

Zusätzlich zu den bereits erwähnten VSV-Konstrukten wurden weitere hergestellt, um später eine Infektion bei Versuchstieren *in vivo* mit Hilfe einer hochempfindlichen Kamera nachweisen zu können (Abb. 34). Das Gen RUC-GFP besteht aus zwei funktionellen Abschnitten, der eine kodiert für eine *Renilla*-Luziferase, der andere für GFP. Bei Umsetzung des Substrats Coelenterazin durch die Luziferase, wird dem GFP die entstandene Energie übertragen (Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET)) und grünes Licht (ca. 515 nm) emittiert. Es ist für diese Reaktion kein Anregungslicht notwendig.

VSVcp/ncp-RUC-GFP



Abb. 34: Darstellung der generierten VSV-Genome mit RUC-GFP-Kassette.

Die GFP-Expression wurde im Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen (Abb. 35). GFP emittierte die Lichtenergie (515 nm), die es von der Luziferase bei Umsetzung des Substrats erhielt. VSVncp zeigte hierbei noch eine höhere Aktivität als VSVcp (Abb. 36).

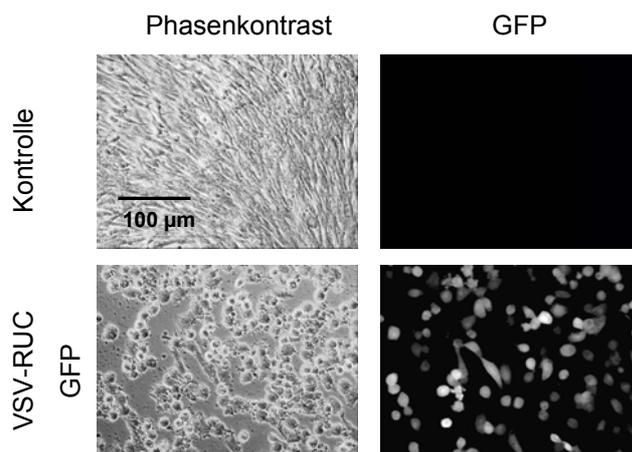


Abb. 35: GFP-Expression nach Infektion von BHK-21-Zellen mit VSVcp-RUC-GFP. Die Infektion erfolgte mit einer MOI = 1. Nach 16 h wurden die Zellen fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

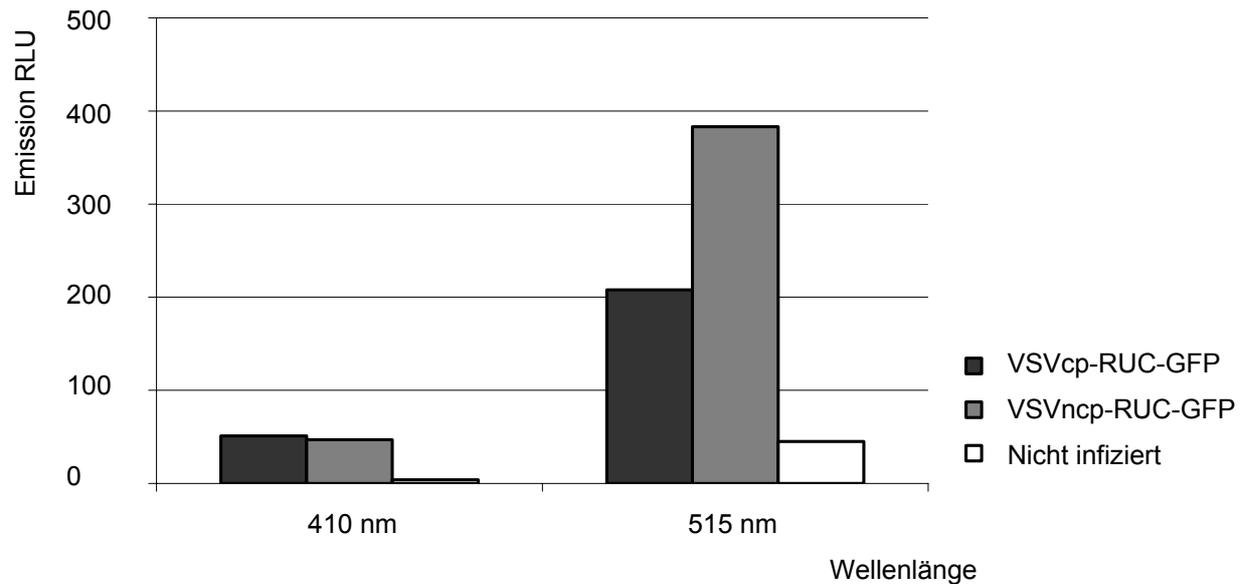


Abb. 36: Luziferase-Aktivität nach Infektion von BHK-21-Zellen mit VSV-RUC-GFP. Die Zellen wurden mit einer MOI = 1 infiziert und 16 h später auf Luziferase-Aktivität untersucht. Durch die Aktivität der *Renilla*-Luziferase erfolgte ein Energietransfer zum GFP. Die Emission bei 515 nm zeigt die Aussendung von Licht durch das GFP und die bei 410 nm die durch die *Renilla*-Luziferase.

4.2.3 VSV-Deletionsmutanten

Aus den vorherigen Untersuchungen wurde ersichtlich, dass die Mutationen im VSV-M-Protein einen Einfluss auf die Zytopathogenität des Virus hatten, ebenso wie die Deletion des VSV-G-Proteins. Die Immunogenität des VSV könnte weiter verringert werden, wenn das VSV-M-Protein zusätzlich zum VSV-G deletiert werden würde.

VSV*- Δ M



VSV*- Δ M Δ G (neo)



VSV*- Δ M Δ G (zeo)



Abb. 37: Hergestellte VSV-Deletionsmutanten. Die Genome enthalten anstelle des VSV-M- und VSV-G-Proteins ein Reporter- oder Resistenzgen.

Daher wurden die in Abb. 37 dargestellten VSV-Antigenome hergestellt. Diese enthalten anstelle der deletierten Gene eine GFP- und eine Resistenzkassette (Neomycin- bzw. Zeocin-Resistenzgen).

Um die Deletionsmutanten später vermehren zu können, sollte eine Zelllinie hergestellt werden, die das Msyn-Protein und das G-Protein von VSV exprimiert. Die Verwendung von nicht induzierbaren Systemen (z. B. mit dem Plasmid pIRES-hrGFPII) führte nicht zum Ziel, entweder starben alle Zellen während der Selektion oder sie exprimierten mit zunehmender Passagenzahl das gewünschte Protein nicht mehr. Deshalb wurde auf ein induzierbares System zurückgegriffen. So gelang es, mit dem Vektor pGeneC-M-IRES-G eine stabile CHO-Zelllinie herzustellen. Dieses Konstrukt ermöglicht die Expression von zwei Genen (Msyn, G) unter der Kontrolle eines Promotors. Es enthält eine IRES (*internal ribosome entry site*)-Sequenz zwischen den beiden Genen, welche dafür sorgt, dass der hintere Leseraster von den Ribosomen erkannt wird und die zwei Gene von der gleichen mRNA exprimiert werden.

Es wurden CHO-E6-Zellen mit dem Konstrukt pGeneC-M-IRES-G und pSwitch transfiziert und anschließend mit Hygromycin und Zeocin selektioniert. Zur Anreicherung positiver Zellklone wurden magnetische Partikel verwendet. Die Expression der Proteine wurde mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot überprüft (Abb. 38 und 39).

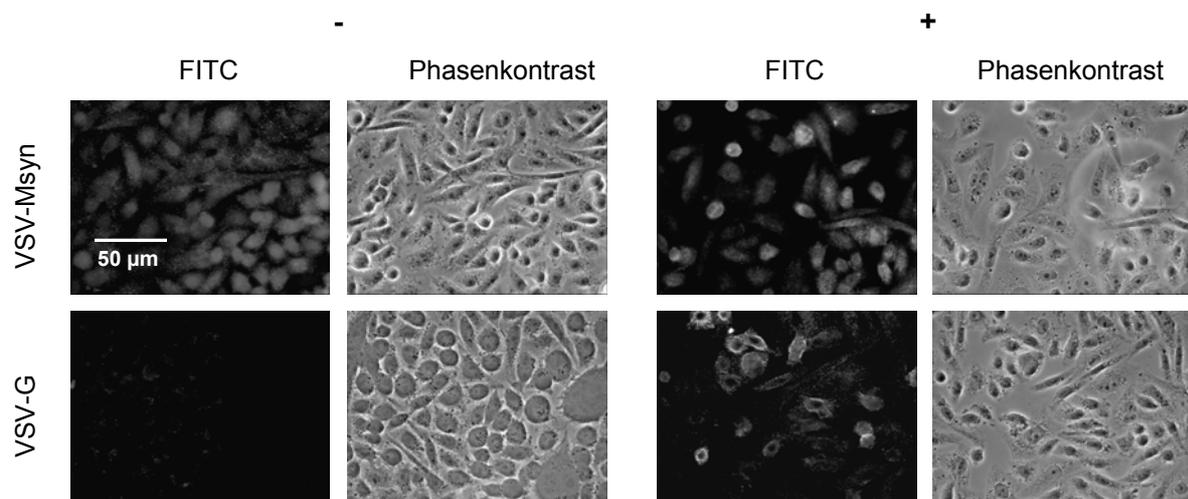


Abb. 38: Immunfluoreszenz zum Nachweis der induzierbaren, stabilen Expression von VSV-Msyn und -G in CHO-E6-Zellen. Die Zellen wurden nicht induziert (-) oder induziert (+) und am nächsten Tag fixiert und im Falle von VSV-M permeabilisiert. Der Immunfluoreszenztest wurde mit Anti-VSV-M bzw. Anti-VSV-G durchgeführt.

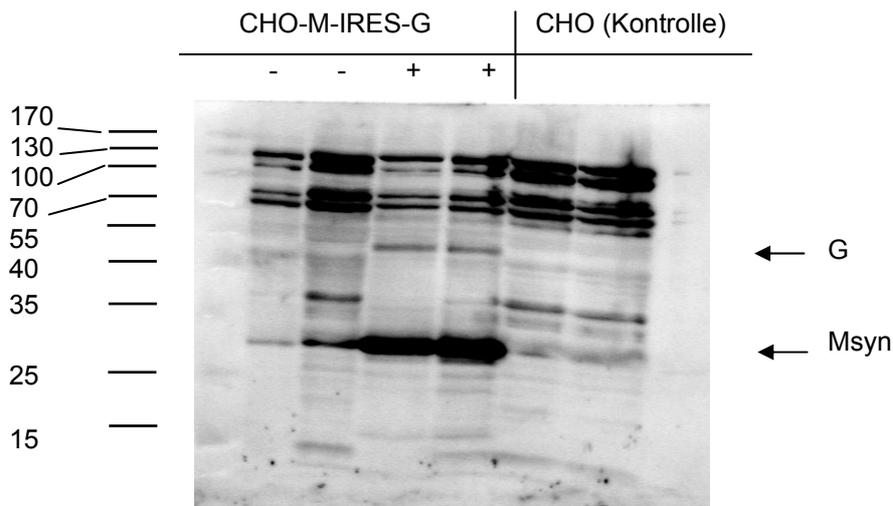


Abb. 39: Nachweis der Msyn- und G-Protein-Expression in der stabilen Zelllinie CHO-M-IRES-G mittels Western-Blot. Die Zellen wurden nicht induziert (-) oder induziert (+). Als Kontrolle dienten nicht veränderte CHO-Zellen. Nach 24 h wurden die Zelllysate auf ein SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose erfolgte eine Inkubation mit Anti-VSV-Serum, Anti-Kaninchen-Biotinkonjugat und Streptavidin-Peroxidase.

Anschließend wurden die Zellen noch einmal rekloniert, so dass nahezu alle Zellen die Proteine exprimierten. Obwohl die Gene unter der Kontrolle eines Promotors standen, war die Expression des VSV-Msyn stärker als die des VSV-G. Zudem konnten im Überstand von induzierten CHO-M-IRES-G-Zellen die Proteine VSV-G und VSV-M nachgewiesen werden (Abb. 40).

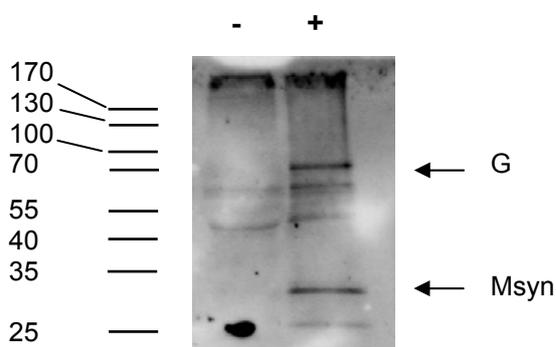


Abb. 40: Nachweis der VSV-Proteine im Überstand von CHO-M-IRES-G-Zellen. Nachdem die Zellen für 48 h Stunden induziert (+) oder nicht induziert (-) worden waren, wurde der Überstand über ein Saccharose-Kissen aufgereinigt und mittels SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der VSV-Proteine erfolgte mit Anti-VSV-Serum, Anti-Kaninchen-Biotinkonjugat und Streptavidin-Peroxidase.

4.3 Vorversuche zur Verwendung eines therapeutischen Gens im VSV-Vektor

4.3.1 Replikationsverhalten des VSV*ncp-ΔG-LacZ

Das LacZ-Gen, welches von VSV*ncp-ΔG-LacZ exprimiert wird, ist ca. 3,3 kb groß (Abb. 32). Um festzustellen, inwieweit sich das Einfügen eines größeren Gens auf die Replikation und Interferon-Ausschüttung auswirken würde, wurde dieses Virus für die folgenden Experimente verwendet. Zunächst wurde die Expression des LacZ-Gens mit Hilfe eines histologischen β -Galaktosidase-Substrates in infizierten BHK-G43-Zellen nachgewiesen (Abb. 41) und die virushaltigen Überstände auf neuen induzierten BHK-G43-Zellen vermehrt. Um die Auswirkungen des LacZ-Gens im VSV-Genom näher zu charakterisieren, wurde die Replikationskinetik des Virus untersucht (Abb. 42).

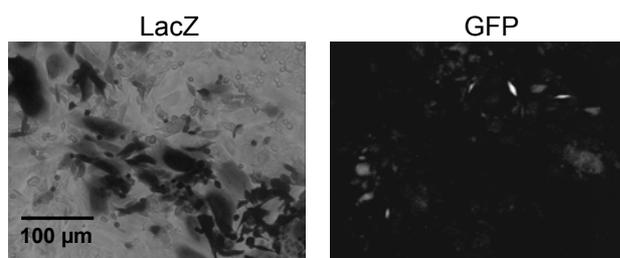


Abb. 41: Infektion von induzierten BHK-G43-Zellen mit VSV*ncp-ΔG-LacZ (1 Pfu / 4×10^4 Zellen). Die Expression des LacZ-Gens wurde durch Färbung mit einem β -Galaktosidase-Substrat nachgewiesen (links). Die GFP-Fluoreszenz derselben Zellen interferierte mit dem Farbniederschlag (rechts).

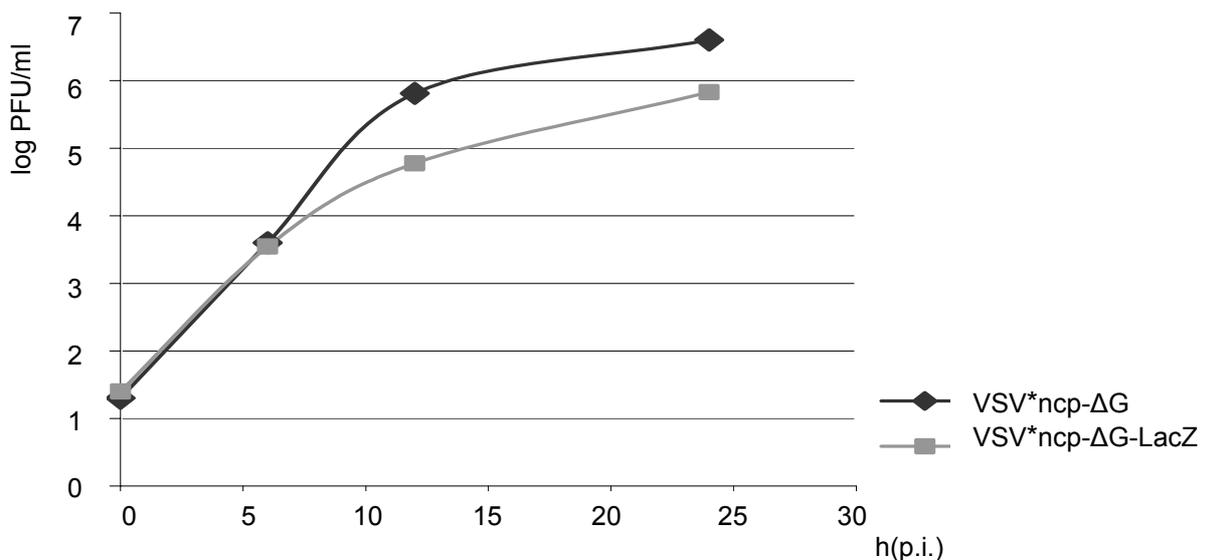


Abb. 42: Replikation des VSV*ncp-ΔG-LacZ und des VSV*ncp-ΔG. Die Infektion von induzierten BHK-G43-Zellen erfolgte mit einer MOI=0,05. Nach 0, 6, 12 und 24 h wurden die Überstände geerntet und die Viren titriert.

VSV*ncp- Δ G-LacZ replizierte innerhalb von 24 h zu einem ca. 10-fach geringeren Titer als VSV*ncp- Δ G. Hinsichtlich der Interferon-Induktion zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Viren (Abb. 43).

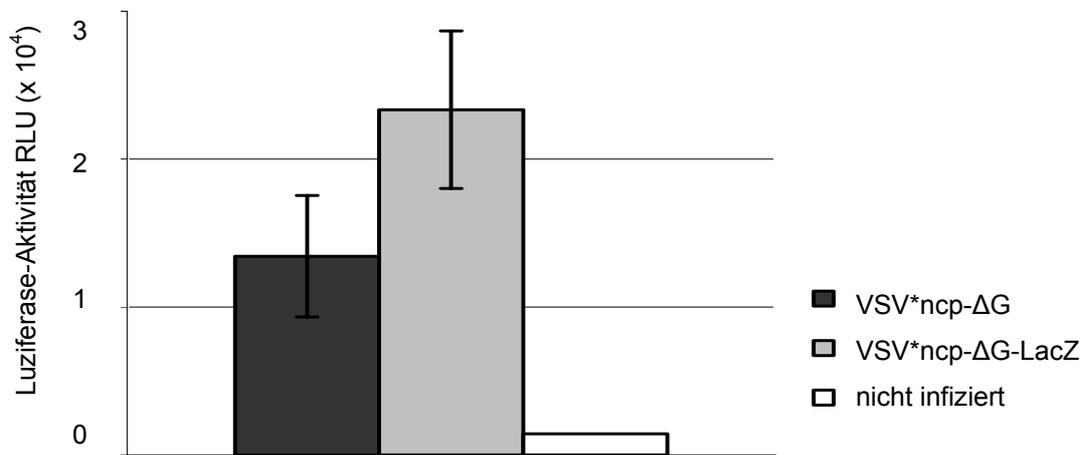


Abb. 43: Aktivierung des Interferon- β -Promotors nach Infektion von HBE-Zellen mit VSV*ncp- Δ G-LacZ und VSV*ncp- Δ G. Die Zellen wurden mit p125-Luc transfiziert und direkt danach infiziert (MOI = 3). Nach ca. 16 h wurde die Luziferase-Aktivität gemessen.

4.3.2 Klonierung des mCFTR-Gens

In Vorarbeiten wurde bereits das murine CFTR-Gen, welches ca. 4,4 kb groß ist, fragmentweise in den Vektor pCR2.1 kloniert (Abb. 44).

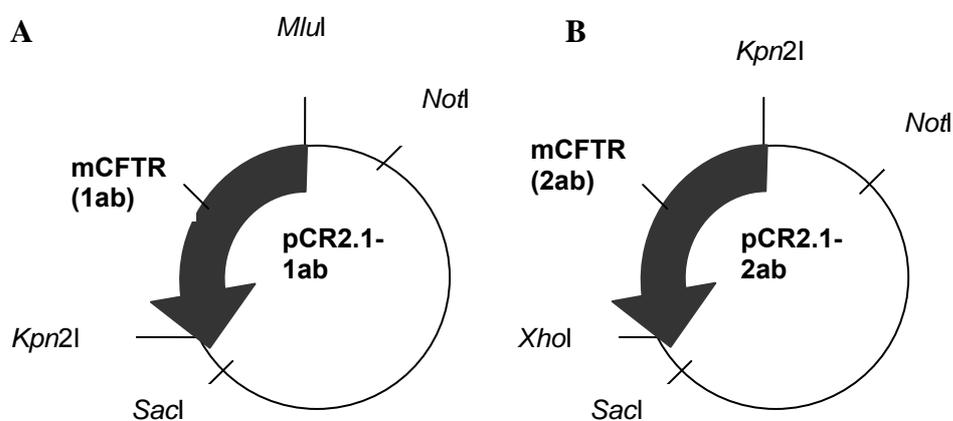


Abb. 44: Sequenzabschnitte des mCFTR-Gens im Plasmid pCR2.1. Die beiden Fragmente (links 1ab und rechts 2ab) des CFTR-Gens wurden über *SacI* und *NotI* in den Vektor pCR2.1 kloniert.

In der vorliegenden Arbeit konnte von diesen Konstrukten ausgehend das CFTR-Gen zu einem Ganzen zusammengefügt werden. Die beiden Sequenzabschnitte 1ab und 2ab wurden durch Restriktion und anschließender Ligation in dem Vektor pCR2.1 zusammengefügt, so dass der Abschnitt 1ab vor den Abschnitt 2ab positioniert wurde. Eine Sequenzanalyse mit mehreren Primern (Abb. 45) ergab, dass der Vektor pCR2.1 den vollständig kodierenden Bereich des mCFTR-Gens enthielt.

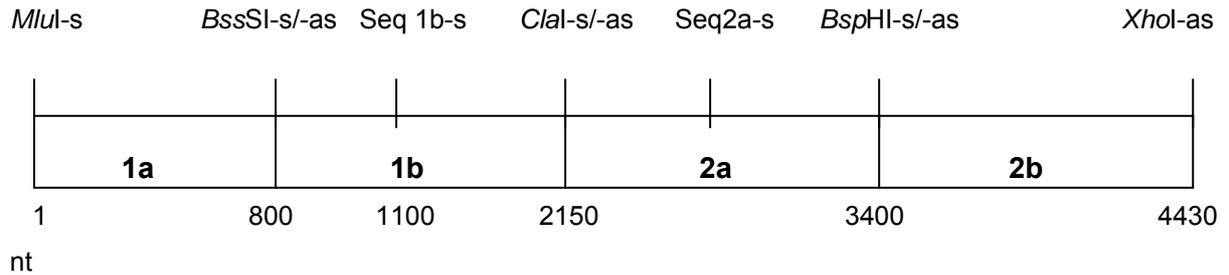


Abb. 45: Bindungsstellen der Sequenzierprimer zur Analyse der mCFTR-Sequenz. Anhand der eingezeichneten Primer konnte die Sequenz des ca. 4,4 kb großen CFTR-Gens vollständig überprüft werden. Zur Orientierung sind die ungefähren Nucleotidpositionen (nt, kursiv) angegeben.

5. Diskussion

Die Behandlung verschiedenster Krankheiten mittels Gentherapie hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dabei werden häufig virale Vektoren verwendet, die je nach Krankheitsbild verschiedene Anforderungen erfüllen müssen. Für die Therapie von Lungenerkrankungen wie der Cystischen Fibrose sollen diese Vektoren z. B. möglichst effizient das Lungenepithel infizieren und müssen somit die atemwegsspezifischen Barrieren (Mucus, ziliärer Transport, *tight junctions*) überwinden (Pickles, 2004). Diese Vektoren basieren bisher hauptsächlich auf Lentiviren, Adenoviren oder adeno-assoziierten Viren. Doch sind die Probleme, wie ineffizienter Gentransfer, kurze Expressionsdauer des therapeutischen Gens oder die schnelle Elimination des Vektors durch das Immunsystem, bisher nicht zufriedenstellend gelöst worden (Doring *et al.*, 2007; Griesenbach *et al.*, 2006).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) für die Entwicklung eines gentherapeutischen Vektors zu optimieren. In bisherigen Studien wurde VSV als onkolytischer Vektor zur Krebstherapie (Cesaire *et al.*, 2006; Barber, 2005; Wollmann *et al.*, 2005; Ebert *et al.*, 2005) oder als Vektor-Impfstoff, z. B. gegen Hepatitis-C- oder Influenza-Viren (Majid *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2007) verwendet.

VSV besitzt einige vorteilhafte Eigenschaften für die Generierung eines therapeutischen Vektors, wie z. B. die einfache Genomstruktur, die Replikation im Zytoplasma, die hohen Virus-Titer und die sehr geringe Pathogenität für den Menschen. Nachteile des Vektors sind die vorwiegend basolaterale Infektion von polarisierten Epithelzellen oder die ausgeprägte Zytopathogenität des Virus, die v. a. auf die Aktivitäten des M-Proteins zurückzuführen ist. Diese für eine Gentherapie bei Atemwegserkrankungen ungünstigen Eigenschaften sollten zum einen durch eine Pseudotypisierung des Vektors und zum anderen durch Mutationen des M-Proteins beseitigt werden.

5.1 VSV-Pseudotypen

5.1.1 Das HEF-Protein des Influenza-C-Virus

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass das HEF-Protein des Influenza-C-Virus in VSV-Pseudotypen eine apikale Infektion polarisierter Epithelzellen vermitteln kann (Hanika *et al.*, 2005). Die Eigenschaften des Proteins sollten weiter modifiziert und verbessert werden, so dass z. B. eine Vermehrung der VSV-Pseudotypen auf einer Helferzelllinie oder die

Aktivierung ohne Trypsin in Zellkultur möglich ist. Dazu wurden drei Mutanten (S71C, C652S und Furin-Mutante) angefertigt. Da der Transport des HEF-Proteins zur Zellmembran schon durch wenige Mutationen beeinträchtigt sein kann (Szepanski *et al.*, 1994; Oeffner *et al.*, 1999; Hanika *et al.*, 2005), wurde zunächst die Oberflächenexpression in BHK-21-Zellen mittels Immunfluoreszenztest und Durchflusszytometrie untersucht. Alle Mutanten wurden an der Zelloberfläche nachgewiesen, es wurden aber Unterschiede festgestellt. Das native HEF-Protein wurde am besten an die Oberfläche transportiert, gefolgt von der Furin-Mutante und der Esterase-Mutante S71C. Die C652S-Mutante wurde an der Oberfläche nur sehr schwach exprimiert. Diese Mutante wird an der Aminosäure 652 nicht mehr acyliert (Veit *et al.*, 1996). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass mit Hilfe eines SV-40-Expressionssystems in CV-1-Zellen die Mutante ähnlich gut wie das native HEF-Protein exprimiert wurde (Veit *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch andere Zellen und Vektoren verwendet, so dass hierin die unterschiedlichen Ergebnisse begründet sein können.

Alle HEF-Konstrukte wurden in ungespaltener Form zur Oberfläche transportiert, wenn kein Trypsin zum Zellkulturmedium gegeben wurde. Dies traf auch für die Mutante zu, deren Spaltstelle in eine Furin-Spaltstelle (KRKRR) umgewandelt worden war. Furin ist eine ubiquitär vorkommende Protease des *trans-Golgi*-Netzwerkes. Es ist aber denkbar, dass durch die Mutation das Protein anders gefaltet wurde und für das Enzym nicht zugänglich war. Mit der Furin-Mutante konnten auch keine infektiösen VSV-Partikel erzeugt werden, da die Spaltung des HEF-Proteins für die Infektion essentiell ist (Herrler *et al.*, 1979). Die Esterase-Mutante vermittelte eine sehr geringe Infektion von MDCK-I-Zellen. Dies könnte mit einer gestörten Konformation des Proteins zusammenhängen. Serin (71) ist Teil des katalytischen Zentrums und geht mit anderen Gruppen des Proteins Wechselwirkungen ein (Rosenthal *et al.*, 1998). Von Pleschka *et al.* (1995) wurde beschrieben, dass eine Esterase-Mutante mit dem Aminosäureaustausch S71A um 90% weniger Esterase-Aktivität besaß als das native HEF-Protein. Wenn die Esterase-Funktion intakter Viren mit DFP (Diisopropylfluorophosphat) inhibiert wurde, so führte dies zu einer erheblichen Reduzierung der Infektiosität (Strobl & Vlasak, 1993). Die geringe Infektiosität der HEF (S71C)-Pseudotypen könnte also auch daran liegen, dass die Esterase nicht nur für die Freisetzung der Viren, sondern auch für den Zelleintritt wichtig ist. Ähnliche Beobachtungen wurden beim Influenza-A-Virus mit der Neuraminidase gemacht (Mastrosovich *et al.*, 2004). Die C652S-Mutante hingegen vermittelte eine ähnlich effiziente Infektion von MDCK-I-Zellen wie das native HEF-Protein, obwohl sie mit geringerer Effizienz an die Oberfläche transportiert wurde. Somit ist die absolute Proteinmenge an der Oberfläche nicht alleine entscheidend. Die fehlende Acylierung scheint hier keinen Einfluss auf die Infektiosität des Virus zu haben.

Bei Influenza-A-Viren hingegen hat der Acylierungszustand des HA-Proteins einen Einfluss auf die Assoziation des Proteins mit sog. *Lipid rafts*, das sind cholesterinreiche Mikrodomänen in der Membran (Takeda *et al.*, 2003). Wagner *et al.* (2005) beschrieben, dass HA-Acylierungsmutanten weniger stabil mit *Lipid rafts* assoziiert waren und die Infektiosität des Virus herabgesetzt war.

5.1.2 Untersuchung weiterer Glykoproteine

Für die VSV-Pseudotypisierung wurden neben dem HEF-Protein des Influenza-C-Virus noch drei weitere Glykoproteine ausgewählt: das GP64 des Baculovirus *Autographa californica multicaudata nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), das Glykoprotein des Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) und das Glykoprotein des Ebola-Zaire-Virus. Es ist bekannt, dass GP64 von Viren, wie z. B. HRSV oder Lentiviren, in ihren Hülle inkorporiert wird (Oomens & Wertz, 2004; Sinn *et al.*, 2005). Sinn *et al.* (2005) zeigten weiter, dass die Pseudotypisierung von FIV mit GP64 dazu führte, dass das respiratorische Epithel von der apikalen Membran infiziert wurde. Eine Pseudotypisierung von Lenti- und VS-Viren mit dem LCMV-GP wurde bereits beschrieben (Stein *et al.*, 2005; Bruns & Lehmann-Grube, 1984), doch wurde die Infektion von polarisierten Epithelzellen bisher nicht untersucht. Es konnte aber gezeigt werden, dass LCMV in MDCK-Zellen repliziert (Jacobson *et al.*, 1979). Auch das dritte ausgewählte Glykoprotein, das Ebo-GP, konnte in die Hülle von VSV und Lentiviren integriert werden (Garbutt *et al.*, 2004; Sandrin *et al.*, 2002). Dies führte bei den Lentiviren dazu, dass das Virus polarisiertes Epithel von der apikalen Seite infizierte (Sinn *et al.*, 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, festzustellen, ob diese Glykoproteine für die Pseudotypisierung von VSV geeignet sein würden, und ob diese eine apikale Infektion der Pseudotypen vermitteln würden. Da der Knospungsprozess neuer VSV-Partikel an der Plasmamembran stattfindet (Das *et al.*, 2006), ist die Expression der fremden Glykoproteine an der Zelloberfläche wichtig. Deshalb wurde die Expression der verschiedenen Proteine in BHK-21-Zellen untersucht. Die Expression des nativen GP64 konnte mit den kommerziellen Antikörpern (AcV1 und AcV5) im Immunfluoreszenztest nicht nachgewiesen werden. Doch durch die Klonierung des GP64 in einen Expressionsvektor mit einem *Flag*-Epitop gelang ohne weiteres der Nachweis des Proteins im Immunfluoreszenztest mit Hilfe eines Anti-*Flag*-Antikörpers. Mittels Oberflächenbiotinylierung und Western-Blot konnte das GP64-Protein mit dem Antikörper AcV5 detektiert werden. Die Expression des GP64 war bei 37 °C besser als bei 33 °C. Oomens & Wertz (2004) hatten hingegen mittels HEp-2-Zellen festgestellt,

dass die Oberflächenexpression des GP64 bei niedrigerer Temperatur effizienter war. In der vorliegenden Arbeit wurde auch ein synthetisches GP64-Gen verwendet, welches an die Codon-Verwendung in Säugerzellen angepasst ist. Das Protein konnte im Immunfluoreszenztest mit dem Antikörper AcV1 und im Western-Blot nachgewiesen werden. GP64syn zeigte dort - abhängig vom verwendeten Vektor - eine stärkere Oberflächenexpression als das native GP64. Das LCMV-GPsyn (codonoptimiert) und das Ebo-GP (nicht codonoptimiert) konnten mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern im Immunfluoreszenztest an der Oberfläche nachgewiesen werden. Beim Ebo-GP war kein signifikanter Unterschied zwischen dem nativen Protein und der Deletionsmutante zu erkennen, obwohl dieser Mutante fast 200 Aminosäuren fehlten. Dieser Bereich stellt eine muzinähnliche Domäne dar, die für die Zytotoxizität des Glykoproteins verantwortlich gemacht wird (Yang *et al.*, 2000). Jeffers *et al.* (2002) konnten feststellen, dass die Deletionsmutante in größeren Mengen in retrovirale Partikel integriert wurde als das native Ebo-GP und führten dies auf einen schnelleren Transport des Proteins zur Zelloberfläche und eine stärkere Expression zurück. Zur genaueren quantitativen Analyse der Expressionsraten des nativen und des mutierten Ebola-Glykoproteins wären durchflusszytometrische Untersuchungen besser geeignet als die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop. Präzisere Aussagen über die Proteinexpressionen der unterschiedlichen Glykoproteine ließen sich treffen, wenn in allen Fällen der gleiche Vektor und die gleichen Antikörper (z. B. Anti-flag-Antikörper) verwendet würden.

Die Herstellung der VSV-Pseudotypen wurde mittels BHK-21-Zellen durchgeführt, da mit diesen eine hohe Transfektionseffizienz erzielt werden konnte und sie kein Interferon produzieren können. Die Zellen wurden mit den Glykoproteingenen transfiziert und ca. 20 Stunden später mit VSV*cp-ΔG infiziert. LCMV-GPsyn und GP64syn vermittelten eine gute Infektion von BHK-21-Zellen, dennoch waren die Titer um den Faktor 10 geringer als die, die mit dem homologen Glykoprotein G erzielt wurden. Das nicht-synthetische GP64 vermittelte eine geringere Infektion. Die Pseudotypisierung von VSV durch heterologe Glykoproteine kann also erheblich verbessert werden, wenn die Expressionsrate durch Codonoptimierung erhöht wird. Eine Möglichkeit wäre daher, das Ebo-GP ebenfalls synthetisch herstellen zu lassen und dann zu untersuchen, ob die Expressionsrate des Glykoproteins bzw. die Infektion der Pseudotypen gesteigert werden kann. Darüber hinaus könnten Modifikationen des Proteins ebenfalls zur Optimierung der Pseudotypen beitragen, wie die Deletion der muzinähnlichen Domäne gezeigt hat. Diese Deletion hatte eine ca. zehnfache Steigerung der Infektiosität der Pseudotypen zur Folge. Da in der vorliegenden Arbeit nur die Infektionsraten der Pseudotypen untersucht wurden, wäre es in zukünftigen Studien wichtig, den Einbau der Glykoproteine in VSV-Partikel mittels Western-Blot zu prüfen.

5.1.3 Infektion polarisierter Zellen mit VSV-Pseudotypen

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Frage, ob die heterologen Glykoproteine eine apikale Infektion polarisierter Epithelzellen vermitteln würden. Da es im Rahmen der Doktorarbeit nicht gelang, stabile Zelllinien für GP64 und LCMV-GP herzustellen, konnten die Pseudotypen nur nach transienter Expression der Glykoproteine hergestellt werden. Es wurde festgestellt, dass VSV*- Δ G (LCMV-GPsyn) von allen Pseudotypen am besten eine apikale Infektion polarisierter MDCK-II-Zellen gewährleistete. GP64syn und Ebo-GP Δ vermittelten eine relativ geringe apikale Infektion, jedoch effizienter als VSV-G, welches fast ausschließlich eine basolaterale Infektion vermittelte. Das Verhältnis zwischen apikaler und basolateraler Infektion war bei allen Pseudotypen mit den heterologen Glykoproteinen gleich, was für eine ungerichtete Infektion spricht. Zu beachten ist aber, dass die Infektion von der basalen Seite aufgrund der Filterbarriere meist schwächer erscheint als sie tatsächlich ist. Nach Infektion mit VSV*cp- Δ G (GP64syn) konnte eine ähnlich hohe Infektionsrate festgestellt werden wie bei einer Infektion mit VSV*cp- Δ G (Ebo-GP Δ), obwohl die Titer des letzteren Virus niedriger waren. Dies könnte daran liegen, dass die bisher noch unbekanntenen Rezeptoren für das Ebo-GP (Takada et al, 2004; Marzi et al., 2006; Chan et al., 2001) zahlreicher auf MDCK-II-Zellen vorhanden sind als diejenigen für das GP64. Zusammenfassend lässt sich eine Tendenz der verschiedenen Glykoproteine hinsichtlich einer apikalen Infektion polarisierter Zellen feststellen. Doch ist es von Vorteil, in weiteren Studien stabile (induzierbare) Zellen herzustellen, auf denen die Pseudotypen vermehrt werden können. So ließen sich höhere Titer für die Infektionsversuche erzeugen und eventuelle Unterschiede in der apikalen und basalen Infektion besser erkennen.

5.2 VSV-Mutanten

5.2.1 Charakterisierung des VSV*ncp

VSV ist ein sehr zytopathogenes Virus, was es als Vektor für eine Substitutionstherapie ungeeignet erscheinen lässt. Die zytopathogenen Effekte beruhen hauptsächlich auf den Aktivitäten des M-Proteins, welches die Transkription hemmt (Black & Lyles, 1992), die Interferon-Synthese inhibiert (Ferran & Lucas-Lenard, 1997) und Apoptose induziert (Kopecky et al., 2001). Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein Virus hergestellt (VSV*ncp), welches ein mutiertes M-Gen (Mncp) enthält. Ähnliche Mutationen wurden auch in persistierenden bzw. weniger pathogenen VSV gefunden (Desforgues et al., 2001; Jayakar & Whitt, 2002).

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Expression eines Reportergens wie β -Galaktosidase in BHK-21- und HBE-Zellen nach Infektion mit VSV*cp und VSV*cp- Δ G stark reduziert war, wobei nach einer Infektion mit VSV*ncp und VSV*ncp- Δ G dieser Effekt kaum zu beobachten war. Dies stimmt mit vorherigen Studien überein, die zeigen, dass das M-Protein die zelluläre Transkription inhibiert und somit am sog. „Host shut off“, also dem Abschalten der Proteinexpression, beteiligt ist (Black & Lyles, 1992; Ahmed & Lyles, 1998). Diese Funktion des M-Proteins kann also verändert werden, ohne die anderen Funktionen wie Knospung und Freisetzung (Chong & Rose, 1995; Black *et al.*, 1993) zu beeinträchtigen.

Des Weiteren konnten morphologische Veränderungen bei Vero-Zellen festgestellt werden, die mit VSV*cp, VSV*ncp, VSV*cp- Δ G oder VSV*ncp- Δ G infiziert wurden. Alle Viren bewirkten, dass sich die Zellen abrundeten und auch zum Teil aus dem Zellrasen lösten (Blondel *et al.*, 1990; Melki *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 1994). Dieser Effekt war jedoch nach einer Infektion mit VSV*cp- Δ G, aber vor allem nach einer mit VSV*ncp- Δ G signifikant geringer. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in Vero-Zellen nach einer Infektion mit VSV*cp und auch mit VSV*ncp die Caspase-Aktivität deutlich erhöht war und LDH in den Zellüberstand freigesetzt wurde. Die zeitliche Verschiebung zwischen den Maximalwerten lässt sich dadurch erklären, dass zuerst Caspasen aktiviert wurden, die Zellen anschließend in Apoptose und dann in sekundäre Nekrose gingen und somit in Folge LDH freigesetzt wurde. Die Deletionsmutanten (VSV*cp- Δ G und VSV*ncp- Δ G) waren am stärksten attenuiert, hier wurde nach der Infektion nur eine geringe Caspase- und LDH-Aktivität gemessen. Die Experimente mit BHK-21-Zellen lieferten etwas andere Ergebnisse. Es wurde durch die Infektion mit VSV*ncp mehr Caspase-Aktivität induziert als mit VSV*cp. Kopecky *et al.* (2001), Kopecky & Lyles (2003) sowie Gaddy & Lyles (2005) beobachteten ein ähnlichen Effekt und begründeten ihn damit, dass zwei verschiedene Wege der Apoptose-Induktion existieren – einmal durch das M-Protein und einmal durch andere virale Komponenten – und dass BHK-21-Zellen transkriptionelle Aktivität benötigen, um Apoptose einzuleiten. Somit induziert VSV*cp weniger Apoptose in BHK-21-Zellen, da es die Transkription der Zelle hemmt. Aber wie schon bei den Vero-Zellen zu erkennen, waren die Caspase- und die LDH-Aktivität in BHK-21-Zellen nach einer Infektion mit den Deletionsmutanten deutlich geringer. Somit scheint das G-Protein ebenfalls entscheidend an der Zytopathogenese des Virus beteiligt zu sein.

Mit Hilfe eines VSV-Vektors, der das LacZ-Gen exprimiert, wurde die Dauer der Expression in Vero- und A549-Zellen untersucht. Die Expression des Reporters konnte noch mehrere Tage nach der Infektion von Vero-Zellen mit VSV*ncp- Δ G-LacZ nachgewiesen werden, ohne dass ein Aktivitätsabfall auftrat. Nach einer Woche wurden die Zellen einmal passagiert (1:4)

und man sah nach weiteren 7 Tagen, dass die Expression des Reporters nur noch ca. 1/14 des Ausgangswertes betrug. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Vektor nicht an die Tochterzellen weitergegeben wurde und somit durch die fortschreitende Zellteilung die Expression mit der Zeit abnahm. Der Vektor müsste für eine Gentherapie dementsprechend wiederholt appliziert werden. Wurden A549-Zellen infiziert, so ging die Expressionsrate der Zellen schon nach drei Tagen stark zurück und viele Zellen starben innerhalb der nächsten Tage. Die Aktivierung des Interferon- β -Promotors in HBE- und A549-Zellen war nach einer Infektion mit VSV*ncp und VSV*ncp- Δ G deutlich höher als nach einer Infektion mit VSV*cp und VSV*cp- Δ G. A549-Zellen besitzen – im Gegensatz zu Vero-Zellen – ein intaktes Interferonsystem und durch die Infektion mit VSV*ncp- Δ G wurden wahrscheinlich große Mengen an Interferon ausgeschüttet, was zum Zelltod führte (Balachandran *et al.*, 2000). Dass VSV*ncp- Δ G den Interferon- β -Promotor stärker induzierte als VSV*ncp, könnte daran liegen, dass die Zellen die Infektion länger überlebten. Interessant wäre es, zu untersuchen, ob durch Interferon-Antagonisten die Effekte, die hier bei der Expressionsstudie mit A549-Zellen beobachtet wurden, aufgehoben werden könnten. Für das E3L-Protein des Vaccinia-Virus wurde beschrieben, dass es ds-RNA bindet und die Interferon-induzierte Proteinkinase R hemmt (Chang *et al.*, 1992). Durch Expressierung des E3L-Proteins soll deshalb in nachfolgenden Studien untersucht werden, ob die Expression eines Reporters mittels VSV*ncp- Δ G in interferonkompetenten Zellen verlängert werden kann – ähnlich wie in Vero-Zellen.

Die VSV-Mutanten zeigten unterschiedliches Replikationsverhalten. Auf BHK-21-Zellen wuchsen VSV*cp und VSV*ncp zu gleich hohen Titern, dagegen wuchs VSV*ncp auf HBE- und A549-Zellen langsamer und wies einen zehnfach geringeren Titer auf. Diese Beobachtung ist dadurch zu erklären, dass BHK-21-Zellen einen Defekt im Interferon-System besitzen und HBE- sowie A549-Zellen nicht. So induzierte VSV*ncp z. B. in HBE-Zellen mehr Interferon und hemmte dadurch das Wachstum auf diesen Zellen. In BHK-21-Zellen wurde nur eine geringe Aktivierung des Interferon- β -Promotors nachgewiesen. Dies wies darauf hin, dass BHK-21-Zellen schon sehr früh einen Defekt im Interferon-Signalweg aufweisen.

5.2.2 VSV-Deletionsmutanten

Der Versuch, ein VS-Virus herzustellen, welches gar kein VSV-M-Protein exprimiert und somit noch weniger immunogen wirkt, gelang im Rahmen der Dissertation nicht. Es war vorgesehen, das Antigenom (VSV- Δ M), die Plasmide, welche für VSV-N, -P und -L

kodieren, und das VSV-Msyn-Gen gleichzeitig zu transfizieren und somit VSV- Δ M zu erzeugen. Da die Experimente mit BHK-21 oder BHK-G43-Zellen unternommen wurden, konnte die Interferon-Induktion in diesem Fall keinen negativen Einfluss gehabt haben, da in diesen Zellen keine Aktivierung des IFN- β -Promotors nachgewiesen werden konnte. Jedoch inhibierten offensichtlich andere Faktoren die Virusproduktion, wenn das VSV-Msyn-Protein nicht vom Virus-Genom exprimiert, sondern kotransfiziert wurde. Die Variation des Transfektionsprotokolls (nach Witko *et al.*, 2006), der Inkubationszeit oder -temperatur führte ebenfalls nicht zum Ziel. Ein anderer Ansatz, der eine Transfektion des VSV- Δ M-Antigenoms und eine anschließende Überinfektion mit VSV- Δ G sowie die Selektion des Überstandes auf VSV-M-exprimierenden Zellen vorsah, scheiterte ebenfalls. Hier wurden Zellen gefunden, die beide Proteine (VSV-M und VSV-G) gleichzeitig exprimierten (Daten nicht gezeigt). Eventuell waren hier Rekombinanten der beiden Viren entstanden. Um mit dieser Methode VSV- Δ M herzustellen, müsste ein Helfervirus (eines anderen VSV-Stammes) verwendet werden, welches nachher wieder neutralisiert werden kann. Eine andere Erklärung ist, dass das M-Protein während der Virusherstellung nicht in der Menge exprimiert wurde, die für den *Budding*-Prozess, an dem das M-Protein beteiligt ist, notwendig ist. Für Rabies-Viren wurde u. a. beschrieben, dass das Matrix-Protein an der Regulation der Transkription und Replikation beteiligt ist (Finke *et al.*, 2003; Finke & Conzelmann, 2003). Dies könnte auch für VSV-M zutreffen, so dass eine zu große oder zu geringe Menge dieses Proteins die initiale Virusproduktion vielleicht verhinderte. Vielleicht enthält die RNA des M-Gens cis-aktive Elemente, welche für die Produktion neuer Viren notwendig sind. Dies ließe sich anhand einer VSV-Mutante überprüfen, die das vollständige VSV-Genom enthält, jedoch kein M-Protein exprimiert (z. B. durch Einfügen von Stop-Codons). Es scheint so, dass viele verschiedene Faktoren bei der Herstellung eines rekombinanten Virus eine Rolle spielen und die optimalen Versuchsbedingungen für jedes Virus gefunden werden müssen. Mit einem verwandten Virus, dem Sendai-Virus, wurde gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, eine Deletionsmutante herzustellen, der drei Gene (M, F und HN) fehlen. Dies geschah durch Kotransfektion aller Komponenten und Kokultivierung der transfizierten Zellen mit Zellen, die stabil das M-, F- und HN-Protein exprimierten (Yoshizaki *et al.*, 2006).

Auch mit der Zelllinie CHO-M-IRES-G gelang es nicht, Virus herzustellen. Diese Zellen wurden während der Arbeit angefertigt, um das VSV-M- und das VSV-G-Protein gleichzeitig zu exprimieren und damit eine Vermehrung von VSV-Deletionsmutanten zu gewährleisten. Es konnte gezeigt werden, dass im Überstand von induzierten CHO-M-IRES-G-Zellen das M- und G-Protein vorhanden waren. Ob diese in virusähnlichen Partikeln (*virus like particles*, VLPs) oder Zelltrümmern enthalten waren, lässt sich nicht abschließend beurteilen. Doch ist gezeigt worden, dass VSV-M in der Lage ist, Viruspartikel von der Zellmembran

abzuschneiden (Justice *et al.*, 1995; Sakaguchi *et al.*, 1999) und infolgedessen VLPs durch die Expression des M-Proteins entstehen können. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung könnte die Frage beantworten, ob es sich hier wirklich um VLPs handelt. Zwar wurden zwar beide Proteine (VSV-M und -G) gleichzeitig mittels des verwendeten Vektors exprimiert, doch war die Expression des vor der IRES-Sequenz liegenden Gens (hier VSV-M) stärker. Daher wäre ein bidirektionaler Vektor (wie z. B. pTRE-Tight-BI) eine Alternative, um eine gleichstarke Expression der klonierten Gene zu gewährleisten.

5.2.3 Replikationsverhalten des VSV*ncp-ΔG-LacZ und Klonierung des mCFTR-Gens

Das Ziel dieses Projektes war die Entwicklung eines gentherapeutischen Vektors zur Behandlung von Atemwegserkrankungen wie z. B. der Cystischen Fibrose. Aus diesem Grund wurden mehrere Versuche unternommen, das CFTR-Gen zu klonieren und zu exprimieren. Das CFTR-Gen kodiert für einen Ionenkanal, der bei der Cystischen Fibrose defekt ist. Die cDNA des murinen CFTR-Gens wurde schon im Vorfeld in den Klonierungsvektor pCR2.1 fragmentweise kloniert (Fragment 1a und 1b). Diese beiden Sequenzabschnitte wurden schließlich im Rahmen dieser Arbeit im pCR2.1 zusammengesetzt und mittels Sequenzieranalyse überprüft. Somit steht das mCFTR-Gen nun für die Klonierung in den VSV-Vektor und weitere Untersuchungen zur Verfügung. Für Expressionsstudien z. B. ist es sinnvoll, das Gen an einen Reporter wie z. B. GFP zu koppeln. Eine Idee wäre, Rekombinations-Systeme für die Klonierung des Gens zu verwenden, die es erlauben, große Fragmente zu klonieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein anderes, ebenfalls großes Gen (LacZ) in den VSV-Vektor inseriert. Dieses Virus zeigte im Vergleich zu VSV*ncp ein langsames Wachstum auf BHK-G43-Zellen. Bei der Aktivierung des Interferon-β-Promotors ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Somit hat das Einfügen eines größeren Gens ins VSV-Genom nur einen geringen Einfluss auf das Virus-Wachstum.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass VSV als Vektor für gentherapeutische Anwendungen geeignet sein kann. Die Pseudotypisierung des VSV mit heterologen Glykoproteinen wie z. B. LCMV-GPsyn zeigte, dass es möglich ist, eine apikale Infektion polarisierter Zellen zu erreichen. Diese Proteine können eine Alternative zum bereits

beschriebenen HEF-Protein darstellen. Durch Mutationen des VSV-M-Proteins (und Deletion des VSV-G-Proteins) konnten unvorteilhafte Eigenschaften, wie die Inhibition der Transkription oder die Apoptose-Induktion, verringert werden. Der gesteigerten Interferon-Ausschüttung nach einer Infektion mit VSV*ncp- Δ G könnte z. B. mit Interferon-Antagonisten entgegengewirkt werden. Somit wäre eine verlängerte Expression eines Transgens gewährleistet. Offen bleibt die Frage, in welchem Maße die hergestellten VSV-Vektoren eine Immunantwort im Tier auslösen. Dies könnte z. B. in einem Ratten-Modell untersucht werden.

6. Anhang

Glykoprotein des Influenza-C-Virus (HEF)

GenBank/EMBL/DDBJ accession no. M17868

Glykoprotein des Baculovirus AcMNPV (GP64)

GenBank/EMBL/DDBJ accession no. M25420.

Im Folgenden sind die Sequenz des GP64syn und die Aminosäuren (Abweichungen groß und unterstrichen markiert) dargestellt.

```

GGGCGAATTGGGTACCGAATTCGCCACCATGGTGTCCGCCATCGTGCTGTACGTCCTGCT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCGCTTAACCCATGGCTTAAGCGGTGTTACCACAGGCGGTAGCACGACATGCAGGACGA
      M V S A I V L Y V L L

CGCCGCAGCAGCCCACAGCGCCTTTGCCGCCGAGCACTGCAACGCCCAGATGAAAACCGG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCGGCGTTCGTGCGGTGTGCGGAAACGGCGGCTCGTGACGTTGCGGGTCTACTTTTGCC
A A A A H S A F A A E H C N A Q M K T G

CCCCTACAAGATCAAGAACCTGGACATCACCCCCCAAAGAGACCCTGCAGAAAAGACGT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGGATGTTCTAGTTCTTGGACCTGTAGTGGGGGGGTTTCTCTGGGACGTCTTTCTGCA
P Y K I K N L D I T P P K E T L Q K D V

GGAGATCACCATCGTGGAGACCGACTACAACGAGAACGTGATCATCGGCTACAAGGGCTA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTCTAGTGGTAGCACCTCTGGCTGATGTTGCTCTTGCCTAGTAGCCGATGTTCCCGAT
E I T I V E T D Y N E N V I I G Y K G Y

CTACCAGGCCTACGCCTACAACGGCGGCAGCCTGGACCCCAACACACGGGTTCGAGGAAAC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GATGGTCCGGATGCGGATGTTGCCGCCGTGCGACCTGGGGTTGTGTGCCAGCTCCTTTG
Y Q A Y A Y N G G S L D P N T R V E E T

CATGAAAACCCTGAACGTGGGCAAAGAGGATCTGCTGATGTGGAGCATCCGGCAGCAGTG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTACTTTTGGGACTTGACCCGTTTCTCCTAGACGACTACACCTCGTAGGCCGTGCTCAC
M K T L N V G K E D L L M W S I R Q Q C

CGAAGTGGGCGAGGAACTGATCGACAGATGGGGCAGCGACAGCGACGACTGCTTCCGGGA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCTTACCCGCTCCTTGACTAGCTGTCTACCCCGTGCCTGCTGCTGACGAAGGCCCT
E V G E E L I D R W G S D S D D C F R D

CAACGAGGGCAGGGGCCAGTGGGTGAAGGGCAAAGAACTGGTGAAGCGGCAGAACAAACA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTGCTCCCGTCCCGGTACCCACTTCCCGTTTCTTGACCACTTCGCCGTCTTGTGTT
N E G R G Q W V K G K E L V K R Q N N N

CCACTTCGCCCACCACACCTGCAACAAGAGCTGGCGGTGCGGCATCAGCACCAGCAAGAT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTGAAGCGGGTGGTGTGGACGTTGTTCTCGACCCGCCACGCCGTAGTCGTGGTTCGTTCTA
H F A H H T C N K S W R C G I S T S K M

```

GTACAGCCGGCTGGAATGCCAGGACGACACCGACGAGTGCCAGGTGTACATCCTGGACGC
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CATGTCCGGCCGACCTTACGGTCCTGCTGTGGCTGCTCACGGTCCACATGTAGGACCTGCG
Y S R L E C Q D D T D E C Q V Y I L D A

CGAGGGCAACCCCATCAACGTGACCGTGGACACCGTGTGCACCGGGACGGCGTGAGCAT
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTCCCCTGGGGTAGTTGCACTGGCACCTGTGGCACGACGTGGCCCTGCCGCACTCGTA
E G N P I N V T V D T V L H R D G V S M

GATCCTGAAGCAGAAGAGCACCTTCACCACCCGGCAGATCAAGGCCCTGCCTGCTGAT
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTAGGACTTCGTCTTCTCGTGGAAAGTGGTGGGCCGTCTAGTTCGGCGGACGGACGACTA
I L K Q K S T F T T R Q I K A A C L L I

CAAGGACGACAAGAACAACCCCGAGAGCGTGACCCGGGAGCACTGCCTGATCGACAACGA
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTCCTGCTGTTCTTGTGGGGCTCTCGCACTGGGCCCTCGTGACGGACTAGCTGTTGCT
K D D K N N P E S V T R E H C L I D N D

CATCTACGACCTGAGCAAGAACACCTGGAAGTCAAGTTCAACCGGTGCATCAAGCGGAA
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTAGATGCTGGACTCGTTCTTGTGGACCTTGACGTTCAAGTTGGCCACGTAGTTCGCCTT
I Y D L S K N T W N C K F N R C I K R K

GGTGGAGCACCGGGTGAAGAAGAGGCCCCCACCTGGCGGCACAACGTGCGGGCCAAGTA
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCACCTCGTGGCCCACTTCTTCTCCGGGGGGTGGACCGCCGTGTTGCACGCCCGGTTTCAT
V E H R V K K R P P T W R H N V R A K Y

CACCGAGGGCGACACCGCCACCAAGGGCGACCTGATGCACATCCAAGAGGAACTGATGTA
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGGCTCCCGCTGTGGCGGTGGTTCCCGCTGGACTACGTGTAGGTTCTCCTTGACTACAT
T E G D T A T K G D L M H I Q E E L M Y

CGAGAACGACCTGCTGAAGATGAACATCGAGCTGATGCACGCCCACATCAACAAGCTGAA
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTCTTGCTGGACGACTTCTACTTGTAGCTCGACTACGTGCGGGTGTAGTTGTTTCGACTT
E N D L L K M N I E L M H A H I N K L N

CAACATGCTGCACGACCTGATCGTGAGCGTGGCCAAGGTGGACGAGCGGCTGATCGGCAA
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTGTACGACGTGCTGGACTAGCACTCGCACCGGTTCCACCTGCTCGCCGACTAGCCGTT
N M L H D L I V S V A K V D E R L I G N

CCTGATGAACAACAGCGTGAGCAGCACCTTCTGAGCGACGACACCTTCTGCTGATGCC
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGACTACTTGTGTGCGCACTCGTGTGGAAGGACTCGCTGCTGTGGAAGGACGACTACGG
L M N N S V S S T F L S D D T F L L M P

CTGCACCAACCCCTGCCACACCAGCAACTGCTACAACAACAGCATCTACAAAGAGGG
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACGTGGTTGGGGGACGGGTGTGGTTCGTTGACGATGTTGTTGTCGTAGATGTTTCTCCC
C T N P P A H T S N C Y N N S I Y K E G

CCGCTGGGTCCCAACACCGACAGCAGCCAGTGCATCGACTTCTCCAACCTACAAAGAGCT
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGCGACCCAGCGGTTGTGGCTGTGCTCGGTACAGTAGCTGAAGAGGTTGATGTTTCTCGA
R W V A N T D S S Q C I D F S N Y K E L

GGCCATCGACGACGACGTGGAGTTCTGGATTCCCACCATCGGCAACACCACCTACCACGA
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGGTAGCTGCTGCTGCACCTCAAGACCTAAGGGTGGTAGCCGTTGTGGTGGATGGTGCT
A I D D V E F W I P T I G N T T Y H D

CAGCTGGAAGGACGCCAGCGGCTGGTCCTTCATCGCCCAGCAGAAGTCCAACCTGATCAC
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCGACCTTCTGCGGTGCGCGACCAGGAAGTAGCGGGTTCGTTTCAGGTTGGACTAGTG
S W K D A S G W S F I A Q Q K S N L I T

CACCATGGAAAACACCAAGTTTCGGCGGCGTGGGCACCAGCCTGAGCGACATCACCAGCAT
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGGTACCTTTTTGTGGTTCAAGCCGCCGACCCGTTGGTTCGGACTCGCTGTAGTGGTCGTA
T M E N T K F G G V G T S L S D I T S M

GGCCGAGGGCGAGCTGGCCGCAAGCTGACCAGCTTCATGTTTCGGCCACGTGGTGAACCT
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGGCTCCCGCTCGACCGCGGTTTCGACTGGTCAAGTACAAGCCGGTGCACCACTTGAA
A E G E L A A K L T S F M F G H V V N F

CGTGATCATCCTGATTGTGATCCTGTTCTGTACTGCATGATCCGGAACCGGAACCGGCA
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCACTAGTAGGACTAACACTAGGACAAGGACATGACGTACTAGGCCTTGGCCTTGGCCGT
V I I L I V I L F L Y C M I R N R N R Q

GTACTGATGAGAATTCGAGCTCCAGCTTTTTGTTCCC
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CATGACTACTCTTAAGCTCGAGGTCGAAAAACAAGGG
Y * * *

Glykoprotein des Ebola-Zaire-Virus (Ebo-GP)

GenBank/EMBL/DDBJ accession no. NC_002549,

DNA-Sequenz der Deletionsmutante Ebo-GP Δ :

ATGGGCGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGATTCAAGAGGACATCATTCT
 TTCTTTGGGTAATTATCCTTTTCCAAAGAACATTTTCCATCCCCTTGGAGTCATCCACA
 ATAGCACATTACAGGTTAGTGATGTGCGACAAACTAGTTTGTGCGTGACAAACTGTCAATCCA
 CAAATCAATTGAGATCAGTTGGACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACGTGC
 CATCTGCAACTAAAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCCACCAAAGGTGGTCAATTATG
 AAGCTGGTGAATGGGCTGAAAACCTGCTACAATCTTCAAATCAAAAAACCTGACGGGAGTG
 AGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACGGGATTCGGGGCTTCCCCGGTGCCGGTATGTGCACA
 AAGTATCAGGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCATAAAGAGGGTGCTTTCT
 TCCTGTATGATCGACTTGCTTCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTTTCGCTGAAGGTG
 TCGTTGCATTTCTGATACTGCCCAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGA
 GAGAGCCGGTCAATGCAACGGGAGACCGTCTAGTGGCTACTATTCTACCACAATTAGAT
 ATCAGGCTACCGGTTTTTGAACCAATGAGACAGAGTACTTGTTCGAGGTTGACAATTTGA
 CCTACGTCCAACCTGAATCAAGATTACACCACAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAA
 TATATACAAGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAACCTAATTTGGAAGTCAACCCCGA
 AATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCCTTCTGGGAAAACCTCACTAGATA[Deletion]
 GCAGGACTGATCACAGGCGGGAGAAGAAGTCAAGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCC

AAATGCAACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCTGCAATCGGACTG
 GCCTGGATAACCATATTTTCGGGCCAGCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGGCTAATGCAC
 AATCAAGATGGTTTTAATCTGTGGGTTGAGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTT
 CAACTGTTCTTGAGAGCCACAACCTGAGCTACGCACCTTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGCA
 ATTGATTTCTTGCTGCAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTCTGGGACCGGACTGCTGT
 ATCGAACACATGATTGGACCAAGAACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCATGAT
 TTTGTTGATAAAACCCCTTCCGGACCAGGGGGACAATGACAATTGGTGGACAGGATGGAGA
 CAATGGATAACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTATAATTGCAGTTATCGCTTTATTC
 TGTATATGCAAATTTGTCTTTTAGCTCGAGGGTACCCCCGGGGCGGCCGAGCTCTTAA
 TTAGCTAGCAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAG
 CATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAG

VSV-Mncp/Msyn (Geneart GmbH)

Im Folgenden sind die codonoptimierte Sequenz und die Aminosäuren dargestellt. Die Mutationen sind hervorgehoben (unterstrichen und groß).

GAATTGGGTACCGAATTCATCATGAGCAGCCTGAAGAAGATCCTGGGCCTGAAGGGCAAG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTAACCCATGGCTTAAGTAGTACTCGTCCGACTTCTTCTAGGACCCGGACTTCCCCTTC
M S S L K K I L G L K G K

GGCAAGAAGAGCAAGAAGCTGGGCATCGCCCCCTCCTCCATACGAGGAGGACACCAGCGCC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGTTCTTCTCGTTCTTCGACCCGTAGCGGGGAGGAGGTATGCTCCTCCTGTGGTCCGGG
G K K S K K L G I A P P P Y E E D T S A

GAGTACGCCCTAGCGCCCCTATCGACAAGAGCTACTTCGGCGTGGACGAGAGAGACACC
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTCATGCGGGGATCGCGGGGATAGCTGTTCTCGATGAAGCCGCACCTGCTCTCTCTGTGG
E Y A P S A P I D K S Y F G V D E R D T

TACGACCCCAACCAGCTGCGCTACGAGAAGTTCTTCTTCCCGTGAAGATGACAGTGAGG
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATGCTGGGGTTGGTTCGACGCGATGCTCTTCAAGAAGAAGTGGCACTTCTACTGTCACTCC
Y D P N Q L R Y E K F F F T V K M T V R

AGCAACAGGCCCTTCAGGACCTACAGCGACGTGGCCGCTGCCGTGTCCCACTGGGACCAC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGTTGTCCGGGAAGTCTGGATGTCGCTGCACCCGGCGACGGCACAGGGTGACCCTGGTG
S N R P F R T Y S D V A A A V S H W D H

ATGTACATCGGCATGGCCGGCAAGAGACCCTTCTACAAGATCCTGGCCTTCTGGGCAGC
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TACATGTAGCCGTACCGGCCGTTCTCTGGGAAGATGTTCTAGGACCGGAAGGACCCGTCG
M Y I G M A G K R P F Y K I L A F L G S

AGCAACCTGAAGGCCACCCCTGCCGTGCTGGCCGACCAGGGCCAGCCTGAGTACCACGCC
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGTTGGACTTCCGGTGGGGACGGCACGACCCGGCTGGTCCCGGTCCGGACTCATGGTGCGG
S N L K A T P A V L A D Q G Q P E Y H A

CACTGCGAGGGCAGAGCCTACCTGCCTCACAGGATGGGCAAGACCCCCCTATGCTGAAC
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGACGCTCCCGTCTCGGATGGACGGAGTGTCTACCCGTTCTGGGGGGGATACGACTTG
H C E G R A Y L P H R M G K T P P M L N

GTGCCCCGAGCACTTCAGGAGGCCCTTCAACATCGGCCTGTACAAGGGCACCATCGAGCTG
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACGGGCTCGTGAAGTCTCCGGGAAGTTGTAGCCGGACATGTTCCCGTGGTAGCTCGAC
V P E H F R R P F N I G L Y K G T I E L

ACCATGACCATCTACGACGACGAGAGCCTGGAGGCCGCTCCTATGATCTGGGACCACTTC
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGGTACTGGTAGATGCTGCTGCTCTCGGACCTCCGGCGAGGATACTAGACCCTGGTGAAG
T M T I Y D D E S L E A A P M I W D H F

AACAGCAGCAAGTTTCAGCGACTTCAGGGAGAAGGCCCTGATGTTCCGCCTGATCGTGGAG
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGTCGTCGTTCAAGTCGCTGAAGTCCCTCTTCCGGGACTACAAGCCGGACTAGCACCTC
N S S K F S D F R E K A L M F G L I V E

AAGAAGGCCAGCGGCGCCTGGTTCTGGACAGCATCCGGCACTTCAAGTGAGAATTCCGA
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCTTCCGGTCGCCGCGGACCAAGGACCTGTGCTAGGCCGTGAAGTTCACTCTTAAGGCT
K K A S G A W F L D S I R H F K *

GCTC
 721 -----
 CGAG

8. *Renilla-Luziferase* (RUC)

GenBank/EMBL/DDBJ accession no. AF264722

7. Literaturverzeichnis

1. **Ahmed, M. and D.S. Lyles.** 1997. Identification of a consensus mutation in M protein of vesicular stomatitis virus from persistently infected cells that affects inhibition of host-directed gene expression. *Virology* 237:378-388.
2. **Ahmed, M. and D.S. Lyles.** 1998. Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II, and III. *J Virol* 72:8413-8419.
3. **Barber, G.N.** 2005. VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* 24:7710-7719.
4. **Barr, J.N., et al.** 1997. cis-Acting signals involved in termination of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation. *J Virol* 71:8718-8725.
5. **Bergmann, J.E. and P.J. Fusco.** 1988. The M protein of vesicular stomatitis virus associates specifically with the basolateral membranes of polarized epithelial cells independently of the G protein. *J Cell Biol* 107:1707-1715.
6. **Beyer, W.R., et al.** 2003. Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77:2866-2872.
7. **Black, B.L. and D.S. Lyles.** 1992. Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo. *J Virol* 66:4058-4064.
8. **Black, B.L., et al.** 1993. The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *J Virol* 67:4814-4821.
9. **Blissard, G.W. and J.R. Wenz.** 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 66:6829-6835.
10. **Blondel, D., et al.** 1990. Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 64:1716-1725.
11. **Bruns, M. and F. Lehmann-Grube.** 1984. Lymphocytic choriomeningitis virus. VIII. Reciprocal formation of pseudotypes with vesicular stomatitis virus. *Virology* 137:49-57.
12. **Buchholz, U.J., et al.** 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73:251-259.
13. **Buchmeier, M.J., et al.** 1987. Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenavirus GP-C glycoproteins. *J Virol* 61:982-985.
14. **Cao, W., et al.** 1998. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282:2079-2081.

15. **Caplen, N.J., et al.** 1995. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1:39-46.
16. **Carneiro, F.A., et al.** 2006. Probing the interaction between vesicular stomatitis virus and phosphatidylserine. *Eur Biophys J* 35:145-154.
17. **Cesaire, R., et al.** 2006. Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus in primary adult T-cell leukemia. *Oncogene* 25:349-358.
18. **Chan, S.Y., et al.** 2001. Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* 106:117-126.
19. **Chang, H.W., et al.** 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4825-4829.
20. **Chen, J.L., et al.** 1997. Phosphorylated states of vesicular stomatitis virus P protein in vitro and in vivo. *Virology* 228:200-212.
21. **Chong, L.D. and J.K. Rose.** 1993. Membrane association of functional vesicular stomatitis virus matrix protein in vivo. *J Virol* 67:407-414.
22. **Chong, L.D. and J.K. Rose.** 1994. Interactions of normal and mutant vesicular stomatitis virus matrix proteins with the plasma membrane and nucleocapsids. *J Virol* 68:441-447.
23. **Coil, D.A. and A.D. Miller.** 2004. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J Virol* 78:10920-10926.
24. **Coil, D.A. and A.D. Miller.** 2005. Enhancement of enveloped virus entry by phosphatidylserine. *J Virol* 79:11496-11500.
25. **Compans, R.W.** 1995. Virus entry and release in polarized epithelial cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 202:209-219.
26. **Cozens, A.L., et al.** 1994. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10:38-47.
27. **Crystal, R.G., et al.** 1994. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 8:42-51.
28. **Darke, C.S., et al.** 1957. Fulminating staphylococcal pneumonia associated with influenza virus C: report of a fatal case. *Br Med J* 2:606-609.
29. **Das, S.C., et al.** 2006. Visualization of intracellular transport of vesicular stomatitis virus nucleocapsids in living cells. *J Virol* 80:6368-6377.
30. **de Semir, D., et al.** 2003. Suitability of oligonucleotide-mediated cystic fibrosis gene repair in airway epithelial cells. *J Gene Med* 5:625-639.
31. **Deibel, R., et al.** 1975. Lymphocytic choriomeningitis virus in man. Serologic evidence of association with pet hamsters. *Jama* 232:501-504.

32. **Desforges, M., et al.** 2001. Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus Res* 76:87-102.
33. **Doring, G., et al.** 2007. Clinical trials in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 6:85-99.
34. **Drumm, M.L., et al.** 1990. Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62:1227-1233.
35. **Dykes, A.C., et al.** 1980. A clinical, epidemiologic, serologic, and virologic study of influenza C virus infection. *Arch Intern Med* 140:1295-1298.
36. **Ebert, O., et al.** 2005. Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Ther* 12:350-358.
37. **Ezelle, H.J., et al.** 2002. Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector. *J Virol* 76:12325-12334.
38. **Ferran, M.C. and J.M. Lucas-Lenard.** 1997. The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *J Virol* 71:371-377.
39. **Ferrari, S., et al.** 2004. A defective nontransmissible recombinant Sendai virus mediates efficient gene transfer to airway epithelium in vivo. *Gene Ther* 11:1659-1664.
40. **Finke, S. and K.K. Conzelmann.** 2003. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *J Virol* 77:12074-12082.
41. **Finke, S., et al.** 2003. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J Gen Virol* 84:1613-1621.
42. **Flotte, T.R., et al.** 2003. Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther* 14:1079-1088.
43. **Formanowski, F. and H. Meier-Ewert.** 1988. Isolation of the influenza C virus glycoprotein in a soluble form by bromelain digestion. *Virus Res* 10:177-191.
44. **Francis, T., Jr., et al.** 1950. Identification of another epidemic respiratory disease. *Science* 112:495-497.
45. **Fukushi, S., et al.** 2005. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol* 86:2269-2274.
46. **Fuller, S., et al.** 1984. Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell* 38:65-77.

47. **Gaddy, D.F. and D.S. Lyles.** 2005. Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways. *J Virol* 79:4170-4179.
48. **Garbutt, M., et al.** 2004. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol* 78:5458-5465.
49. **Gonzalez, J.P., et al.** 2007. Ebolavirus and other filoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 315:363-387.
50. **Griesenbach, U., et al.** 2006. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther* 13:1061-1067.
51. **Griesenbach, U., et al.** 2005. Sendai virus for gene therapy and vaccination. *Curr Opin Mol Ther* 7:346-352.
52. **Grigera, P.R., et al.** 2000. Presence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) E2 glycoprotein in VSV recombinant particles and induction of neutralizing BVDV antibodies in mice. *Virus Res* 69:3-15.
53. **Guibinga, G.H. and T. Friedmann.** 2005. Baculovirus GP64-pseudotyped HIV-based lentivirus vectors are stabilized against complement inactivation by codisplay of decay accelerating factor (DAF) or of a GP64-DAF fusion protein. *Mol Ther* 11:645-651.
54. **Gupta, A.K., et al.** 2002. Unique capping activity of the recombinant RNA polymerase (L) of vesicular stomatitis virus: association of cellular capping enzyme with the L protein. *Biochem Biophys Res Commun* 293:264-268.
55. **Hanika, A., et al.** 2005. Use of influenza C virus glycoprotein HEF for generation of vesicular stomatitis virus pseudotypes. *J Gen Virol* 86:1455-1465.
56. **Harty, R.N., et al.** 2001. Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. *J Virol* 75:10623-10629.
57. **Her, L.S., et al.** 1997. Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* 276:1845-1848.
58. **Herrler, G., et al.** 1979. A precursor glycoprotein in influenza C virus. *Virology* 99:49-56.
59. **Herrler, G., et al.** 1988. The glycoprotein of influenza C virus is the haemagglutinin, esterase and fusion factor. *J Gen Virol* 69 (Pt 4):839-846.
60. **Herrler, G. and H.D. Klenk.** 1991. Structure and function of the HEF glycoprotein of influenza C virus. *Adv Virus Res* 40:213-234.
61. **Herrler, G., et al.** 1981. Isolation and structural analysis of influenza C virion glycoproteins. *Virology* 113:439-451.
62. **Herrler, G., et al.** 1985. The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase-O-acetyltransferase. *Embo J* 4:1503-1506.

63. **Herrler, G., et al.** 1991. 9-O-acetylated sialic acid, a receptor determinant for influenza C virus and coronaviruses. *Behring Inst Mitt*:177-184.
64. **Hewat, E.A., et al.** 1984. Low resolution structure of the influenza C glycoprotein determined by electron microscopy. *J Mol Biol* 175:175-193.
65. **Hofling, K., et al.** 1996. Transfer of an esterase-resistant receptor analog to the surface of influenza C virions results in reduced infectivity due to aggregate formation. *Virology* 218:127-133.
66. **Holland, J.J., et al.** 1979. Evolution of multiple genome mutations during long-term persistent infection by vesicular stomatitis virus. *Cell* 16:495-504.
67. **Holland, J.J. and L.P. Villarreal.** 1974. Persistent noncytotoxic vesicular stomatitis virus infections mediated by defective T particles that suppress virion transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:2956-2960.
68. **Ito, H., et al.** 2001. Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *J Virol* 75:1576-1580.
69. **Jacobson, S., et al.** 1979. Determinants of spontaneous recovery and persistence in MDCK cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Gen Virol* 44:113-122.
70. **Jayakar, H.R., et al.** 2004. Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res* 106:117-132.
71. **Jayakar, H.R. and M.A. Whitt.** 2002. Identification of two additional translation products from the matrix (M) gene that contribute to vesicular stomatitis virus cytopathology. *J Virol* 76:8011-8018.
72. **Jeetendra, E., et al.** 2003. The membrane-proximal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein G ectodomain is critical for fusion and virus infectivity. *J Virol* 77:12807-12818.
73. **Jeffers, S.A., et al.** 2002. Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein. *J Virol* 76:12463-12472.
74. **Johnson, J.E., et al.** 1997. Specific targeting to CD4+ cells of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding human immunodeficiency virus envelope proteins. *J Virol* 71:5060-5068.
75. **Jordan, J.A., et al.** 1989. The L protein of a VSV mutant isolated from a persistent infection is responsible for viral interference and dominance over the wild-type. *Virology* 169:137-141.
76. **Justice, P.A., et al.** 1995. Membrane vesiculation function and exocytosis of wild-type and mutant matrix proteins of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 69:3156-3160.
77. **Kahn, J.S., et al.** 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.

78. **Kahn, J.S., et al.** 1999. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology* 254:81-91.
79. **Kang, Y., et al.** 2005. Persistent expression of factor VIII in vivo following nonprimate lentiviral gene transfer. *Blood* 106:1552-1558.
80. **Kobayashi, M., et al.** 2003. Pseudotyped lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus SIVagm with envelope glycoproteins from paramyxovirus. *J Virol* 77:2607-2614.
81. **Kobinger, G.P., et al.** 2004. Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 15:211-219.
82. **Kobinger, G.P., et al.** 2001. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol* 19:225-230.
83. **Kohn, D.B., et al.** 1998. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 4:775-780.
84. **Kopecky, S.A. and D.S. Lyles.** 2003. Contrasting effects of matrix protein on apoptosis in HeLa and BHK cells infected with vesicular stomatitis virus are due to inhibition of host gene expression. *J Virol* 77:4658-4669.
85. **Kopecky, S.A., et al.** 2001. Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *J Virol* 75:12169-12181.
86. **Krause, D.S., et al.** 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377.
87. **Kremer, K.L., et al.** 2007. Gene delivery to airway epithelial cells in vivo: a direct comparison of apical and basolateral transduction strategies using pseudotyped lentivirus vectors. *J Gene Med* 9:362-368.
88. **Kretzschmar, E., et al.** 1997. High-efficiency incorporation of functional influenza virus glycoproteins into recombinant vesicular stomatitis viruses. *J Virol* 71:5982-5989.
89. **Kumar, M., et al.** 2003. Large-scale production of pseudotyped lentiviral vectors using baculovirus GP64. *Hum Gene Ther* 14:67-77.
90. **Kunz, S., et al.** 2003. Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* 314:168-178.
91. **Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer 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.

92. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
93. **Liu, S.L., et al.** 2004. Jaagsiekte sheep retrovirus envelope efficiently pseudotypes human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors. *J Virol* 78:2642-2647.
94. **Liu, X., et al.** 2005. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther* 16:1116-1123.
95. **Majid, A.M., et al.** 2006. Evaluating replication-defective vesicular stomatitis virus as a vaccine vehicle. *J Virol* 80:6993-7008.
96. **Malashkevich, V.N., et al.** 1999. Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2662-2667.
97. **Markovic, I., et al.** 1998. Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates. *J Cell Biol* 143:1155-1166.
98. **Marzi, A., et al.** 2006. The signal peptide of the ebolavirus glycoprotein influences interaction with the cellular lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 80:6305-6317.
99. **Matrosovich, M.N., et al.** 2004. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* 78:12665-12667.
100. **Medina, M.F., et al.** 2003. Lentiviral vectors pseudotyped with minimal filovirus envelopes increased gene transfer in murine lung. *Mol Ther* 8:777-789.
101. **Melki, R., et al.** 1994. Interaction between tubulin and the viral matrix protein of vesicular stomatitis virus: possible implications in the viral cytopathic effect. *Virology* 202:339-347.
102. **Monsma, S.A. and G.W. Blissard.** 1995. Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. *J Virol* 69:2583-2595.
103. **Monsma, S.A., et al.** 1996. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol* 70:4607-4616.
104. **Moss, R.B., et al.** 2004. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 125:509-521.
105. **Mwanatambwe, M., et al.** 2001. Ebola hemorrhagic fever (EHF): mechanism of transmission and pathogenicity. *J Nippon Med Sch* 68:370-375.

106. **Neumann, G., et al.** 2007. Proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not critical for Ebola virus replication in nonhuman primates. *J Virol* 81:2995-2998.
107. **Neumann, G., et al.** 2002. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *J Gen Virol* 83:2635-2662.
108. **Oeffner, F., et al.** 1999. The cytoplasmic tail of the influenza C virus glycoprotein HEF negatively affects transport to the cell surface. *J Gen Virol* 80 (Pt 2):363-369.
109. **O'Hara, P.J., et al.** 1984. Vesicular stomatitis virus defective interfering particles can contain extensive genomic sequence rearrangements and base substitutions. *Cell* 36:915-924.
110. **Olsen, J.C., et al.** 1992. Correction of the apical membrane chloride permeability defect in polarized cystic fibrosis airway epithelia following retroviral-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 3:253-266.
111. **Oomens, A.G. and G.W. Blissard.** 1999. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* 254:297-314.
112. **Oomens, A.G. and G.W. Wertz.** 2004. The baculovirus GP64 protein mediates highly stable infectivity of a human respiratory syncytial virus lacking its homologous transmembrane glycoproteins. *J Virol* 78:124-135.
113. **Ostedgaard, L.S., et al.** 2005. A shortened adeno-associated virus expression cassette for CFTR gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2952-2957.
114. **Pedersen, I.R.** 1973. Different classes of ribonucleic acid isolated from lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 11:416-423.
115. **Petersen, J.M., et al.** 2000. The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* 20:8590-8601.
116. **Pfeifer, J.B. and R.W. Compans.** 1984. Structure of the influenza C glycoprotein gene as determined from cloned DNA. *Virus Res* 1:281-296.
117. **Pickles, R.J.** 2004. Physical and biological barriers to viral vector-mediated delivery of genes to the airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc* 1:302-308.
118. **Pleschka, S., et al.** 1995. The catalytic triad of the influenza C virus glycoprotein HEF esterase: characterization by site-directed mutagenesis and functional analysis. *J Gen Virol* 76 (Pt 10):2529-2537.
119. **Popescu, M., et al.** 1979. Infectious lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis virus carrier mice. *J Gen Virol* 42:481-492.
120. **Preble, O.T. and J.S. Youngner.** 1975. Temperature-sensitive viruses and the etiology of chronic and inapparent infections. *J Infect Dis* 131:467-473.

121. **Probst, I.** 2005. Das Matrix-Protein des Virus der vesikulären Stomatitis: Expression und Lokalisation in polarisierten Epithelzellen. *In* Universität Hannover, Hannover.
122. **Publicover, J., et al.** 2005. A single-cycle vaccine vector based on vesicular stomatitis virus can induce immune responses comparable to those generated by a replication-competent vector. *J Virol* 79:13231-13238.
123. **Quinton, P.M.** 1999. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev* 79:S3-S22.
124. **Reverey, H., et al.** 1996. Differential fatty acid selection during biosynthetic S-acylation of a transmembrane protein (HEF) and other proteins in insect cells (Sf9) and in mammalian cells (CV1). *J Biol Chem* 271:23607-23610.
125. **Riordan, J.R., et al.** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073.
126. **Roberts, A., et al.** 1998. Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge. *J Virol* 72:4704-4711.
127. **Robison, C.S. and M.A. Whitt.** 2000. The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *J Virol* 74:2239-2246.
128. **Rodriguez, J.E. and W. Henle.** 1964. Studies on Persistent Infections of Tissue Cultures. V. The Initial Stages of Infection of L(Mcn) Cells by Newcastle Disease Virus. *J Exp Med* 119:895-921.
129. **Rodriguez-Boulan, E. and S.K. Powell.** 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol* 8:395-427.
130. **Romanowski, V., et al.** 1985. Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Res* 3:101-114.
131. **Rose, N.F., et al.** 2000. Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 74:10903-10910.
132. **Rosenfeld, M.A., et al.** 1992. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 68:143-155.
133. **Rosenthal, P.B., et al.** 1998. Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus. *Nature* 396:92-96.
134. **Sakaguchi, T., et al.** 1999. Double-layered membrane vesicles released from mammalian cells infected with Sendai virus expressing the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Virology* 263:230-243.

135. **Sambrook, J. and W.C. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
136. **Sanchez, A., et al.** 1996. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3602-3607.
137. **Sandrin, V., et al.** 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100:823-832.
138. **Sasaki, K., et al.** 2005. Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther* 12:203-210.
139. **Schauber, C.A., et al.** 2004. Lentiviral vectors pseudotyped with baculovirus gp64 efficiently transduce mouse cells in vivo and show tropism restriction against hematopoietic cell types in vitro. *Gene Ther* 11:266-275.
140. **Schnell, M.J., et al.** 1998. Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *Embo J* 17:1289-1296.
141. **Schnell, M.J., et al.** 1996. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11359-11365.
142. **Schwartz, J.A., et al.** 2007. Vesicular stomatitis virus vectors expressing avian influenza H5 HA induce cross-neutralizing antibodies and long-term protection. *Virology* 366:166-173.
143. **Shahwan, K.** 2006. Das Matrix-Protein des Virus der vesikulären Stomatitis und seine Interaktion mit zellulären Proteinen. *In* Universität Hannover, Hannover.
144. **Sherman, K.E. and A.H. McIntosh.** 1979. Baculovirus replication in a mosquito (dipteran) cell line. *Infect Immun* 26:232-234.
145. **Sinn, P.L., et al.** 2005. Persistent gene expression in mouse nasal epithelia following feline immunodeficiency virus-based vector gene transfer. *J Virol* 79:12818-12827.
146. **Sinn, P.L., et al.** 2003. Lentivirus vectors pseudotyped with filoviral envelope glycoproteins transduce airway epithelia from the apical surface independently of folate receptor alpha. *J Virol* 77:5902-5910.
147. **Stanley, C., et al.** 1991. Gene transfer into rat airway epithelial cells using retroviral vectors. *Somat Cell Mol Genet* 17:185-190.
148. **Stanners, C.P., et al.** 1977. Analysis of VSV mutant with attenuated cytopathogenicity: mutation in viral function, P, for inhibition of protein synthesis. *Cell* 11:273-281.

149. **Stein, C.S., et al.** 2005. The lymphocytic choriomeningitis virus envelope glycoprotein targets lentiviral gene transfer vector to neural progenitors in the murine brain. *Mol Ther* 11:382-389.
150. **Steinmann, E.** 2004. Das Matrix-Protein der vesikulären Stomatitis: Bedeutung für polare Virusfreisetzung, Cytopathogenität und Apoptose. *In* Universität Hannover, Hannover.
151. **Strobl, B. and R. Vlasak.** 1993. The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is required for entry into target cells. *Virology* 192:679-682.
152. **Su, X., et al.** 2006. Interregulation of proton-gated Na(+) channel 3 and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 281:36960-36968.
153. **Sun, X., et al.** 2005. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338:53-60.
154. **Sutter, G. and B. Moss.** 1995. Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev Biol Stand* 84:195-200.
155. **Sutter, G., et al.** 1995. Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* 371:9-12.
156. **Szepanski, S., et al.** 1994. Post-translational folding of the influenza C virus glycoprotein HEF: defective processing in cells expressing the cloned gene. *J Gen Virol* 75 (Pt 5):1023-1030.
157. **Takada, A., et al.** 2003. Identification of protective epitopes on ebola virus glycoprotein at the single amino acid level by using recombinant vesicular stomatitis viruses. *J Virol* 77:1069-1074.
158. **Takada, A., et al.** 2004. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol* 78:2943-2947.
159. **Takada, A., et al.** 1997. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14764-14769.
160. **Takeda, M., et al.** 2003. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14610-14617.
161. **Tani, H., et al.** 2007. Replication-Competent Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Encoding Hepatitis C Virus Envelope Proteins. *J Virol*.
162. **Taylor, R.M.** 1951. A further note on 1233 influenza C virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 4:485-500.
163. **Thomas, D.C., et al.** 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J Biol Chem* 268:3313-3320.

164. **Veit, M., et al.** 1990. The hemagglutinating glycoproteins of influenza B and C viruses are acylated with different fatty acids. *Virology* 177:807-811.
165. **Veit, M., et al.** 1996. Cytoplasmic tail length influences fatty acid selection for acylation of viral glycoproteins. *Biochem J* 318 (Pt 1):163-172.
166. **Vlasak, R., et al.** 1987. The influenza C virus glycoprotein (HE) exhibits receptor-binding (hemagglutinin) and receptor-destroying (esterase) activities. *Virology* 160:419-425.
167. **Vlasak, R., et al.** 1989. Influenza C virus esterase: analysis of catalytic site, inhibition, and possible function. *J Virol* 63:2056-2062.
168. **Volchkov, V.E., et al.** 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5762-5767.
169. **Wagner, R., et al.** 2005. Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. *J Virol* 79:6449-6458.
170. **Wagner, R.R. and J.K. Rose.** 1996. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. *In* B.N. Fields, P.N. Knipe, P.M. Howley and e. al. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
171. **Wagner, R.R., et al.** 1969. Protein composition of the structural components of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 3:611-618.
172. **Wang, G., et al.** 2005. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:186-191.
173. **Wang, X., et al.** 1998. [The envelope formation of AcMNPV and the location of envelope protein gp64 in host cell]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 38:331-335.
174. **Waterson, A.P., et al.** 1963. The fine structure of influenza A, B and C viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* 12:487-495.
175. **Watson, D.J., et al.** 2002. Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. *Mol Ther* 5:528-537.
176. **Whitt, M.A., et al.** 1989. Glycoprotein cytoplasmic domain sequences required for rescue of a vesicular stomatitis virus glycoprotein mutant. *J Virol* 63:3569-3578.
177. **Witko, S.E., et al.** 2006. An efficient helper-virus-free method for rescue of recombinant paramyxoviruses and rhabdoviruses from a cell line suitable for vaccine development. *J Virol Methods* 135:91-101.
178. **Wittig, B., et al.** 2001. Therapeutic vaccination against metastatic carcinoma by expression-modulated and immunomodified autologous tumor cells: a first clinical phase I/II trial. *Hum Gene Ther* 12:267-278.

179. **Wollmann, G., et al.** 2005. Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J Virol* 79:6005-6022.
180. **Wool-Lewis, R.J. and P. Bates.** 1999. Endoproteolytic processing of the ebola virus envelope glycoprotein: cleavage is not required for function. *J Virol* 73:1419-1426.
181. **Yang, Z.Y., et al.** 2000. Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat Med* 6:886-889.
182. **Ye, Z., et al.** 1994. Membrane-binding domains and cytopathogenesis of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 68:7386-7396.
183. **Yonemitsu, Y., et al.** 2000. Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol* 18:970-973.
184. **Yoshimura, K., et al.** 1992. Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res* 20:3233-3240.
185. **Yoshizaki, M., et al.** 2006. Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J Gene Med* 8:1151-1159.
186. **Zabner, J., et al.** 1993. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75:207-216.
187. **Zhang, L., et al.** 2002. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol* 76:5654-5666.
188. **Zhang, S.X., et al.** 2003. Palmitoylation of the *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus envelope glycoprotein GP64: mapping, functional studies, and lipid rafts. *J Virol* 77:6265-6273.
189. **Zimmer, G., et al.** 1992. Use of influenza C virus for detection of 9-O-acetylated sialic acids on immobilized glycoconjugates by esterase activity. *Eur J Biochem* 204:209-215.
190. **Zimmer, G., et al.** 2002. Vesicular stomatitis virus glycoprotein does not determine the site of virus release in polarized epithelial cells. *J Virol* 76:4103-4107.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn PD Dr. Gert Zimmer danken, der die Durchführung der Arbeit am Lehrstuhl für Virologie ermöglichte und stets Interesse am Fortgang der Forschungsarbeiten zeigte.

Herrn Prof. Dr. Jacobsen und Herrn Prof. Dr. M. Messerle danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten bzw. als Beisitzer zu fungieren.

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Virologie bedanken. Insbesondere war es ein schrulliges Vergnügen, mit Julia Eckardt-Michel zusammenzuarbeiten und mit ihr ein Büro zu teilen.

Meiner Familie, die mir das Studium ermöglichte und mich während dessen unterstützte und aufmunterte, möchte ich ebenfalls an dieser Stelle herzlich danken. Außerdem danke ich den Korrekturlesern, die meine Arbeit vor unzähligen Semikolons bewahrt und sich tapfer durch den Fremdwörter-Dschungel gekämpft haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Amadeus Meinhardt, der mich in jeglicher Form unterstützt hat, nicht nur in den letzten Wochen des Zusammenschreibens.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname: Alexandra
Nachname: Hey
Geburtsdatum: 25.04.1980
Geburtsort: Dortmund

Schulausbildung

1986 – 1990 Osterfeld-Grundschule, Dortmund
1990 – 1999 Heisenberg-Gymnasium, Dortmund
1999 Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1999 – 07/2004 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität-Bochum, Bochum
09/2001 Diplom-Vorprüfung
06/2003 Mündliche Diplomprüfungen;
Schwerpunkte: Biochemie, Genetik und Zellbiologie
08/2003-07/2004 Anfertigung der Diplom-Arbeit an der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität-Bochum; Thema: Entwicklung von Mausadenovirus-1 (MAV-1) basierenden Gentransfervektoren
07/2004 Abschluss des Studiums Diplom-Biologie
09/2004 Beginn der Dissertation am Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover; Thema: Entwicklung viraler Vektoren für den gentherapeutischen Einsatz in der Lunge; Mitglied des SFB 587: Immunreaktionen der Lunge bei Infektion und Allergie

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Entwicklung viraler Vektoren für den gentherapeutischen Einsatz in der Lunge“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 25. Oktober 2007

Alexandra Hey