Etablierung und Charakterisierung eines pseudotypisierten retroviralen Gentransfer-Systems mit Selektivität für den Hepatocyten-spezifisch exprimierten Asialoglycoprotein-Rezeptor

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

Martin Spiegel

Tag der mündlichen Prüfung:	14.01.2000
Dekan:	Prof. Dr. U. Nagel
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Gebhardt
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke

Indes weiß man so viel als gar nichts von dem Ganzen in allen Dingen, es sei denn mit Hilfe der Einzelheiten, und die Natur ist für den Menschen nur eine Sammlung von sibyllinischen Blättern, welche zerstreut sind und bis auf den heutigen Tag nicht zu einem Buche haben vereinigt werden können.
Madame de Staël, 1813

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Spiegel, M.; Bitzer, M.; Schenk, A.; Rossmann, H.; Neubert, W. J.; Seidler, U.; Gregor, M. & Lauer, U.(1998). Pseudotype formation of Moloney murine leukemia virus with Sendai virus glycoprotein F, *J. Virol.* **72:** 5296–5302.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die diese Doktorarbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. R. Gebhardt, jetzt Direktor des Biochemischen Instituts der Universität Leipzig, danke ich ganz herzlich für die bereitwillige Übernahme der Leitung und Betreuung meiner Doktorarbeit. Bei Herrn Prof. Dr. M. Gregor, Leiter der Abteilung für Innere Medizin I der Medizinischen Klinik, bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in die Gastroenterologischen Forschungslabors seiner Abteilung und sein stetiges Interesse an meiner Arbeit. Herrn Dr. U. Lauer, Abteilung für Innere Medizin I der Medizinischen Klinik, in dessen Labor diese Arbeit durchgeführt wurde, verdanke ich weit mehr als nur die Themenstellung. Seine Vorschläge und Hilfestellungen waren ein entscheidender Beitrag zu meiner Arbeit; sie gaben diesem Projekt Form und Richtung, ließen aber auch die Freiheit zur Entwicklung und Umsetzung eigener Ideen.

Weiterhin möchte ich mich bei A. Schenk bedanken, die einen erheblichen Anteil am Gelingen dieses Projekts hatte. Neben ihrer umfangreichen Mithilfe bei allen Zellkulturexperimenten verdanke ich ihr die Umsetzung praktisch aller im Laufe der Experimente notwendig gewordenen Klonierungen und PCR-Experimente. Bei Dr. F. T. C. Graepler, C. D. Groß, F. Prinz und W. A. Wybranietz bedanke ich mich für ihre Mithilfe in Form vieler Anregungen zu den durchgeführten Experimenten, aber auch für ihre ganz handfeste und praktische Beteiligung an diesen, wenn Not am Mann war. Bei H. Roßmann aus der Arbeitsgruppe von Dr. U. Seidler bedanke ich mich für die unerläßliche Hilfe bei RNA-Isolierungen sowie bei der Planung und Umsetzung der durchgeführten PCR-Experimente. Dr. M. Bitzer aus unserer Arbeitsgruppe sei an dieser Stelle noch einmal für seine exzellente Einführung in virologische Arbeitsmethoden während meiner Diplomarbeit gedankt, die die Grundlage für alle Virusexperimente dieser Doktorarbeit war, sowie für sein Interesse und seine Ideen und Anregungen zu diesem Projekt. Bei der gesamten Arbeitsgruppe von PD Dr. W. J. Neubert am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München möchte ich mich für ihre Hilfe rund um das Sendai Virus bedanken. Stellvertretend sei hier Dr. S. Fischer genannt, der ich u. a. eine Reihe von Sendai Virus F-Protein Expressionskonstrukten, verschiedene Zellinien und zahlreiche Tips zum Western Blotting verdanke.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und Geschwister, die nicht zuletzt durch hartnäckiges Nachfragen dafür gesorgt haben, daß die schriftliche Abfassung dieser Doktorarbeit ein glückliches Ende gefunden hat.

Zusammenfassung

Zukünftige lebergentherapeutische Anwendungen an größeren Patientenpopulationen erfordern die Anwendung leberrestringierter *in vivo* Gentransfer-Systeme. Die derzeit verwendeten amphotropen Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) Vektoren sind aufgrund ihres breiten Transduktionsspektrums für *in vivo* Applikationen nicht geeignet.

In diesem Zusammenhang wurde versucht, durch Einbau eines heterologen Hüllproteins die Spezifität von ecotropen MoMLV Vektoren so zu verändern, daß es zu einer spezifischen Transduktion von Zellen mit Hepatocyten-spezifischen Oberflächenproteinen kommt. Ausgangsbasis war die Beobachtung, daß eine spezielle Mutante des Sendai Virus (SeV) nur noch Zellen infiziert, die den leberspezifischen Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGP-R) exprimieren, wohingegen SeV-Wildtyp ein pantropes Wirtsspektrum besitzt. Als Rezeptorprotein für den ASGP-R fungiert hierbei das SeV-Fusionsglycoprotein (F-Protein), das das einzige Protein in der Hülle der Mutantenform darstellt. Dagegen besitzt SeV-Wildtyp noch ein zweites Hüllprotein, die Hämagglutinin-Neuraminidase (HN), die an einen ubiquitären Rezeptor (Sialinsäurehaltige Ganglioside) auf der Oberfläche von Säugerzellen bindet. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, daß sich beide SeV-Hüllproteine gleichzeitig in die Hülle von Retrovirus-Partikeln inkorporieren lassen.

Zunächst wurde mit Hilfe von Cotransfektionsexperimenten nachgewiesen, daß der nach der Transfektion eines retroviralen Vektors und eines SeV-F Expressionsplasmids in retrovirale Verpackungszellen gewonnene Virusüberstand zur Transduktion ASGP-R exprimierender Zellen eingesetzt werden kann. Dies stellt den funktionellen Nachweis für die Bildung funktioneller MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen dar.

Weiterhin wurde eine – stabil das SeV-F Protein exprimierende – ecotrope, retrovirale Verpackungszellinie erzeugt. Durch RT-PCR und Western Blotting konnte auf Transkriptions- und Translationsebene eine stabile Expression des SeV-F Proteins nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, daß diese Zellinie nach wie vor in der Lage ist, funktionelle Retroviruspartikel zu sezernieren. Nach Transfektion mit einem retroviralen Vektor konnte ein Virusüberstand gewonnen werden, mit dessen Hilfe sich die Mäusefibroblastenzellinie NIH 3T3 transduzieren ließ.

Zudem war es möglich, mit diesem Virusüberstand *auch* die ASGP-R positiven humanen Hepatomzellinien HepG2 und HuH7 zu transduzieren, wohingegen Zellinien, die weder den ASGP-R noch den ecotropen Rezeptor exprimieren (z. B. BHK-21 und MDCK) einer Transduktion *nicht* zugänglich waren. Zum anderen konnte ein direkter Nachweis der Spezifität durch Transduktion von stabil mit der ASGP-R cDNA transfizierten MDCK-Zellen geführt werden; ASGP-R negative Ausgangszellen waren dagegen nicht transduzierbar. Darüberhinaus konnte die ASGP-R vermittelte Transduktion durch polyklonales – gegen den humanen ASGP-R gerichtetes – Serum gehemmt werden, wohingegen dieses Antiserum die Transduktion mit ecotropen Retroviren nicht beeinflußte. Diese Experimente stellen somit auch einen indirekten Nachweis für den singulären Einbau des SeV-F Proteins in die retrovirale Hülle dar, der zu einer spezifischen Erweiterung des Transduktionsspektrums auf Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGP-R) positive Zellen führt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine verbesserte Ansteuerung des ASGP-R zu einer signifikanten Erhöhung der MoMLV(SeV-F)-Pseudotyptiter führt. Da der ASGP-R fast ausschließlich basolateral exprimiert wird, ist bei konventioneller Transduktion nur ein Bruchteil der Rezeptormoleküle für die Pseudotyppartikel zugänglich. Daher wurden Durchflußtransduktionen durchgeführt, bei denen die Viruspartikel die komplette Zelloberfläche erreichen. Mit Hilfe dieser Methode konnte eine Steigerung des Titers bei SeV-F/ASGP-R vermittelten Transduktionen erreicht werden, die bei Ansteuerung des ecotropen Rezeptors nicht erzielt werden konnten.

Mit den in dieser Arbeit etablierten ASGP-R spezifischen MoMLV(SeV-F) Pseudotypvektoren steht somit ein retrovirales Vektorsystem zur Verfügung, das aufgrund seiner Rezeptorspezifität neue Möglichkeiten für den zukünftigen leberrestringierten retroviralen *in vivo* Gentransfer eröffnet.

Kapitel 1

Einleitung

Die Entwicklung gentechnischer Methoden in den letzten Jahrzehnten hat zu einer tiefgreifenden Umgestaltung der Medizin geführt. Die größten Fortschritte wurden dabei auf dem Gebiet der Diagnose vererbter oder erworbener Krankheiten und der Erzeugung neuer Medikamente durch Überexpression spezifischer Gene in gentechnisch veränderten Organismen gemacht. Mit Hilfe der Gentechnik gelang es weiterhin, bei einer großen Zahl von Krankheiten die Rolle einzelner Genprodukte in der Pathogenese aufzuklären, wobei diese Erkenntnisse teilweise auch für eine verbesserte Behandlung ausgenutzt werden konnten. Dagegen steht die Gentherapie, d. h. die Behandlung von Erkrankungen durch Transfer von genetischer Information in spezifische Zellen eines Patienten, noch am Beginn ihrer Entwicklung. Obwohl es sich bei theoretischer Betrachtung um das nächstliegende Einsatzgebiet gentechnischer Methoden handelt und die Methode bei genetischen Defekten an der eigentlichen Ursache der Erkrankung ansetzt, müssen bis zum regelmäßigen Einsatz in der klinischen Praxis noch zahlreiche Probleme gelöst und neue Techniken entwickelt werden (Übersicht in Verma & Somia, 1997; Anderson, 1998). Der gentherapeutische Ansatz beschränkt sich nicht nur auf den Versuch, genetische Defekte wie z. B. erbliche Hypercholesterinämie, Haemophilie B oder Adenosin-Desaminase-Defizienz zu korrigieren. Besonders für den Bereich der Krebs-Gentherapie sind bereits zahlreiche klinische Protokolle entwickelt worden, die zumeist auf eine Verstärkung der tumorspezifischen Immunantwort oder auf eine selektive Zerstörung der Tumorzellen durch Erzeugung toxischer Metaboliten abzielen (Office of Recombinant DNA Activities, NIH, Bethesda, MD, 1998). Ein Hauptnachteil der bestehenden Gentherapie-Verfahren beruht auf der mangelnden Spezifität der verwendeten Gentransfer-Systeme. Diese Tatsache zwingt in den meisten Fällen zu einer *ex vivo* Gentherapie, d. h. die zu manipulierenden Zellen müssen dem Patienten entnommen, der Gentransfer *in vitro* durchgeführt und die genetisch korrigierten bzw. modifizierten Zellen wieder in den Patienten eingebracht werden. Abgesehen vom Aufwand und den damit verbundenen Risiken bleiben dem gentherapeutischen Ansatz dadurch zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten verschlossen. Eine wichtige Aufgabe ist es daher, Gentransfer-Systeme mit größtmöglicher Gewebespezifität zu entwickeln, die den Übergang zur gezielten, geweberestringierten *in vivo* Gentherapie erlauben.

1.1 Gentransfer-Systeme

Der gezielte Transfer genetischer Information in eukaryontische Zellen begann mit der Entdeckung, daß sich virale DNA bzw. RNA mit Hilfe von DEAE-Dextran oder Calciumphosphat in Zellen einschleusen läßt (Vaheri & Pagano, 1965; McCutchan & Pagano, 1968; Warden & Thorne, 1968; Graham & van der Eb, 1973). Im Laufe der Jahre wurde eine große Anzahl solcher Transfektionsmethoden entwickelt, die auf so unterschiedliche Substanzen wie Polyethylenimin (Boussif et al., 1995), Polybrene (Kawai & Nishizawa, 1984), Lipidgemische (Felgner et al., 1994) und aktivierte Dendrimere (Tang et al., 1996) zurückgreifen; aber auch physikalische Methoden wie die Elektroporation (Neumann et al., 1982) wurden und werden erfolgreich für den Gentransfer eingesetzt. Obwohl mit diesen Methoden *in vitro* zum Teil sehr hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden können, ist nur ein Teil von ihnen auch *in vivo* einsetzbar und dann nur mit geringer Effizienz. Ein weiterer Nachteil aller chemisch-physikalischen Systeme ist die Tatsache, daß die Expression der eingebrachten Gene überwiegend nur transient erfolgt, da in der Regel keine Verankerung im Wirtszellgenom stattfindet. Man kann zwar die stabile Expression des Transgens durch geeignete Selektionsverfahren erzwingen, aber nur ein Bruchteil der ursprünglich transfizierten Zellen zeigt dann die gewünschte stabile Genexpression; darüber hinaus sind solche Selektionsverfahren *in vivo* nur sehr begrenzt einsetzbar.

Daher wurde schon bald nach alternativen Methoden für einen effizienteren Gentransfer in eukaryontische Zellen gesucht. Basierend auf der Überlegung, daß Viren als hocheffiziente Systeme für den Transfer und die Replikation von Genen angesehen werden können, begann die Entwicklung viraler Gentransfer-Systeme (Übersicht in Anderson, 1984). Voraussetzung für einen Einsatz viraler Systeme war hierbei:

- Methoden zur gezielten Manipulation des viralen Genoms zu entwickeln, die den Einbau zu transferierender Gene erlauben,
- sicherzustellen daß das verwendete Virus apathogen für den Empfänger ist, und
- zu gewährleisten, daß sich das als Genfähre verwendete Virus im Empfänger nicht unkontrolliert vermehrt.

Im Laufe der letzten zwanzig Jahre wurde eine Reihe viraler Gentransfer-Systeme entwickelt, die diese Voraussetzungen ganz oder teilweise erfüllen.

1.1.1 Retrovirale Gentransfer-Systeme

Retroviren sind neben Adenoviren die am häufigsten als Gentransfersystem eingesetzten Viren. Grundlage der meisten retroviralen Systeme ist das Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV), das bei neugeborenen Mäusen innerhalb von drei Monaten nach Infektion zur Entwicklung eines T-Zell-Lymphoms führt (Shinnick et al., 1981). In letzter Zeit kommen aber auch vermehrt lentivirale Systeme auf Basis von Human Immunodeficiency Virus (HIV) zum Einsatz (Naldini et al., 1996), die im Gegensatz zu anderen Retroviren (und damit auch MoMLV; Miller et al., 1990) den Gentransfer in ruhende Zellen erlauben (Gallay et al., 1995; Gallay et al., 1997). Retroviren sind (+)-Strang-RNA Viren, deren Replikationszyklus zwei Besonderheiten aufweist (Temin, 1985):

- Nach Bindung und Eindringen des Virus in die Zielzelle wird das virale RNA-Genom in DNA umgeschrieben, also *revers* transkribiert. Hierbei findet eine Verdoppelung der Steuersequenzen am 5'- und 3'-Ende statt, so daß die Strukturgene im entstandenen DNA-Intermediat (dem sogenannten Provirus) von identischen Sequenzen, den Long Terminal Repeats (LTR), flankiert sind.
- Das nach der reversen Transkription vorliegende doppelsträngige DNA-Intermediat integriert stabil in das Genom der Wirtszelle.

Die Transkription des Provirus, die im 5' LTR initiiert und im 3' LTR beendet wird, führt zur Bildung der viralen mRNAs und der genomischen RNA, d. h. die LTRs enthalten die für die Transkription notwendigen Signale. Nach Translation der mRNAs kommt es zur Verpackung der genomischen RNA in das reifende Nucleocapsid. Das *env*-Vorläuferprotein enthält ein Signalpeptid, das dem Eintransport ins endoplasmatische Reticulum dient. Nach Abspaltung des Signalpeptids und Prozessierung (dabei entstehen das reife SU- und TM-Protein) erfolgt der Export zur Zellmembran, in der die Hüllproteine über eine carboxyterminale hydrophobe Sequenz verankert werden. Nach Interaktion der *env*-Proteine mit Proteinen des Nucleocapsids kommt es zur Abschnürung kompletter Virus-Partikel, d. h. die Virus-Hülle enthält zelluläre Membranbestandteile, wobei es aber so gut wie nicht zum Einbau zellulärer Membranproteine in die virale Hülle kommt (Simons & Garoff, 1980). Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung des retroviralen Replikationszyklus.

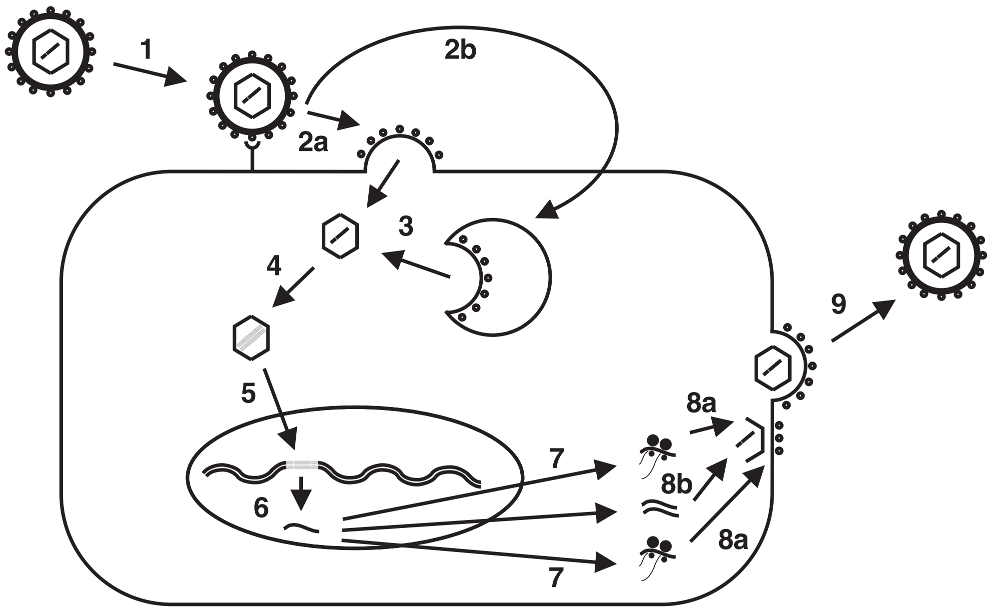

Abbildung 1.1: Schema des retroviralen Replikationszyklus. Nach der Bindung an den Rezeptor (1) kommt es zum Eindringen des Virions entweder durch direkte Menbranfusion (2a) oder Rezeptorvermittelte Endocytose (2b) und zur Feisetzung des Nucleocapsids (3). Einer der beiden (identischen) RNA-Genomstränge wird dann revers in doppelsträngige DNA transkribiert (4). Es folgt die Integration ins Wirtszellgenom (5, sogenanntes Provirus) und anschließende Transkription (6). Die gebildete RNA (Vollänge und gespleißt) dient zur Translation der Virusproteine (7), die in die reifenden Viruspartikel eingebaut werden (8a), bzw. wird als Genom in die reifenden Nucleocapside verpackt (8b, zwei Vollänge-RNAs je Viruspartikel). Abschließend kommt es zur Abschnürung der neugebildeten Viruspartikel (9). Abbildung nach Coffin (1990).

Für den Einsatz als Gentransfersystem bestehen bei Retroviren mehr Anpassungs- und Modifikationsmöglichkeiten als bei anderen viralen Gentransfer-Systemen (Miller et al., 1993). In diesem Zusammenhang zu nennen sind:

- Die retroviralen Strukturgene und das retrovirale Genom können als voneinander unabhängige Einheiten behandelt werden. Als retrovirales Genom kann hierbei jede Sequenz dienen, die die Steuerelemente für die Verpackung, Expression und Integration in der richtigen Anordnung beinhaltet. Die Anwesenheit retroviraler Strukturgene ist nicht nowendig, stattdessen kann jedes gewünschte Gen eingesetzt weden, wobei lediglich eine Größengrenze von ca. 8 kb zu beachten ist.

- Werden die retroviralen Strukturgene in geeigneten Zellen zur Expression gebracht (den sog. Verpackungszellen) und diese Zellen zusätzlich mit einem rekombinanten retroviralen Genom ausgestattet, so kommt es zur Bildung von Retroviren. Das Genom kann also *in trans* beigesteuert werden.

- Da für die Expression der Strukturgene das Verpackungssignal (ψ) *nicht* notwendig ist, kann durch seine Deletion die Bildung replikationskompetenter Viruspartikel bei gleichzeitiger Expression der Strukturgene verhindert werden. Damit lassen sich vollständige, „infektiöse“ Viruspartikel erzeugen, deren rekombinantes Genom aber keine retroviralen Gene mehr enthält. Solche Viruspartikel können ihr Genom „nur“ noch stabil auf Zielzellen übertragen; eine Virusvermehrung kann in den Zielzellen aufgrund der fehlenden Strukturgene nicht stattfinden. Daher spricht man in diesem Zusammenhang von Transduktion und nicht mehr von Infektion.

- Das ursprüngliche Hüllprotein des Retrovirus kann durch heterologe Hüllproteine ersetzt werden, womit die Spezifität für Zielzellen verändert werden kann.

In Abbildung 1.2 sind die Eigenschaften eines solchen Systems zur Generierung rekombinanter Retroviren schematisch dargestellt.

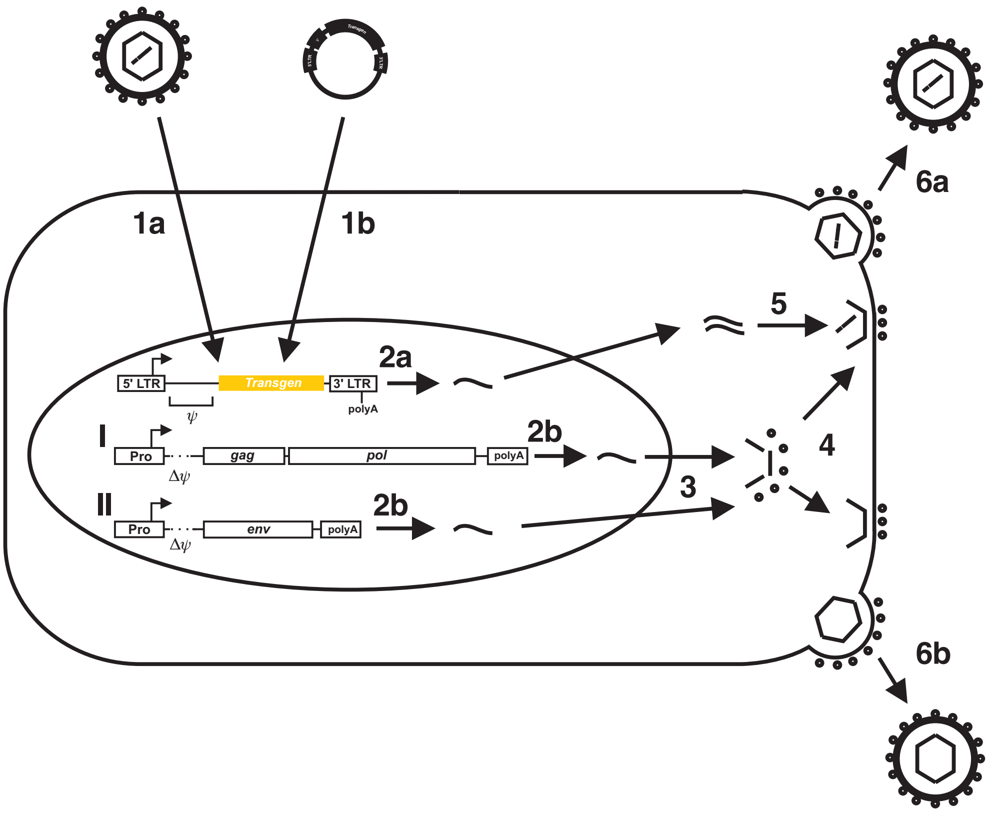

Abbildung 1.2: Generierung rekombinanter Retroviren. Das rekombinante Genom wird mit Hilfe einer Transduktion (1a, in Form einer verpackten, viralen RNA) oder Transfektion (1b, in Form einer Provirus Plasmid-DNA) in Verpackungszellen eingebracht. Diese enthalten – stabil im Genom integriert – Konstrukte (I und II) zur konstitutiven Expression (2b, 3) der retroviralen Strukturgene (*gag, pol, env*), bei denen u. a. das retrovirale Verpackungssignal deletiert wurde ($\Delta\psi$). Das eingebrachte rekmbinante Genom wird transkribiert (2a) und aufgrund des vorhandenen Verpackungssignals (ψ) in reifende Viruspartikel (4) verpackt (5), so daß es zur Bildung vollständiger rekombinanter Virionen kommt (6a). In Abwesenheit eines Genoms mit Verpackungssignal bildet die Verpackungszelle lediglich Genom-freie, leere Viruspartikel (6b). Abbildung nach Valerio (1992).

1.2 Virale Pseudotypen

Der Einbau fremder Proteine in die Hülle eines Virus ist ein natürlich vorkommendes Phänomen, das bei der gleichzeitigen Infektion einer Zelle mit zwei unterschiedlichen behüllten Viren auftreten kann und als Pseudotypisierung bezeichnet wird (Übersicht in Zavada, 1982). Dabei können sowohl Pseudotyppartikel, die das eigene und das fremde Hüllprotein in ihrer Hülle tragen, als auch solche, die ausschließlich das fremde Hüllprotein besitzen, entstehen. Dieses Prinzip läßt sich mit Hilfe gentechnischer Methoden für eine gezielte Veränderung des Tropismus viraler Gentransfer-Systeme einsetzen. So wird bei retroviralen Systemen die auf MoMLV basieren, in der Regel das originale Hüllprotein ersetzt, da es von einem Rezeptor (Rec-1, einem Transporter für basische Aminosäuren) erkannt wird, der nur bei Mäuse- und Rattenzellen vorkommt (Albritton et al., 1989; Kim et al., 1991; Wang et al., 1991). Hierbei wird zum einen auf Hüllproteine anderer Retroviren (Beispiele sind das amphotrope Hüllprotein des endogenen Maus Retrovirus 4070A, und das Hüllprotein des Gibbon Ape Leukemia Virus, Übersicht in Miller, 1996) aber auch auf Hüllproteine nicht-verwandter Viren zurückgegriffen; hier ist in erster Linie das G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) zu nennen (Burns et al., 1993). Den genannten Hüllproteinen ist gemeinsam, daß die zugehörigen Rezeptoren u. a. auch bei humanen Zellen vorkommen und somit eine retroviral-vermittelte Transduktion dieser Zellen möglich wird.

1.3 Gewebespezifischer Gentransfer

Die genannten pseudotypisierten retroviralen Gentransfer-Systeme erlauben zwar die Transduktion humaner Zellen, weisen aber keine Spezifität für bestimmte Gewebe auf. Sie sind daher im wesentlichen nur für den *ex vivo* Gentransfer geeignet, bei dem die zu transduzierenden Zellen vor der Transduktion isoliert werden müssen. Es wurden daher verschiedene Ansätze für den gewebespezifischen retroviralen Gentransfer entwickelt. Diese Ansätze lassen sich einerseits in Versuche unterteilen, durch Verwendung gewebespezifischer Promotoren eine gewebespezifische Expression zu erreichen und andererseits in Versuche, durch Modifikation der retroviralen Hülle einen Gentransfer von vornherein auf bestimmte Gewebe zu beschränken. Hierbei reichen die angewandten Methoden von der chemischen Modifikation retroviraler Hüllproteine (Neda et al., 1991) über den Einsatz von Fusionsproteinen (z. B. aus retroviralen Hüllproteinen und gewebespezifischen Antikörpern, Somia et al., 1995, oder einem zweiten Virushüllprotein, Demine & Emerman, 1993; Schnierle et al., 1997) bis hin zu Versuchen, durch Mutation der Bindungsdomänen der retroviralen Hüllproteine den Tropismus zu verändern (Valesia-Wittmann et al., 1996).

1.3.1 Leberspezifischer Gentransfer

Für eine spezifische Transduktion von Hepatocyten bietet sich als anzusteuernder Rezeptor der Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGP-R) an, da seine Expression weitestgehend auf die Leber begrenzt ist (Spiess, 1990). Der humane Rezeptor ist aus den Untereinheiten H1 und H2 aufgebaut, wobei zwei H1-Untereinheiten und eine H2-Untereinheit ein funktionelles Trimer bilden (Bischoff et al., 1988). Die Aufgabe dieses Rezeptors besteht in der Erkennung von gealterten Serum-Proteinen. Als Erkennungsmerkmal dient hierbei der Verlust der endständigen Sialinsäure in den Zuckerseitenketten von Glycoproteinen. Aufgrund des einheitlichen Glycosylierungsmusters folgt auf die Sialinsäure stets Galactose. Glycoproteine mit endständigen Galactose-Resten werden vom ASGP-R gebunden, anschließend zusammen mit dem Rezeptor internalisiert und abgebaut, während der freie Rezeptor wieder zurück zur Zelloberfläche transportiert wird. Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Wechselwirkung desialysierter Glycoproteine mit dem ASGP-R. Für verschiedene Viren (Hepatitis B Virus, Marburg

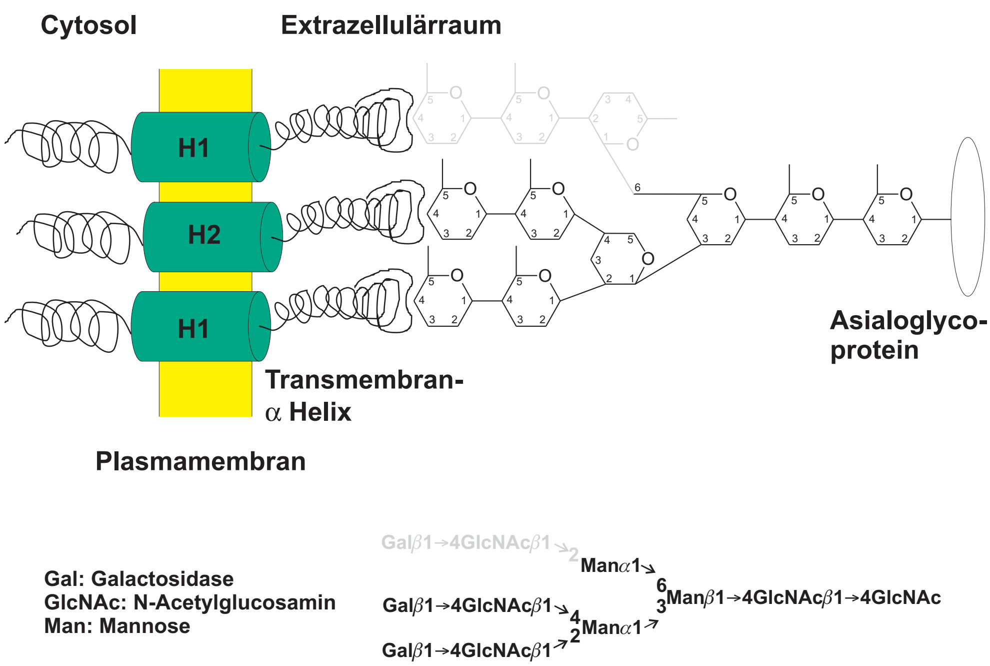

Abbildung 1.3: Schema des Asialoglycoprotein-Rezeptors. Dargestellt ist die Interaktion des Rezeptors mit den Zuckerseitenketten eines Asialoglycoproteins. Für eine spezifische Interaktion reichen die dunkel dargestellten Zuckerseitenketten aus, die Anwesenheit einer dritten (hell dargestellten) Seitenkette mit endständiger Galactose erhöht die Effektivität der Interaktion (Balaji et al., 1993).

Virus und Sendai Virus) ist eine Interaktion mit dem ASGP-R beschrieben (Markwell et al., 1985; Treichel et al., 1994; Becker et al., 1995). Bei Glycoproteinen in der Hülle von Sendai Virus (SeV) und Marburg Virus wurden die entsprechenden Zuckerseitenketten nachgewiesen (Yoshima et al., 1981; Geyer et al., 1992), für das Hepatitis B Virus LHBs Protein werden analoge Strukturen postuliert (Treichel et al., 1994). Die Interaktion mit dem ASGP-R könnte somit bei allen drei Viren die Grundlage für den postulierten Hepatotropismus sein. Für SeV ist die Wechselwirkung mit dem ASGP-R am eingehendsten untersucht. SeV, ein (–)-RNA-Strang Virus und typischer Vertreter der Paramyxoviren, besitzt zwei Hüllproteine, Hämagglutinin-Neuraminidase (SeV-HN) und das Fusionsglycoprotein (SeV-F). SeV-HN bindet an ubiquitär vorkommende Sialinsäure-haltige Strukturen (Glycolipide; Markwell et al., 1981), während SeV-F die Fusion von viraler und zellulärer Membran vermittelt (Lamb, 1993). Im Replikationszyklus von SeV ist HN daher für die Bindung an die Zielzelle verantwortlich, während die Fusionseigenschaften von F das Eindringen des Virus in die Zelle ermöglicht. SeV-F zeigt diese Fusionsaktivität aber nur nach Spaltung durch eine zelluläre Protease mit Trypsin-ähnlicher Aktivität. In der Maus, dem natürlichen Wirt des Sendai Virus, bewirkt dies den Pneumotropismus des Virus, da nur Lungenepithel-Zellen das entsprechende Enzym (Tryptase Clara) besitzen (Tashiro et al., 1992). *In vitro* verhält sich aktiviertes SeV aufgrund des ubiquitären Vorkommens der Sialorezeptoren dagegen pantrop und kann praktisch alle Zelltypen infizieren. Ein interessanter Befund ist in diesem Zusammenhang, daß nach dem enzymatischen Abbau der Sialorezeptoren Zellen, die den ASGP-R exprimieren einer Infektion mit SeV zugänglich bleiben (Bitzer et al., 1997). Dabei ist die ASGP-R vermittelte Infektion fast genauso effizient wie die konventionelle über Sialorezeptoren verlaufende Infektion. Wie durch Infektionsstudien mit rekombinantem SeV (Leyrer et al., 1998) und einer Temperatur-sensitiven Mutante des Sendai Virus nachgewiesen werden konnte (Markwell et al., 1985), ist SeV-F hierbei für die Interaktion mit dem ASGP-R verantwortlich. SeV-F kann somit – neben seiner Funktion als Fusionsprotein – auch als Ligand für den Hepatocyten-spezifischen ASGP-R fungieren. Damit stellt sich die Frage, ob diese Eigenschaften des SeV-F Proteins für den leberspezifischen Gentransfer ausgenutzt werden können.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Durch Infektionsstudien mit SeV konnte nachgewiesen werden, daß sich die SeV-Proteine HN und F in die Hülle ecotroper Retroviren inkorporieren lassen, eine Bildung von MoMLV(SeV-HN+F)-Pseudotypen also möglich ist (Spiegel, 1995) und dies zu einer Erweiterung des Tropismus der Pseudotypen auf Zellen mit Sialorezeptoren führt. Im Zusammenhang mit der Generierung retroviraler leberspezifischer Gentransfer-Systeme sollte daher untersucht werden, ob auch ein Einbau von SeV-F in Abwesenheit von SeV-HN in die retrovirale Hülle möglich ist. Weiterhin stellte sich die Frage, ob solche MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen eine Spezifität für ASGP-R-exprimierende Zellen aufweisen und diese Spezifität für einen gewebespezifischen Gentransfer ausgenutzt werden kann.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Sofern nicht anders angegeben, stammen die verwendeten Chemikalien von E. Merck, Darmstadt. Alle Chemikalien besitzen mindestens den Reinheitsgrad „zur Analyse, ACS“; sofern erhältlich, wird der Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“ bzw. „für die Zellkultur“ verwendet.

Der Begriff „bidest. Wasser“ wird im folgenden für deionisiertes Wasser verwendet, das zusätzlich über eine Milli-Q-Plus Filtrieranlage (Millipore) gereinigt wird.

Als „steril“ oder „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien werden für 20 min bei 120 °C und 2 bar Überdruck autoklaviert (Stand-Autoklav FVD 3, Fedegari).

Als „sterilfiltriert“ bezeichnete Lösungen werden durch ein 0,22 µm Filter (Millex-GS, Millipore oder Falcon Bottle Top Filter, Becton Dickinson) filtriert.

2.2 Molekularbiologische Materialien und Methoden

Grundlage für die folgenden Arbeitsvorschriften stellen die entsprechenden Abschnitte aus Sambrook et al. (1989) bzw. Ausubel (1989) dar, gegebenenfalls modifiziert durch Hersteller-spezifische Empfehlungen.

2.2.1 Transformation von *Escherichia coli*

Im Gegensatz zu anderen Bakterien (z. B. *Bacillus subtilis*) nimmt *E. coli* spontan keine Fremd-DNA auf. Es existieren jedoch verschiedene Methoden, um *E. coli*-Zellen für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen. Im Rahmen dieser Arbeit werden für Transformationen entweder *E. coli* DH5α (Life Technologies) oder XL1-Blue (Stratagene) verwendet, die bereits kompetent vom Hersteller bezogen wurden, oder aber *E. coli* XL1-Blue, die mit Hilfe der FSB-Methode nach Hanahan (1983) kompetent gemacht werden.

Materialien:

- Bakterien: *E. coli* XL1-Blue (Stratagene);

- FSB-Transformationspuffer, bestehend aus:
  10 mM CH_3COOK,
  100 mM KCl,
  45 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$,
  10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
  3 mM $Co(NH_3)_6Cl_3$;
  der pH-Wert der Lösung wird auf 6,4 mit 0,1 M HCl eingestellt. Anschließend wird die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

- DMSO (Sigma);

- SOB-Medium:
  10 g Select-Pepton (Life Technologies),
  2,5 g Hefe-Extrakt (Life Technologies),
  295 mg NaCl,
  95 mg KCl,
  werden in bidest. Wasser gelöst und der pH mit 1 M HCl auf 6,8–7,0 eingestellt und das Volumen auf 490 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C werden noch 10 ml 1 M $MgSO_4$-Lösung (s. u.) zugesetzt.

- 1 M $MgSO_4$-Lösung, steril:
  250 g $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ werden unter Erwärmen in bidest. Wasser gelöst, das Volumen auf 125 ml eingestellt und sterilfiltriert.

- SOC-Medium:
  2 g Select-Pepton,
  500 mg Hefe-Extrakt,
  59 mg NaCl,
  19 mg KCl,
  werden in bidest. Wasser gelöst und der pH mit 1 M HCl auf 6,8–7,0 eingestellt und das Volumen auf 97 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C werden noch 2 ml $MgSO_4$-Lösung (s. o.) und 1 ml Glucose-Lösung (s. u.) zugesetzt.

- 2 M Glucose:
  36 g Glucose werden in bidest. Wasser gelöst, das Volumen auf 100 ml eingestellt, abschließend wird die Lösung sterilfiltriert.

- Ampicillin-Lösung, 25 mg/ml zur Selektion:
  10 g Ampicllin Natriumsalz (Sigma) werden in 400 ml bidest. Wasser gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C (Vorratslösung) bzw. bei 4 °C (Gebrauchslösung) aufbewahrt.

- LB-Platten mit Antibiotikum zur Selektion:
  10 g Select-Pepton,
  5 g Hefe-Extrakt,
  10 g NaCl,
  werden in bidest. Wasser gelöst und der pH mit 5 M NaOH auf 7,5 eingestellt. Die Lösung wird mit 15 g Bacto Agar versetzt, das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C werden 4 ml Ampicillin-Lösung zugesetzt, so daß die Konzentration an Antibiotikum 100 µg Ampicillin/ml Medium beträgt.

Protokoll zur Herstellung kompetenter Bakterien:

- Einen Tag vor der eigentlichen Durchführung werden 50 µl einer *E. coli* XL1-Blue Glycerolkultur auf eine LB-Platte so ausgestrichen, daß Einzelkolonien erhalten werden.

- Mit einer Einzelkolonie werden 10 ml SOB-Medium angeimpft.

- Mit dieser Kultur werden 100 ml SOB-Medium beimpft und bis zu einer OD_{550} von ca. 0,5 angezogen. Die Kultur wird aliquotiert, in vorgekühlte 50 ml Falcon-Polypropylenröhrchen überführt und für 10 min auf Eis inkubiert.

- Anschließend werden die Bakterien für 10 min mit 3400 ×g (Heraeus Megafuge 2.0 R mit Ausschwingrotor 8250) bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt.

- Dann werden die Bakterien in 20 ml eiskalter FSB-Lösung (je Falcon-Röhrchen) resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien werden für 10 min auf Eis inkubiert.

- Die Bakterien werden erneut zentrifugiert (s. o.), der Überstand vollständig entfernt und in 4 ml eiskalter FSB-Lösung (je Falcon-Röhrchen) resuspendiert.

- Die resuspendierten Zellen werden mit je 140 µl DMSO vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Ansätze nochmals mit je 140 µl DMSO vorsichtig gemischt, auf Eis zurückgestellt und sofort in vorgekühlte, sterile 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert (je 200 µl) und bei -80 °C gelagert.

Protokoll für die Transformation:

- Die bei -80 °C gelagerten, kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut. Sobald die Bakterien aufgetaut sind, werden je Transformationsansatz 50 µl Bakteriensuspension in vorgekühlte Falcon-Röhrchen aliquotiert.

- Die Transformationsansätze werden mit der gewünschten DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert.

- Dann erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec (Wasserbad).

- Die Ansätze werden 2 min im Eisbad abgekühlt.

- Alle Ansätze werden mit 950 µl SOC-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C mit 250 Upm im Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific) inkubiert.

- Je 100 µl der Transformationsansätze werden auf LB-Agarplatten, die das geeignete Selektionsantibiotikum enthalten, ausgestrichen.

- Die verbleibenden 900 µl der Ansätze werden für 5 min mit 3400 ×g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterien-Sediment in je 100 µl frischem SOC-Medium resuspendiert und ebenfalls auf LB-Agarplatten ausgestrichen.
- Die LB-Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert (Heraeus-Inkubator VT 5042).

2.2.2 Anlegen von Glycerolkulturen

Zur Aufbewahrung von Bakterienkulturen über längere Zeiträume müssen Dauerkulturen angelegt werden. In Glycerol-haltigem Medium lassen sich Bakterien bei tiefen Temperaturen praktisch unbegrenzt lange lagern, ohne daß ihre Vitalität verlorengeht.

Durchführung:

- Je 850 µl der aufzubewahrenden Bakterienkulturen werden mit je 150 µl sterilem Glycerol gemischt und in sterilen 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C bzw. -80 °C aufbewahrt.
- Zum Animpfen wird mit einer Impföse ein kleiner Teil der gefrorenen Glycerolkultur abgenommen und in das gewünschte Medium überführt oder auf eine Agarplatte ausgestrichen.

2.2.3 Plasmidpräparationen

Beiden im folgenden beschriebenen Methoden liegt dasselbe Prinzip zugrunde: Nach Anzucht im geeigneten Selektionsmedium werden die Bakterien, die das gewünschte Plasmid replizieren, durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und einer alkalischen Lyse mit NaOH/SDS unterworfen (Birnboim, 1983). Dies führt zum Platzen der Zellen und zur Denaturierung der bakteriellen Proteine. Sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA werden freigesetzt und ebenfalls denaturiert. Anschließend erfolgt die Neutralisierung des alkalischen Lysats unter Hochsalzbedingungen. Hierbei renaturiert die Plasmid-DNA, während alle anderen makromolekularen Komponenten als Präzipitat ausfallen.

Puffer für die alkalische Lyse (Qiagen):

- Resuspendierungspuffer P1:
  50 mM Tris-HCl,
  10 mM EDTA,
  100 µg/ml RNase A; pH 8,0;

- Lysepuffer P2:
  200 mM NaOH,
  1 % SDS;

- Neutralisierungspuffer P3:
  3 M Kaliumacetat; pH 5,5.

2.2.3.1 Mini-Präparationen zur Charakterisierung transformierter Bakterien

Bei den Mini-Präparationen wird auf eine weitere Reinigung des Lysats verzichtet, da für Kontrollverdau-Ansätze mit Restriktionsenzymen die Reinheit der so gewonnenen Plasmid-DNA ausreicht.

Materialien:

- LB-Medium mit Selektions-Antibiotikum:
  10 g Select-Pepton,
  5 g Hefe-Extrakt,
  10 g NaCl
  werden in 950 ml bidest. Wasser gelöst und der pH mit 5 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Dann wird auf 1 l aufgefüllt und die Lösung autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C werden 2 ml Ampicillin-Lösung zugesetzt, so daß die Konzentration an Antibiotikum 100 µg Ampicillin/ml Medium beträgt.

- Ethanol, 100 %;

- Ethanol, 70 % (w/v).

Durchführung:

- Je 7 ml LB-Medium, die das geeignete Selektions-Antibiotikum enthalten, werden mit einer Einzelkolonie angeimpft.

- Die Kulturen werden über Nacht bei 37 °C mit 250 Upm im Bakterienschüttler inkubiert.
- Je 1,5 ml der Übernacht-Kultur werden in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 5 min mit 1500 ×g bei 4 °C (Heraeus Biofuge 15 R mit Winkelrotor HFA 14.2) zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgesaugt und die Bakterien-Sedimente in je 200 µl P1 resuspendiert.
- Dann werden je 200 µl P2 zugegeben, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach Zugabe von 200 µl P3 wird für 20 min mit 18000 ×g bei 4 °C (Heraeus Biofuge 15 R mit Winkelrotor HFA 14.2) zentrifugiert.
- Die Überstände werden in frische 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, zur DNA-Fällung mit je 1,5 ml kaltem Ethanol versetzt und für 30 min mit 18000 ×g bei 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgesaugt, je 500 µl kaltes Ethanol (70 %) zugegeben (Salzentfernung) und für 5 min mit 18000 ×g bei 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgesaugt, die gefällte DNA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Ethanolreste verdunsten zu lassen; abschließend wird die DNA in je 20 µl sterilem bidest. Wasser gelöst.

2.2.3.2 Maxi- und Mega-Präparationen zur Plasmidgewinnung

Bei diesem Verfahren erfolgt die Reinigung der Plasmid-DNA mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule (Qiagen). Aufgrund der hohen Ladungsdichte des Säulenmaterials kann doppelsträngige Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen bei neutralem bis schwach alkalischem pH-Wert selektiv eluiert werden (Qiagen GmbH, Hilden, 1995).

Materialien:

- TB-Medium mit Selektions-Antibiotikum:
  12 g Select-Pepton,
  5 g Hefe-Extrakt,

4 ml Glycerol,
werden in bidest. Wasser gelöst, das Volumen auf 900 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums setzt man 100 ml sterile Kaliumphosphat-Lösung (s. u.) sowie 2 ml Ampicillin-Lösung zu.

- Kaliumphosphat-Lösung für TB-Medium:
  125,4 g K_2HPO_4,
  23,1 g KH_2PO_4,
  werden in bidest. Wasser gelöst,das Volumen auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.
  Die Lösung ist 0,72 M bezüglich K_2HPO_4 und 0,17 M bezüglich KH_2PO_4.

- Anionenaustauscher-Säulen Qiagen-tip 500 und 2500;

- Äquilibrierungspuffer QBT:
  750 mM NaCl,
  50 mM MOPS,
  15% Ethanol,
  0,15% Triton X-100; pH 7,0;

- Waschpuffer QC:
  1 M NaCl,
  50 mM MOPS,
  15%Ethanol; pH 7,0;

- Elutionspuffer QF:
  1,25 M NaCl,
  50 mM Tris-HCl,
  15%Ethanol; pH 8,5.

- Isopropanol;

- Ethanol, 70 % (w/v).

Alle Puffer (QBT, QC und QF) sind Bestandteil des Qiagen Maxi/Mega Kits der Fa. Qiagen.

Durchführung:
Im folgenden bezieht sich der erste Zahlenwert immer auf Maxi-Präparationen, der zweite Zahlenwert auf Mega-Präparationen:

- 125 ml/250 ml TB-Medium, die das geeignete Selektionsantibiotikum enthalten, werden mit 125 µl/250 µl Übernacht-Kultur oder Glycerolkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 225 Upm im Bakterien-Schüttler inkubiert.

- Die Übernacht-Kultur wird für 20 min mit 3400 ×g (Heraeus Megafuge 2.0 R mit Ausschwingrotor) bei 4 °C zentrifugiert.

- Das Bakterien-Sediment wird in 10 ml/50 ml P1 resuspendiert.

- Es wird 10 ml/50 ml P2 zugesetzt, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

- Dann werden 10 ml/50 ml P3 zugesetzt, gemischt und für 20 min/30 min auf Eis inkubiert.

- Anschließend wird für 30 min mit 28000 ×g (Heraeus Suprafuge 22 mit Ausschwingrotor HSA 13.94) bei 4 °C zentrifugiert.

- Der Überstand wird durch ein Stück Verbandsgaze auf eine – mit 10 ml/35 ml QBT äquilibrierte – Qiagen-tip 500/2500 Säule aufgetragen.

- Dann wird die Säule zweimal/viermal mit 30 ml/50 ml QC gewaschen.

- Die Elution erfolgt mit 15 ml/35 ml QF.

- Die Fällung der DNA erfolgt durch Zusatz von 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol. Der Ansatz wird zum Sedimentieren der DNA für 30 min mit 28000 ×g bei 4 °C zentrifugiert.

- Der Überstand wird abgesaugt, das Sediment mit 5 ml Ethanol (70 %) zur Salzentfernung versetzt und für 15 min mit 28000 ×g bei 4 °C zentrifugiert.

- Der Überstand wird abgesaugt, die gefällte DNA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Ethanolreste verdunsten zu lassen, abschließend wird die DNA in 200 µl/1 ml sterilem bidest. Wasser gelöst.

- 1,5 µl der DNA-Lösung werden mit 148,5 µl bidest. Wasser versetzt und der DNA-Gehalt spektrometrisch bestimmt (siehe 2.2.4).

2.2.4 Spektrometrische Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption der Purin- und Pyrimidin-Basen im Bereich von 260 nm ausgenutzt. Hierbei ist zu beachten, daß Doppelstrang-DNA, Einzelstrang-DNA und Einzelstrang-Oligonucleotide infolge des unterschiedlichen Ausmaßes der Basenstapelung verschiedene Extinktionskoeffizienten besitzen. Eine Extinktion von 1 entspricht bei Doppelstrang-DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml, bei Einzelstrang-DNA ca. 40 µg/ml und bei Einzelstrang-Oligonucleotiden ca. 20 µg/ml. Zur Bestimmung sehr kleiner DNA-Mengen ist die Methode nicht geeignet; die Meßlösung muß mindestens 0,25 ng/µl DNA enthalten. Ein Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA-Lösung ist eine zweite Extinktionsmessung bei 280 nm, bei der die aromatischen Reste von Proteinen stark absorbieren. Gereinigte DNA-Lösungen sollten ein E_{260}/E_{280}-Verhältnis im Bereich von 1,8–2,0 aufweisen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung[1] mit Proteinen oder Phenol hin.

Durchführung:

- Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit einem programmierbaren UV/VIS Spektrophotmeter (Beckman DU-640) in einer Vierfach-Mikroküvette aus Quarzglas (Beckman).
- Leerwertbestimmung und Küvettenabgleich: Die Extinktionswerte von 4×150 µl bidest. Wasser werden bei 260 nm und 280 nm gemessen, die Meßwerte der ersten Kammer als Nullpunkt gesetzt und die übrigen Werte zum Abgleich auf den Nullpunkt verwendet.
- Je 1,5 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung werden mit bidest. Wasser auf 150 µl aufgefüllt und in die Kammern 2–4 der Küvette überführt. In der ersten Kammer verbleibt die Wasserprobe als Referenzwert.
- Dann erfolgt die Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm in allen vier Kammern. Das Meßergebnis wird vom Gerät sowohl als Absorption bzw. Absorpti-

[1] Es ist weiterhin zu beachten, daß das E_{260}/E_{280}-Verhältnis auch pH-abhängig ist. Bei Resuspendierung gereinigter DNA in TE-Puffer (pH 7,5) erhält man in aller Regel die oben genannten Werte. Wird dagegen reines bidest. Wasser (pH < 7,0) verwendet, so erhält man etwas kleinere Werte, die zwischen 1,6 und 1,8 liegen .

onsverhältnis, als auch als Konzentration in µg/µl ausgegeben, wobei die 100×-Verdünnung der Meßlösungen bereits berücksichtigt ist.

2.2.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristisch sind. Je nach Enzym variiert die Pufferzusammensetzung und Temperatur, bei der die Reaktion optimal (bezüglich Spezifität und Geschwindigkeit) abläuft. Alle verwendeten Restriktionsendonucleasen, einschließlich der dazu passenden Reaktionspuffer, stammen von Boehringer Mannheim.

Materialien:

- Restrictionsendonucleasen, 10 U/µl;
- SuRE/Cut Reaktionspuffer.

Durchführung:

- Für einen analytischen Restriktionsverdau werden 0,2–1 µg DNA eingesetzt.
- Die DNA-Lösung wird mit 1 µl des für das jeweilige Restriktionsenzym notwendigen Reaktionspuffers (10×) versetzt und mit sterilem bidest. Wasser auf 9,5 µl aufgefüllt.
- Dann erfolgt der Zusatz des Restriktionsenzyms (0,5 µl, entspricht 5 U) und der Ansatz wird für 2 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.6 Glätten überhängender Enden von doppelsträngiger DNA

Beim Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen entstehen je nach verwendetem Enzym glatte Enden (blunt-end), Enden mit 5'-Überhang oder Enden mit 3'-Überhang. In den beiden letzten Fällen, ergibt sich im Rahmen von Klonierungen bzw. Subklonierungen oftmals das Problem, daß DNA-Fragmente mit inkompatiblen Enden miteinander verknüpft werden müssen. Hier bietet sich die Möglichkeit, 5'- oder 3'-

überhängende Enden zu glätten und die DNA-Fragmente mittels blunt-end Ligation miteinander zu verknüpfen (siehe 2.2.10).

2.2.6.1 Auffüllen 5'-überhängender Enden mit Klenow-Enzym

Klenow-Enzym, das große Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I, besitzt 5'→3'-Polymerase- und 3'→5'-Exonuclease-Aktivität. Erstere kann in Anwesenheit von Nucleosidtriphosphaten zum *Auffüllen* 5'-überhängender Enden genutzt werden, so daß man glatte DNA-Enden (blunt-end) erhält. Da Klenow-Enzym in praktisch allen Reaktionspuffern für Restriktionsenzyme aktiv ist, kann DNA aus Restriktionsverdau-Ansätzen direkt für die Auffüllreaktion eingesetzt werden.

Materialien:

- Klenow-Enzym (Boehringer Mannheim);
- dNTP-Stammlösung, enthält je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Durchführung:

- 0,1–0,4 µg DNA werden mit der (gegebenenfalls vorverdünnten) dNTP-Stammlösung und sterilem bidest. Wasser versetzt. Die Endkonzentration je dNTP beträgt 20 µM, das Reaktionsvolumen 20 µl.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 1–5 U Klenow-Enzym gestartet und für 15 min bei 30 °C inkubiert.
- Durch Erhitzen auf 75 °C für 10 Minuten wird die Reaktion abgebrochen.

Für größere DNA-Mengen kann der Reaktionsansatz entsprechend angepaßt werden.

2.2.6.2 Abbau 3'-überhängender Enden mit T4-Polymerase

Bakteriophage T4 DNA-Polymerase besitzt die selben enzymatischen Aktivitäten wie Klenow-Enzym. Die 3'→5' Exonuclease-Aktivität ist im Vergleich zu Klenow-Enzym jedoch ca. 200fach stärker. Daher eignet sich T4 DNA-Polymerase gut zum *Abbau* 3'-überhängender Enden.

Materialien:

- T4 DNA-Polymerase (New England Biolabs);
- T4 DNA-Polymerase Puffer, 100× (New England Biolabs):
  500 mM NaCl,
  100 mM Tris-HCl, pH 7,9
  100 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT;
- BSA, 100× (New England Biolabs), enthält 5 mg/ml BSA;
- dNTP-Stammlösung, enthält je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Durchführung:

- 0,1–0,4 µg DNA werden mit der (gegebenenfalls vorverdünnten) dNTP-Stammlösung, dem Reaktionspuffer, der BSA-Stammlösung und sterilem bidest. Wasser versetzt. Die Endkonzentration je dNTP beträgt 20 µM, das Reaktionsvolumen 20 µl. Da T4 DNA-Polymerase in den meisten Reaktionspuffern für Restriktionsenzyme aktiv ist, kann gegebenenfalls auf den Reaktionspuffer verzichtet werden.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 1–3 U T4 DNA-Polymerase gestartet und für 20 min bei 12 °C inkubiert
- Durch Erhitzen auf 75 °C für 10 Minuten wird die Reaktion abgebrochen.

Für größere DNA-Mengen kann der Reaktionsansatz entsprechend angepaßt werden.

2.2.7 Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA

Zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppen linearer DNA wird Alkalische Phosphatase aus *Pandalus borealis*, einer Tiefseegarnelenart, verwendet (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP). Im Gegensatz zur häufig benutzten Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP) ist SAP (bei vergleichbarer Aktivität) leicht inaktivierbar (hierzu wird der Ansatz für 15 min auf 65 °C erhitzt), so daß die sonst üblichen Inaktivierungs- und Extraktionsschritte entfallen (USB/Amersham Life Science, 1995).

Materialien:

- SAP, 1 U/µl (USB) in:
  25 mM Tris-HCl, pH 7,5,
  1 mM $MgCl_2$,
  0,1 mM $ZnCl_2$,
  50 %Glycerol;

- Dephosphorylierungspuffer, 10× (USB):
  200 mM Tris-HCl,
  100 mM $MgCl_2$;

- SAP-Verdünnungspuffer (USB):
  50 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Durchführung:

- Der Reaktionsansatz wird mit 1/10 Volumen Dephosphorylierungspuffer versetzt und mit der erforderlichen Menge SAP versetzt. Hierbei werden für 1 pmol DNA-Enden folgende Mengen eingesetzt: 0,1 U für 5'-überhängende Enden, 0,2 U für glatte Enden, 0,5 U für 3'-überhängende Enden. Der Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert.

- Inaktivierung: Der Reaktionsansatz wird 15 min bei 65 °C inkubiert. Der Ansatz kann direkt für weitere Reaktionen (z. B. Ligationen) eingesetzt werden.

2.2.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von 0,5–10 kb eignen sich einprozentige Agarosegele, die sowohl für analytische als auch präparative Auftrennungen verwendet werden können.

Materialien:

- SeaKEM GTG Agarose (FMC BioProducts);

- Ethidiumbromid-Lösung, 10 mg/ml;

- TAE-Puffer, 50×:
  242 g Tris-Base,
  57,1 ml Eisessig,
  100 ml 0,5 M EDTA; pH 8.0
  werden mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt. Zur Verwendung wird der Puffer 1:50 mit bidest. Wasser verdünnt. TAE, 1× kann mehrfach verwendet werden.

- Proben-Auftragspuffer, 10×:
  In 5 ml bidest. Wasser werden jeweils 20 mg (d. h. 0,4 % (w/v)) der folgenden Farbstoffe gelöst:
  Bromphenolblau (Sigma),
  Xylen-Cyanol FF (Sigma),
  Orange-G (Sigma),
  sowie 1 g (d. h. 20 %) Ficoll 400 (Pharmacia Biotech).
  Die Aufbewahrung erfolgt bei 4 °C. Der Auftragspuffer hat drei Funktionen:

  1. Er erhöht die Dichte der Probe und stellt damit sicher, daß die DNA in die Probentasche einsinkt.
  2. Er färbt die Probe und erleichtert damit die Beladung des Gels.
  3. Er enthält Farbstoffe, die mit reproduzierbarer Geschwindigkeit zur Anode wandern.

- Molekulargewichtsmarker X (Boehringer Mannheim) oder 1 kb-Leiter (Life Technologies):
  200 µl Molekulargewichtsmarker (enthält 0,25 µg/µl DNA) werden mit dem gleichen Volumen Proben-Auftragspuffer versetzt. Die Aufbewahrung erfolgt bei 4 °C. Zum Gebrauch werden 2 µl des Gemischs mit bidest. Wasser auf 10 µl aufgefüllt.

Durchführung:

- Gießen des Gels (1 % Agarose): 1 g Agarose wird mit 100 ml TAE-Puffer, 1× versetzt und im Mikrowellenherd erhitzt, bis eine klare Lösung entsteht. Die Lösung wird mit 5 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in eine Flachbettkammer (Owl Scientific bzw. Stratagene) der gewünschten Größe ausgegossen.

- Probenvorbereitung: Die aufzutragenden Proben werden mit je 1 µl Proben-Auftragspuffer versetzt und mit bidest. Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben und die Marker-Gebrauchslösung werden in die Taschen des Gels gegeben.

- Gel-Lauf: Die Auftrennung erfolgt bei konstanter Spannung (80 V für 90 min oder 20 V über Nacht) bei einer Stromstärke von maximal 350 mA (Power Pac 300, Bio-Rad). Zur Fotodokumentation (Polaroid-Sofortbildkamera MP4 oder Pharmacia Biotech Image Master) kann die Elektrophorese jederzeit unterbrochen werden. Die Fluoreszenz-Anregung der gefärbten DNA erfolgt mit langwelligem UV-Licht (312 nm, UV-Leuchttisch Bachofer). Bei präparativen Auftrennungen (s. u.) wird die DNA dem UV-Licht möglichst wenig ausgesetzt, um Schädigungen zu vermeiden.

2.2.9 Reinigung von DNA aus präparativen Agarosegelen

Die angewandte Methode zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen beruht auf der Fähigkeit von Silicagel (in wäßriger Suspension, sog. „Glasmilch“), in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze, wie z. B. Natriumiodid, DNA zu adsorbieren. Zunächst wird das Agarosegelstück, welches die DNA enthält, ebenfalls mit Hilfe des chaotropen Salzes, das die Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckereinheiten des Agarosepolymers zerstört, solubilisiert. Die hohe Salzkonzentration führt weiterhin dazu, daß eventuell gebundene Proteine von der DNA abdissoziieren. Die Elution erfolgt durch Absenken der Ionenstärke und Erhöhung der Temperatur.

Materialien:
Folgende Materialien sind Bestandteil des „Geneclean II Kit“ (Bio 101 Inc.) zur Reinigung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von mehr als 500 bp:

- 6 M Natriumiodid-Lösung (NaI);

- NEW Waschlösung:
14 ml NEW Konzentrat werden mit 280 ml bidest. Wasser vermischt. 310 ml absoluter Ethanol werden hinzugefügt, die Lösung gut gemischt und bei -20 °C gelagert. Die NEW Waschlösung enthält Tris-HCl und Tris-Base, so daß der pH-Wert je nach Temperatur zwischen 7,0 und 8,5 liegt.

- Glasmilch:
Silica-Matrix, suspendiert in bidest. Wasser; Bindungskapazität: 1–2 µg DNA/µl Glasmilch.

Durchführung:

- Die DNA wird mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.8) aufgetrennt.
- Die gewünschte Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück gewogen.
- Nach Zugabe des dreifachen Gelvolumens (wobei 1 g Agarose als 1 ml gerechnet wird) an NaI-Lösung wird das Gemisch so lange bei 45 °C–55 °C inkubiert, bis sich das Gelstück vollständig aufgelöst hat.
- Vor Zugabe der Glasmilch, muß die Silica-Matrix vollständig resuspendiert werden. Zu Lösungen, die 5 µg DNA oder weniger enthalten, gibt man 5 µl Glasmilch. Für jedes weitere Mikrogramm DNA wird die zuzugebende Menge um 2 µl erhöht. Die Bindung der DNA an die Silica-Matrix benötigt auf Eis 15 min bis 1 h, wobei die Glasmilch zwischendurch immer wieder aufgeschüttelt werden sollte, um den Kontakt zwischen zu bindender DNA und den Partikeln zu gewährleisten.
- Anschließend wird die Glasmilch in einer Tischzentrifuge 2 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und zunächst aufgehoben.
- Die Glasmilch wird im 10–50× Volumen NEW Waschlösung vorsichtig (um Strangbrüche bei langen DNA-Molekülen zu vermeiden) resuspendiert und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert; dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.
- Nach dem letzten Waschschritt wird die Glasmilch 10 min unter Vakuum getrocknet, um Ethanolreste zu entfernen.
- Die Silica-Matrix wird schließlich in 1–2 Glasmilch-Volumen bidest. Wasser aufgenommen und zur Elution bei 45–55 °C für 5 min inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wird der Überstand, der die DNA enthält, abgenommen und die Elution wiederholt.

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente, wobei sowohl kohäsive als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden. Ebenso werden offene Phosphodiesterbindungen in einem Strang der Doppelhelix geschlossen. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Plasmiden sind verschiedene Faktoren zu beachten:

- Die Konzentration der eingesetzten Plasmid-DNA:
  Ist die Absolut-Konzentration zu gering, so ist die Religation des Plasmids (also der intramolekulare Ringschluß) die bevorzugte Reaktion (sofern kompatible, phosphorylierte Enden vorliegen). Ist die Konzentration zu hoch, so bilden sich bevorzugt lineare Oligomere (intermolekulare Reaktion).

- Das Verhältnis von Plasmid-DNA zur einzufügenden Fragment-DNA:
  Im Ligationsansatz sollte die Anzahl der einzufügenden Fragment-DNA-Moleküle mindestens doppelt so groß sein wie die Anzahl der linearisierten Plasmid-DNA-Moleküle, damit eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Verknüpfung von Plasmid und Fragment gegeben ist.

- Aus den beiden genannten Faktoren ergibt sich für den Reaktionsansatz folgende optimale Zusammensetzung:
  Die Absolut-Konzentration an Plasmid-DNA sollte so hoch sein, daß die intermolekulare Reaktion leicht bevorzugt ist. Dieser Wert ist abhängig von der Größe der Plasmid-DNA und liegt beispielsweise für ein 6 kb-Plasmid bei ca. 50–100 ng/µl. Die Absolut-Konzentration an einzufügender Fragment-DNA sollte mindestens so hoch gewählt werden, wie oben angegeben.

Je nachdem wie das Plasmid und das einzufügende Fragment vorliegen, müssen verschiedene Strategien angewandt werden:

- Das einzufügende Fragment besitzt identische kohäsive Enden:
  Hierbei muß das Plasmid nur mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut werden. Daher besitzt der linearisierte Vektor phosphorylierte kompatible Enden und wird in der Ligationsreaktion sehr leicht wieder recircularisiert. Um die unerwünschte Religation möglichst gering zu halten, wird der geschnittene

Vektor vor der Ligation dephosphoryliert (siehe 2.2.7). Bei der Ligation des Vektors mit dem einzufügenden Fragment werden daher nur zwei Phosphodiesterbindungen geknüpft (zwischen den phosphorylierten 5'-Enden des Fragments und den 3'-OH-Enden des Vektors) und es verbleiben zwei Lücken (zwischen den dephosphorylierten 5'-Enden des Vektors und den 3'-OH-Enden des Fragments) im rekombinanten Plamid, die erst nach der Transformation von bakteriellen Enzymen aufgefüllt werden (Phosphorylierung und anschließende Ligation). Weiterhin gibt es aufgrund der identischen kohäsiven Enden zwei mögliche Orientierungen für das einzufügende Fragment, die mit gleicher Wahrscheinlichkeit auftreten und durch geeignete Methoden (z. B. asymmetrischer Restriktionsverdau) voneinander unterschieden werden müssen.

- Das einzufügende Fragment besitzt unterschiedliche kohäsive Enden: Hierbei muß das Plasmid mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut werden, damit kompatible Enden für das Einfügen des Fragments vorliegen. Da der linearisierte Vektor damit unterschiedliche kohäsive Enden besitzt, ist die Religationsrate sehr gering und eine Dephosphorylierung nicht notwendig. Bei der Ligation von Vektor und Fragment werden daher vier Phosphodiesterbindungen geknüpft (alle 5'-Enden sind phosphoryliert) und es verbleiben keine Bindungslücken im rekombinanten Plasmid. Aufgrund der unterschiedlichen kohäsiven Enden sollte das Fragment nur in der gewünschten Orientierung eingefügt werden.

- Das einzufügende Fragment sowie der linearisierte Vektor besitzen glatte Enden. Um Selbstligationen des Vektors zu minimieren, kann dephosphoryliert werden. Das Fragment kann in beiden Richtungen eingefügt werden, daher muß durch geeignete Methoden (z. B. asymmetrischer Restriktionsverdau) die Orientierung ermittelt werden.

Im Vergleich zu den beiden erstgenannten Fällen verläuft die blunt-end Ligation mit geringer Effizienz. Da sich aber sowohl 5'-überhängende Enden (durch Aufüllen mit Klenow-Enzym, siehe 2.2.6.1) als auch 3'-überhängende Enden (durch Abbau mit T4-Polymerase, siehe 2.2.6.2) in glatte Enden umwandeln lassen, erlaubt die blunt-end Ligation die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit ursprünglich inkompatiblen Enden.

Materialien:

- Rapid DNA Ligation Kit (Boehringer Mannheim), bestehend aus:
  T4-DNA-Ligase, 5 U/µl;
  Ligationspuffer, 2×: keine Zusammensetzung angegeben;
  DNA-Verdünnungspuffer, 5×: keine Zusammensetzung angegeben.

Durchführung:[2]

- Linearisierter Vektor (in der Regel dephosphoryliert) und einzufügendes Fragment werden im gewünschten Verhältnis (1:3 bis 1:5) zusammengegeben, mit 2 µl DNA-Verdünnungspuffer versetzt und mit sterilem bidest. Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Gesamtmenge an eingesetzter DNA sollte 200 ng nicht übersteigen.

- Der Ansatz wird mit 10 µl Ligationspuffer 2× versetzt.

- Dann wird 1 µl T4-DNA-Ligase zugesetzt und der Reaktionsansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

- Maximal 2 µl des Ansatzes werden zur Transformation eines geeigneten *E. coli*-Stammes verwendet.

2.2.11 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur zielgerichteten Einführung von Mutationen in die DNA-Sequenz eines Plasmids existieren verschiedene Methoden, wobei sich grob auf PCR-basierende und konventionelle Methoden unterscheiden lassen. Letztere sind mit dem Nachteil eines größeren Zeitaufwands und geringerer Effizienz behaftet, erlauben aber die Mutagenese größerer Plasmide im Vergleich zu PCR-Methoden. Bei der verwendeten Methode der „Double-Stranded Site-Directed Mutagenesis“ (Deng & Nickoloff, 1992) entfällt zudem die Notwendigkeit, einzelsträngige DNA durch Subklonierung in M13-abgeleitete Vektoren zu erzeugen. Das doppelsträngige Plasmid, das die zu mutierende Sequenz enthält, wird zunächst denaturiert, um dann zwei Oligonucleotid-Primer an einen der

[2] Die Vorschrift eignet sich sowohl für die Ligation kohäsiver Enden als auch für die Ligation glatter Enden (blunt-end Ligation).

beiden Einzelstränge binden zu lassen. Einer der beiden Primer ist der Selektionsprimer, mit dessen Hilfe eine singuläre, nicht-essentielle Restriktionsschnittstelle mutiert wird. Der andere Primer ist der eigentliche Mutageneseprimer, mit dessen Hilfe die interessierende Sequenz verändert wird. Mit Hilfe von T7-Polymerase wird eine Primer-Extension Reaktion durchgeführt, anschließend werden die Reaktionsprodukte mittels T4-DNA Ligase verknüpft. Der neu gebildete Strang enthält somit die gewünschte Mutation sowie die mutierte Restriktionsschnittstelle. Damit existiert nun ein Plasmidgemisch, bestehend aus Hybrid-Plasmiden bei denen es zur Primer-Bindung und Verlängerung kam, sowie dem Ausgangsplasmid. Dieses Gemisch wird nun mit dem Restriktionsenzym verdaut, dessen Schnittstelle mit Hilfe des Selektionsprimers mutiert wurde. Daher werden nur Ausgangsplasmide verdaut, Hybrid-Plasmide bleiben intakt und circulär. Dieser Ansatz wird in einen Reparatur-defizienten *E. coli* mutS Stamm transformiert. Da die Transformationseffizienz für circuläre Plasmide sehr viel größer als für lineare Plasmide ist, sind die Hybrid-Plasmide (die die gewünschte Mutation tragen) bei der Transformation stark bevorzugt. Aufgrund der Reparatur-Defizienz findet keine Unterscheidung zwischen dem mutierten und dem originalen Strang des Hybrid-Plasmids statt. Statt dessen wird statistisch einer der beiden Stränge repliziert, so daß zur Hälfte Plasmide entstehen, die auf beiden Strängen die gewünschte Mutation tragen, während die andere Hälfte wieder dem Ausgangsplasmid entspricht. Die transformierten Bakterien werden über Nacht in Flüssigkultur vermehrt, anschließend Plasmid-DNA isoliert und erneut verdaut, d. h. es werden wiederum die Ausgangsplasmide linearisiert, während die mutierten Plasmide intakt bleiben. Dieser Ansatz wird dann erneut in Bakterien transformiert und die erhaltenen Klone hinsichtlich der enthaltenen Plasmid-DNA charakterisiert. In Abbildung 2.1 ist der Ablauf der Mutagenese noch einmal schematisch zusammengefaßt.

Materialien:

- Chameleon Double Strand, Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), bestehend aus:
  pWhitescript Plasmid DNA (500 ng/µl),
  *Kpn*I Selektionsprimer (5'-phosphoryliert):
  `5′ CTATAGGGCGAATTGGGTGCCCGGGCCCCCCTCGAGGTCG 3′`,
  Blue Mutageneseprimer (5'-phosphoryliert):
  `5′ GTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATG 3′`.
  Die erfolgreiche Mutation von pWhitescript zu pBluescript mit Hilfe dieser Pri-

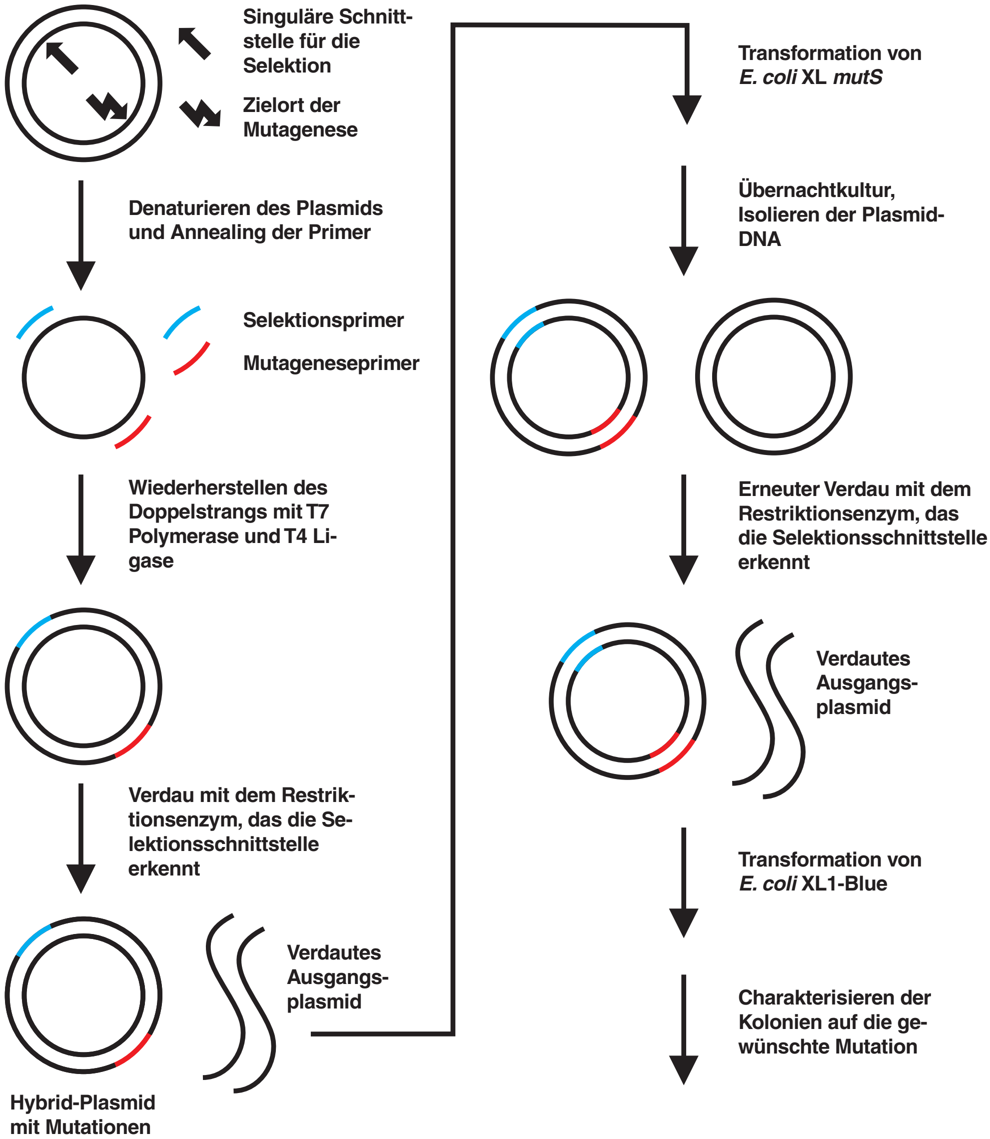

Abbildung 2.1: Ablauf der ortsgerichteten Mutagenese.

mer dient als Positivkontrolle für die Mutagenese.

Mutagenese-Puffer, 10×,

dNTP-Mix,

Enzym-Verdünnungspuffer,

Enzym-Mix, 10×,

*Kpn*I,

XLmutS kompetente Bakterien,

XL1-Blue kompetente Bakterien,

β-Mercaptoethanol, 1,4 M,

pUC18 Kontrollplasmid (0,1 ng/μl);

- T4 Polynucleotid-Kinase, 10 U/µl (Boehringer Mannheim);
- Phosphorylierungspuffer, 10× (Boehringer Mannheim):
  500 mM Tris-HCl,
  100 mM $MgCl_2$,
  50 mM DTT,
  1 mM EDTA,
  pH 8,2;
- Nucleotide Removal Kit (Qiagen);
- QiaPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen);
- 2×YT-Medium:
  5 g NaCl,
  5 g Hefe-Extrakt,
  8 g Trypton,
  werden in bidest. Wasser gelöst, auf 500 ml aufgefüllt, sowie mit 10 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Die Lösung wird autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 1 ml Ampicillin-Stammlösung (25 mg/ml) versetzt.
- LB-Amp Agarplatten;
- X-Gal;
- IPTG.

Durchführung:

- 5'-Phosphorylierung von Mutagenese- und Selektionsprimer:
  Je 100 pmol Primer (Konzentration 1 µg/µl) werden mit 10 nmol ATP, 5 µl PNK-Reaktionspuffer, 10× versetzt, mit sterilem bidest. Wasser auf 46 µl aufgefüllt und zum Reaktionsstart mit 40 U (4 µl) Polynucleotid-Kinase (PNK) versetzt. Der Ansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend wird die PNK durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA inaktiviert und je einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) extrahiert. Zur Fällung der phosphorylierten Oligonucleotide wird je 125 µl Ethanol, 100 % zugesetzt und über Nacht bei -80 °C inkubiert. Die über Nacht gefällten Primer werden für 90 min mit 31000 ×g bei 4 °C (Beckman-J2-21M/E

Zentrifuge mit JA20-Festwinkelrotor, siehe Sambrook et al., 1989, Band 3, Anhang E.10/11) abzentrifugiert. Danach wird das Ethanol vollständig entfernt und die gefällten Primer in je 50 µl bidest. Wasser (steril) gelöst. Anschließend werden nicht eingebautes ATP und ADP mit Hilfe des Nucleotide Removal Kits (Qiagen) entfernt. Nach Elution mit je 50 µl bidest. Wasser (steril) wird das Wasser vollständig entfernt (2×15 min Trocknung in der Speedvac). Anschließend werden die Primer in je 5 µl bidest. Wasser resuspendiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

- Primer-Hybridisierung:
  0,25 pmol zu mutagenisierendes Plasmid,
  25 pmol Mutageneseprimer,
  25 pmol Selektionsprimer, 2 µl
  Mutagenesepuffer, 10×,
  werden mit bidest. Wasser (steril) auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Zur Denaturierung der Doppelstränge und zur anschließenden Hybridisierung werden die Ansätze folgendermaßen inkubiert:
  5 min bei 100 °C (im Wärmeblock), 5 min bei 0 °C (auf Eis), 30 min bei Raumtemperatur.

- Primer-Verlängerung und Ligation:
  Den Hybridisierungsansätzen werden je 7 µl Nucleotid-Mix zugesetzt. 1 µl Enzym-Mix wurde mit 9 µl Verdünnungspuffer aufgefüllt und je 3 µl zu den Ansätzen gegeben. Die Reaktionen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend erfolgt die Inaktivierung der Enzyme für 15 min bei 80 °C.

- Linearisierung der nicht-mutierten Ausgangsplasmide:
  Die Mutageneseansätze werden vollständig mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (dessen Schnittstelle mit Hilfe des Selektionsprimers mutiert wird) verdaut.

- Erste Transformation:
  Mit je 10 % der verdauten Mutagenese-Ansätzen werden kompetente *E. coli* XLmutS transformiert, die Mismatch-repair-defizient sind. Die Transformation erfolgt nach Standardprotokoll (siehe 2.2.1) mit folgendem Zusatzschritt: Nach Auftauen der Bakterien auf Eis und Verteilen der (in diesem Fall 90 µl)

Aliquots auf vorgekühlte Falcon Polypropylenröhrchen, wird den Bakterien zur Erhöhung der Transformationseffizienz β-Mercaptoethanol zugesetzt (Endkonzentration 25 mM durch Zugabe von 1,5 µl 1,4 M β-Mercaptoethanol). Danach wird für 10 min auf Eis inkubiert und alle 2 min vorsichtig gemischt. Dann erfolgt die Zugabe der zu transformierenden DNA. Von den Transformationsansätzen (je 1 ml, siehe 2.2.1) wird je ein 100 µl Aliquot auf LB-Amp-Platten ausgestrichen, der Rest wurde zum Animpfen von je 10 ml 2×YT-Amp-Medium verwendet. Der pWhitescript-Kontrollansatz wird zur Blau-Weiß-Selektion auf LB-Xgal/IPTG-Amp-Platten ausgestrichen. Alle Ansätze werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

- Minipräps aus den Übernacht-Kulturen:
  Je 2 ml der Übernachtkulturen werden mittels Qiagen-Minipräp-Kit aufgereinigt. Für die abschließende Elution wird je 100 µl bidest. Wasser (steril) verwendet.

- Es erfolgt ein erneuter Verdau mit je 500 ng der isolierten Plasmide.

- Zweite Transformation:
  Mit je 10 % der verdauten Ansätze werden je 40 µl kompetente *E. coli* XL1-Blue in der oben beschriebenen Weise transformiert. Ausgestrichen werden je 10 % und 90 % der transformierten Bakterien auf LB-Amp bzw. LB-Xgal/IPTG-Amp-Platten (Kontrollmutagenese von pWhitescript zu pBluescript). Die Ansätze werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.12 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gewinnung von Gesamt-RNA erfolgt in modifizierter Form nach Chomczynski & Sacchi (1987). Hierbei erfolgt die Isolierung der Gesamt-RNA in Anwesenheit des starken RNase-Hemmers Guanidiniumisothiocyanat. Durch Extraktion mit Phenol werden DNA und Proteine abgetrennt, während die RNA in der wäßrigen Phase verbleibt. Abschließend wird mittels Isopropanol/Ethanol-Fällung die RNA aufkonzentriert und Salze entfernt.

2.2.12.1 Gewinnung des Zellysats für die RNA-Extraktion

Die Lyse der Zellen sowie die ersten Schritte der RNA-Extraktion sind für die spätere Qualität der RNA von besonderer Bedeutung. Obwohl die Lösung D, in der die Lyse der Zellen erfolgt, den starken RNase-Hemmer Guanidiniumisothiocyanat enthält, sollte so schnell wie möglich und grundsätzlich auf Eis gearbeitet werden, um einen einsetzenden RNA-Abbau zu verhindern. Materialien:

- 0,75 M Natriumcitrat, pH 7,0:
  Das Salz wird in Ampuwa (Fresenius) gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 7,0 eingestellt.

- Lösung D:
  4 M Guanidiniumisothiocyanat,
  25 mM Natriumcitrat, pH 7,0,
  0,5% Sarcosyl,
  0,1 M β-Mercaptoethanol,
  250 g Guanidiniumisothiocyanat (Fluka) werden mit 293 ml Ampuwa, 17,6 ml 0,75 M Natriumcitrat, pH 7,0, und 26,4 ml 10 % Sarcosyl versetzt und bei 65 °C über Nacht gelöst. Diese Lösung kann mindestens 3 Monate bei Raumtemperatur gelagert werden. Vor Gebrauch werden 50 ml dieser Lösung 360 µl β-Mercaptoethanol zugesetzt.

- Spritzen, 3, 5, 10, und 20 ml: Plastipak, Luer-Lock (Becton Dickinson).

- Kanülen: Sterican 20G × 2 4/5", Luer-Lock (Braun).

Durchführung:

- Zellernte:
  Die Zellen werden wie bei der Zellpassage trypsiniert oder mittels Zellschaber (Costar) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Die Zellen werden in ein 15 ml Falcon Polypropylenröhrchen überführt und mit 200 ×g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert.

- Homogenisieren der Zellen:
  Der Überstand wird gründlich abgesaugt und pro 1×10^7 Zellen 1 ml kalte Lösung D auf das Zellpellet gegeben. Um die Zellen zu lysieren und genomische DNA zu scheren, wird das Gemisch auf Eis gestellt und zwanzigmal durch eine lange, dünne Kanüle (0,9 × 40 mm) gepreßt. Wird das Lysat nicht sofort weiterverwendet, kann es bei -80 °C gelagert werden.

2.2.12.2 Gewinnung der Gesamt-RNA

Materialien:

- 2 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,0:
  Zu 2 M Natriumacetat wird unter Kontrolle des pH-Wertes so lange 2 M Essigsäure hinzugefügt, bis ein pH-Wert von 4,0 erreicht ist.

- Aquaphenol (Appligene);

- Ready Red (Appligene);

- Chloroform/Isoamylalkohol in einem Mischungsverhältnis von 49:1

- Isopropanol;

- 3 M Natriumacetat, pH 8,0;

- Ethanol, absolut;

- 70% Ethanol, eiskalt;

- Polypropylen-Röhrchen (für verschiedene Extraktionsvolumina):
  2 ml-Schraubdeckel-Reaktionsgefäße (Sarstedt),
  30 ml Zentrifugenröhrchen mit Standfuß und Schraubdeckel (Sarstedt),
  50 ml-Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel (Sarstedt),
  20 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Sarstedt).

Durchführung:

- Dem Zellhomogenat wird nacheinander 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat, 1 Volumen Aquaphenol und 1/5 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) hinzugefügt, wobei nach jeder Zugabe kurz geschüttelt wird. Trotz der Anwesenheit des starken RNase Inhibitors Guanidiniumisothiocyanat in der Lösung sollte schnell und auf Eis gearbeitet werden, um eine Degradation der RNA zu vermeiden.

- Das Gemisch wird 5–10 min kräftig geschüttelt und anschließend 20 min bei 4 °C zentrifugiert: 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 10000 ×g, 30 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 6000 ×g. Nach der Zentrifugation befindet sich die RNA in der wäßrigen Phase, während DNA und Proteine sich in der Interphase und der organischen Phase befinden.

- Die obere, wäßrige Phase wird vorsichtig abgenommen, erneut, wie beschrieben, mit Aquaphenol und Chloroform/Isoamylalkohol 49:1 ausgeschüttelt und zentrifugiert. Wieder wird die obere Phase abgenommen, und – um Phenol-Reste so gründlich wie möglich aus der wäßrigen Phase zu entfernen – mit 2/3 Volumen Aquaphenol und 1/3 Ready Red versetzt, und wie zuvor geschüttelt und zentrifugiert.
- Die wäßrige Phase wird mit 9/10 Volumen Isopropanol gemischt und bei -20 °C über Nacht oder mindestens 1 h auf Trockeneis gefällt. Je nach Volumen wird in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen oder 20 ml Ultrazentrifugenröhrchen mit 18000 ×g bei 4 °C für 40 min zentrifugiert.
- Das hierbei entstandene RNA-Pellet wird in Ampuwa gelöst und eine Ethanol-Fällung angeschlossen, um eventuell mit ausgefallene Salze zu entfernen. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen absolutem Ethanol wird bei -20 °C über Nacht oder mindestens 1 h auf Trockeneis gefällt. Der Zentrifugation bei 18000 ×g und 4 °C für 40 min folgt das Waschen des RNA Pellets mit 70 % eiskaltem Ethanol. Schließlich wird die RNA 10 min unter Vakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen sterilem bidest. Wasser (für die RT-PCR) aufgenommen. Die RNA wird bei -80 °C entweder in H_2O oder besser als Ethanol-Fällung gelagert.

2.2.13 Spektrometrische Bestimmung der Konzentration von RNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgt analog der von DNA (siehe 2.2.4) bei 260 nm in einem Einkanal-UV-VIS-Spektrometer (Beckman DU-640). Da RNA einzelsträngig vorliegt, entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von ca. 40 µg/ml. Auch hier läßt der Quotient E_{260}/E_{280} Rückschlüsse auf die Reinheit der Nucleinsäure-Lösung zu. Werte zwischen 1,8 und 2,0 sind akzeptabel, während niedrigere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hinweisen.[3] RNA-Lösungen sind häufig zähflüssig, so daß bei der Verdünnung für die photometrische Konzentrationsbestimmung häufig Pipettierfehler auftreten. Mehrfachbestimmungen sind also notwendig, um verläßliche Meßwerte zu erhalten.

[3] Für in bidest. Wasser gelöste RNA wird im allgemeinen ein etwas niedrigerer Wert erreicht, als für RNA, die in TE-Puffer gelöst wurde (siehe auch Fußnote 1).

2.2.14 Polymerase-Kettenreaktion nach cDNA-Synthese durch reverse Transkription (RT-PCR)

RT-PCR eignet sich sehr gut zur Analyse von Gen-Transkripten, vor allem aufgrund ihrer Sensitivität, aber auch weil Ergebnisse schnell zu erhalten sind. Zunächst wird RNA aus Zellen (siehe 2.2.12) isoliert und als Matrize zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription (RT) benutzt. Die so entstandene cDNA dient anschließend in der PCR als Probe. Die Primer werden so ausgewählt, daß eine bestimmte cDNA-Region amplifiziert wird. Eine thermostabile Polymerase (in der Regel Taq-Polymerase oder rekombinante Derivate) katalysiert nach dem Denaturierungs-Schritt und dem Hybridisieren der Primer an die cDNA-Matrize („Annealing") die Verlängerung der Primer („Extension"). Durch die zyklische Anwendung von Denaturieren, „Annealing" und „Extension" gelingt die Amplifikation des gewünschten cDNA-Fragments (Bloch, 1991).

2.2.14.1 Primer-Design

Primer werden mit Hilfe des Programms PRIMER (Bestandteil der Sequenzanalyse-Software HUSAR, European Molecular Biology Laboratories, EMBL, Heidelberg) ausgewählt. Aufgrund der gewählten Programm-Parameter ist gewährleistet, daß:

- eine Dimer-Bildung der beiden Primer und die Sekundärstruktur-Bildung innerhalb eines Primers durch Selbst-Komplementarität unwahrscheinlich ist.
- der GC-Gehalt zwischen 40 % und 70 % liegt und dem GC-Gehalt der zu amplifizierenden Sequenz ähnlich ist.
- wenn möglich, die Sequenz so gewählt wird, daß die Stabilität des Primers am 5'-Ende größer ist als am 3'-Ende.
- die Schmelztemperatur (T_m, berechnet nach der „Nearest-Neighborhood"-Methode) der beiden Primer ähnlich ist (maximaler Unterschied: 1 °C) und bei ca. 60 °C liegt.
- die Länge der Primer 18–24 bp beträgt. Um nur ein einziges, spezifisches DNA-Fragment zu amplifizieren, sollte die Primer-Sequenz in der Probe nicht wiederholt vorhanden sein oder große Ähnlichkeit zu anderen Sequenzen besitzen.

Deshalb werden mit Hilfe der Algorithmen BLASTN und FASTA die Datenbanken des EMBL nach der Primer-Sequenz ähnlichen Sequenzen durchsucht. Nur bei negativem Suchergebnis wird der Primer tatsächlich in der PCR eingesetzt. Die Primer-Synthese erfolgt durch die Firmen Pharmacia Biotech, Eurogentec oder Life Technologies.

2.2.14.2 Reverse Transkription

Materialien:

- Super Script II MoMLV RNase H/Reverse Transkriptase, 200 U/µl (Life Technologies);
- Oligo(dT)$_{12-18}$-Primer, 500 µg/ml (Boehringer Mannheim);
- First Strand Buffer, 5× (Life Technologies):
  250 mM Tris-HCl, pH 8,3,
  375 mM KCl,
  15 mM $MgCl_2$;
- 0,1 M DTT (Life Technologies);
- 10 mM dNTP-Mix:
  10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Boehringer Mannheim).

Durchführung:

- Folgende Komponenten werden auf Eis in ein steriles 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, gemischt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt:
  Oligo(dT)12-18-Primer (500 µg/ml): 1 µl,
  Gesamt-RNA: 0,5–5 µg,
  aufgefüllt auf 12 µl mit sterilem bidest. Wasser.
- Ein zusätzlicher Ansatz enthält zwar alle RT-Reagenzien, aber keine Gesamt-RNA („Leer-Transkript"), um später in der PCR die Komponenten der RT-Reaktion auf Kontamination überprüfen zu können.
- Die Ansätze werden bei 70 °C 10 min denaturiert, 2 min auf Eis abgekühlt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt.

- Anschließend wird den Ansätzen auf Eis folgendes hinzugefügt:
  4 µl First Strand Buffer 5×,
  2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird gemischt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt.
- Die RT-Ansätze werden 2 min auf 37 °C vorgewärmt, 1 µl reverse Transkriptase (Super Script II, Life Technologies) wird hinzugefügt und gemischt.
- Die reverse Transkription erfolgt 1 h bei 42 °C. Die cDNA Probe kann nun sofort in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

2.2.14.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Auf Grund des exponentiellen Charakters der PCR müssen selbst kleinste Verunreinigungen von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkt vermieden werden. Das Pipettieren des PCR-Ansatzes findet räumlich getrennt von dem Ort statt, an dem das PCR-Produkt analysiert wird, wobei jeweils auch ein hierfür reservierter Pipetten-Satz verwendet wird. Alle für die PCR bestimmten Reagenzien werden in Aliquots gelagert. Steriles bidest. Wasser wird literweise verpackt bezogen (Ampuwa, Fresenius). Vermutlich mit PCR-Produkt verunreinigte Reagenzien werden ausgetauscht, verunreinigte Gegenstände werden mit kurzwelligem UV-Licht bestrahlt oder mit 1 M HCl behandelt.

Materialien:

- Taq-Polymerase, 5 U/µl (Qiagen);
- PCR-Puffer, 10× (Qiagen):
  enthält 15 mM $MgCl_2$, pH 8,7; keine genaue Angabe der Zusammensetzung;
- Q-Lösung, 5× (Qiagen):
  enthält Betain, keine genaue Angabe der Zusammensetzung;
- 25 mM $MgCl_2$ (Qiagen);
- 10 mM dNTP-Mix:
  10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Boehringer Mannheim);
- spezifische Primer:
  10 µM „forward“ Primer 10 µM „reverse“ Primer;

- steriles, bidest. Wasser:
  Ampuwa (Fresenius);
- DMSO, (Sigma);
- Formamid (Life Technologies);
- Glycerol (Sigma);
- Polyethylenglycol (PEG) 6000 (Pharmacia Biotech);
- Tween 20 (Fluka);
- Filterpipettenspitzen (Biozym);
- dünnwandige 0,2 ml und 0,5 ml-Reaktionsgefäße (Biozym);
- PCR-Gerät, „Thermo-Cycler“: Gene-Amp 9600 (Perkin Elmer).

Durchführung:
Für eine Standard-PCR-Reaktion werden die in Tabelle 2.1 angegebenen Komponenten in einem auf Eis vorgekühlten dünnwandigen 0,2 ml-Reaktionsgefäß in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Der PCR-Mix wird für alle Reaktionen, die unter den gleichen Bedingungen ablaufen sollen, gemeinsam in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt, gemischt und anschließend auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt.
Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionen wird durch Variation der $MgCl_2$-Konzentration (1,5–5,0 mM), den Einsatz verschiedener Puffer und die Zugabe verschiedener – in Tabelle 2.2 aufgeführter – Zusätze optimiert.
Bei jeder PCR werden außer den eigentlichen Probe-Reaktionen auch Negativkontrollen angesetzt:

- Um die PCR-Reagenzien auf Kontamination zu überprüfen, wird die cDNA-Probe durch Ampuwa ersetzt.
- Um die RT-Reagenzien auf Kontamination zu überprüfen, wird die cDNA-Probe durch „Leer-Transkript“ (siehe 2.2.14.2) ersetzt.
- Um die in der RT-Reaktion eingesetzte RNA auf Verunreinigung mit DNA zu überprüfen, wird die cDNA-Probe durch nicht revers transkribierte RNA ersetzt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzng einer Standard-PCR-Reaktion

Komponenten		*Volumen pro Reaktion*	*Endkonzentration im Ansatz*
PCR-Mix:	10× PCR-Puffer (Qiagen)	10 µl	1×
	25 mM $MgCl_2$	6 µl	1,5 mM
	10 mM dNTP-Mix	2 µl	200 µM
	10 µM „forward“ Primer	2 µl	0,2 µM
	10 µM „reverse“ Primer	2 µl	0,2 µM
	Ampuwa (steriles Wasser)	83,5 µl – x µl	–
cDNA:	revers transkribierte Gesamt-RNA	x µl	0,5–2 µg100 µl
Enzym:	Taq DNA Polymerase	0,5 µl	2 U/100 µl

Tabelle 2.2: Spezifitätsverstärker und Beschleuniger für die PCR

PCR-Zusatz		*Endkonzentration*
Spezifitätsverstärker:	5× Lösung Q (Qiagen)	1×
	DMSO	$< 10\,\%$
	Formamid	$< 5\,\%$
Beschleuniger:	Glycerol	10–15 %
	Polyethylenglycol (PEG) 6000	5–15 %
	Tween 20	0,1–2,5 %

Tabelle 2.3: Ablauf des verwendeten PCR-Programms

Programmschritt		*Dauer*	*Temperatur*
Denaturieren der cDNA-Matrize zu Beginn:		5 min	94 °C
3-Schritt PCR (Zahl der Zyklen: 20–42):	Denaturieren	1 min	94 °C
	„Annealing“[a]	1 min	54–70 °C
	„Extension“	1,5 min	72 °C
Verlängerung der entstandenen PCR-Produkte am Ende:		10 min	72 °C

[a]Für jedes Primer-Paar muß die optimale „Annealing“-Temperatur ermittelt werden.

Sofort nach der Zugabe der Taq-Polymerase werden die Proben in den „Thermo-Cycler“ überführt. Da der Deckel des Geräts beheizt ist und so ein Verdunsten der Proben verhindert, ist das Überschichten der Proben mit Mineralöl nicht nötig. Ein Standard-Programm für den „Thermo-Cycler“ ist in Tabelle 2.3 dargestellt. Nach Beendigung des PCR-Programms können die Proben über Nacht bei 4 °C oder für längere Zeit bei -20 °C gelagert werden.

2.2.15 DNA-Sequenzierung: Didesoxymethode nach Sanger

Dieses Verfahren zum Ermitteln der Basenabfolge einer DNA-Sequenz beruht auf dem Prinzip, daß DNA-Fragmente, die durch kontrollierten Abbruch der enzymatischen Replikation des DNA-Einzelstrangs erzeugt wurden, elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend detektiert werden (Sanger & Coulson, 1975; Sanger et al., 1977). Zur Replikation des Einzelstrangs wird zumeist eine rekombinante DNA-Polymerase bakteriellen oder viralen Ursprungs und ein synthetischer Primer verwendet. Zusätzlich zu den vier benötigten Desoxyribonucleotiden enthält das Reaktionsgemisch noch ein 2’,3’-Didesoxyanalogon. Der Einbau des Analogons in den DNA-Strang blockiert die weitere Synthese, da durch das fehlende 3’-Hydroxylende keine weitere Phosphodiesterbindung mehr geknüpft werden kann; es kommt zum Abbruch der Synthese. Das Verhältnis von Didesoxyanalogon zum eigentlichen Desoxyribonucleotid wird so gewählt, daß der Kettenabbruch an allen möglichen Positionen stattfindet. Zur Sequenzierung werden vier solcher Ansätze (einer für jedes Didesoxyanalogon) elektrophoretisch aufgetrennt und die Fragmente detektiert, wodurch die Basenabfolge ermittelt werden kann. Zur Detektion kommen unterschiedliche Methoden in Frage; in der vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion mittels Autoradiographie: Hierfür wird in den Sequenzierreaktionen anstelle von dATP $\alpha[^{35}S]$-dATP eingesetzt. Dadurch können die im Sequenzgel aufgetrennten einzelsträngigen DNA-Fragmente durch Filmschwärzung sichtbar gemacht werden. Die eigentliche Sequenzierreaktion wird mit Hilfe des ^{T7}Sequencing-Kits (Pharmacia Biotech) durchgeführt, bei dem als Polymerase T7-DNA-Polymerase verwendet wird. Im Gegensatz zur Sequenzierung mit Klenow-Fragment als DNA-Polymerase erfolgt die Reaktion in zwei Schritten. Im ersten Schritt, der Markierungsreaktion, findet die Replikation in Abwesenheit eines Didesoxynucleotids statt. T7-Polymerase akzeptiert Didesoxynucleotide praktisch ebenso gut als Substrat wie Desoxynucleotide; um auch längerkettige Abbruchfragmente zu erhalten, ist daher eine gewisse Zeit der Primer-Verlängerung ohne Abbruch notwendig. Im zweiten Schritt, der Abbruchreaktion, werden dann die Didesoxyanaloga zugesetzt und somit die Abbruchfragmente erzeugt.

Materialien:

- Macrophor-Sequenziergelapparatur (Pharmacia Biotech);
- DNA-Sequenziergelsystem (Roth) bestehend aus Sequenziergel-Konzentrat, Sequenziergel-Verdünner und Puffer-Konzentrat.
- TBE-Stammlösung (10×):
  121 g Tris-Base,
  53,4 g Borsäure,
  7,4 g EDTA oder 40 ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0,
  werden mit bidest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die resultierende Lösung besitzt einen pH von 8,3.
- Ammoniumperoxodisulfat- Lösung (10 %):
- 1 g APS werden in 10 ml bidest. Wasser gelöst aliquotiert (je 400 µl) und bei -20 °C aufbewahrt. Einmal aufgetaute Aliquots werden nicht wieder eingefroren, sondern verworfen.
- TEMED (Sigma);
- $\alpha[^{35}S]$-dATP, 10 µCi/µl (Amersham).

Alle folgenden Komponenten sind Bestandteil des ^{T7}Sequencing-Kits (Pharmacia Biotech):

- T7-Polymerase, 8 U/µl;
- Annealing Buffer:
  1 M Tris/HCl (pH 7,6),
  100 mM $MgCl_2$,
  160 mM DTT;
- Enzyme Dilution Buffer:
  20 mM Tris/HCl (pH 7,5),
  5 mM DTT,

100 µg/ml BSA,
5 % Glycerol;

- Labeling-Mix-dATP:
  1,375 µM dCTP, dGTP, dTTP in 333.5 mM NaCl.

- „A-Mix-Short“, „C-Mix-Short“, „ G-Mix-Short“, „T-Mix-Short“ (Zusammensetzung, siehe Tabelle 2.4);

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Nucleotidgemische für die Abbruchreaktion bei der Sequenzierung mit T7-Polymerase

A-Mix-Short	*C-Mix-Short*	*G-Mix-Short*	*T-Mix-Short*	*Konzentration*
dCTP, dGTP, dTTP				je 840 µM
dATP				93,5 µM
ddATP	ddCTP*	ddGTP	ddTTP	14 µM/*17 µM
Tris-HCl (pH 7,6)				40 mM
NaCl				50 mM

- Stop-Lösung:
  0,3 % Bromphenolblau, 0,3 % Xylen-Cyanol FF, in 10 mM EDTA, pH 7,5 und 97,5 % deionisiertem Formamid.

Durchführung:
Gießen des Gels:

- Vor dem Gießen des Gels werden die Sequenzgelplatten gründlich gereinigt.[4] Die Thermostatplatte wird zusätzlich mit Repel-Silan ES behandelt, um das spätere Ablösen des Gels zu erleichtern. Hierzu werden ca. 5 ml Repel-Silan ES (Dimethyl-dichlorsilan, 2 % w/v in Octamethylcyclotetrasiloxan) auf der Glasplatte verrieben. Nach 5–10 min wird die Platte zunächst mit Ethanol und dann mit bidest. Wasser abgerieben.

[4]Je 5 ml 1 M NaOH und Methanol werden auf die Sequenzgelplatten gegeben und unter Druck verrieben, um alle Gelreste zu entfernen. Dann werden 2,5 ml SDS-Lösung (0,1 %) aufgegeben und verrieben bis die Platten wieder trocken sind. Anschließend werden die Platten mit bidest. Wasser abgesspült, trockengerieben und mit 5 ml Aceton entfettet. Abschließend wird mit bidest. Wasser das Aceton entfernt und die Platten trockengerieben.

- Für ein Sequenzgel (6 %, denaturierendes Polyacrylamidgel in TBE mit 8,3 M Harnstoff) werden:
  12 ml Sequenziergel-Konzentrat,
  33 ml Sequenziergel-Verdünner,
  5 ml Puffer-Konzentrat
  gemischt und zur Polymerisation mit 400 µl APS-Lösung, 10 % und 20 µl TEMED versetzt. Beim Gießen des Gels ist darauf zu achten, daß keine Luftblasen entstehen. Unmittelbar nach dem Gießen wird der Probenkamm (Haifischkamm) eingesetzt und fixiert. Nach 60–90 min bei Raumtemperatur ist das Gel auspolymerisiert.

Sequenzierreaktion:

- Präparation von Einzelstrang-Template aus Plasmid-DNA:
  Zunächst wird eine Plasmid-Lösung hergestellt, die 1,5–2 µg DNA in 8 µl enthält. Zur Denaturierung werden 2 µl 2 M NaOH zugesetzt, kurz gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 3 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 7 µl bidest. Wasser (steril) zugesetzt und zur Fällung 60 µl Ethanol (100 %) zugegeben. Nach Inkubation bei -80 °C für 15 min wird die gefällte DNA abzentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 18000 ×g für 10 min bei 4 °C). Der Überstand wird verworfen, die gefällte DNA vorsichtig mit 60 µl eiskaltem Ethanol (70 %) versetzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, die DNA für 10 min im Wärmeblock bei 37 °C getrocknet und abschließend in 10 µl bidest. Wasser (steril) gelöst.

- Hybridisierung von Template und Primer:
  Die Primer-Lösung wird so angesetzt, daß sie ca. 2,5 pmol Primer/µl enthält (entspricht bei einem 20mer 16,5 ng/µl). Zur gelösten denaturierten DNA werden 2 µl Annealing-Puffer und 2 µl Primer-Lösung zugegeben. Zur Hybridisierung wird zunächst für 20 min bei 37 °C und anschließend mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. An dieser Stelle können die Proben bei -20 °C eingefroren werden.

- Herstellung der Polymerase-Lösung: Ein T7-Polymerase-Aliquot wird mit Enzyme Dilution Buffer auf 1,5 U/µl verdünnt. Pro Template werden 2 µl der Polymerase Lösung benötigt. Nach dem in Tabelle 2.5 dargestellten Schema wird dann die benötigte Menge an „Enzyme Premix“ angesetzt:

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des „Enzyme Premix“ für die Sequenzierung mit T7-Polymerase

Zahl der Templates:	1	2	3	n
bidest. Wasser (steril):	1 µl	2 µl	3 µl	n µl
Labeling-Mix-dATP:	3 µl	6 µl	9 µl	3n µl
Polymerase-Lösung:	2 µl	4 µl	6 µl	2n µl
α[^{35}S]-dATP (1 µl = 10 µCi):	1 µl	2 µl	3 µl	n µl
Gesamtvolumen:	7 µl	14 µl	21 µl	7n µl

- Markierungsreaktion:
  Vor dem Start der Markierungsreaktionen müssen die Abbruchreaktionen vorbereitet werden. Zu diesem Zweck werden vier Spalten einer Microsample-Platte mit A, C, G, T, die Reihen mit Bezeichnungen für die Hybridisierungsansätze beschriftet. In die entsprechenden Vertiefungen werden zunächst nur je 2,5 µl A-, C-, G-, T-Mix-Short vorgelegt. Dann erst werden durch Zugabe von je 6 µl Enzyme Premix zu den (in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen vorliegenden) Hybridisierungsansätzen die Markierungsreaktionen gestartet (jeweils im 30 sec Abstand). 4 min nach Start der ersten Reaktion wird die vorbereitete Microsample-Platte auf den 37 °C-Wärmeblock überführt.

- Abbruchreaktion:
  5 min nach Start der ersten Markierungsreaktion werden je 4,5 µl der Reaktionsansätze in die A-, C-, G-, T-Vertiefungen der ersten Reihe der Microsample-Platte gegeben. Mit allen anderen Ansätzen wird im 30 sec Abstand identisch verfahren, wobei bei allen Schritten die Microsample-Platte auf dem 37 °C-Wärmeblock belassen wird. 5 min nach Start der ersten Abbruchreaktion werden je 5 µl Stop-Lösung in die A-, C-, G-, T-Vertiefungen der ersten Reihe der Microsample-Platte gegeben. Mit allen anderen Ansätzen wird im 30 sec Abstand identisch verfahren. Wird die Elektrophorese nicht am gleichen Tag durchgeführt, wird die Microsample-Platte bei -20 °C eingefroren. Ansonsten wird die Microsample-Platte mit aufgesetztem Deckel auf den 80 °C-Wärmeblock überführt und für 2 min inkubiert. Anschließend werden die Proben (je ein 3,5 µl Aliquot) sofort aufs Gel aufgetragen.

Gel-Lauf und Autoradiographie:

- Das Gel wird in der Sequenzgelapparatur befestigt und die Kammern mit TBE-

Lösung (1×) befüllt, so daß die Gelränder in den Puffer eintauchen. Der Kamm wird vorsichtig entfernt und die Taschen mit TBE ausgespült (Entfernen von Harnstoff). Der untere Gelrand wird ebenfalls gespült, um Luftblasen zu entfernen. Dann wird die Macrophor-Apparatur auf 55 °C thermostatisiert und für 30–60 min mit konstanter Leistung von 60 W ein Vorlauf durchgeführt. Nach dem Vorlauf werden erneut die Taschen und der untere Gelrand gespült. Pro Spur werden 3,5 µl Probe mit Hilfe von Gel-loading Tips (Roth) aufgetragen und die Elektrophorese mit konstanter Leistung von 60 W durchgeführt. Der Gel-Lauf wird abgebrochen, wenn der erste Farbmarker (Bromphenolblau) den unteren Gelrand erreicht. Beide Pufferreservoirs werden entleert. Der Inhalt des unteren Reservoirs wird zum radioaktiven Abfall gegeben (enthält nicht eingebautes $\alpha[^{35}S]$-dATP).

- Der Gel-Sandwich wird aus der Apparatur ausgebaut, die Spacer vorsichtig entfernt und die Ohrenplatte mit dem anhaftenden Gel von der Thermostatplatte abgelöst. Ein zugeschnittenes Whatman 3MM Filterpapier wird auf das Gel gelegt und das Gel wird vorsichtig von der Ohrenplatte abgezogen. Das nun auf dem Filterpapier haftende Gel wird mit Frischhaltefolie abgedeckt und unter Vakuum im Geltrockner (Aldo-Xer, Schütt) bei 80 °C getrocknet.

- Das Filterpapier mit dem vollständig getrockneten Gel wird in eine Röntgenkassette überführt und in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Kodak Bio-Max MR) aufgelegt. Der Film wird über Nacht belichtet und anschließend entwickelt.

2.3 Zellbiologische Materialien und Methoden

2.3.1 Verwendete Zellinien

Alle verwendeten Zellinien werden mittels ELISA (Mycoplasma Detection Kit, Boehringer Mannheim) auf Mycoplasmen getestet. Es werden nur Mycoplasma-negative Linien verwendet; bei positivem Ergebnis wird die entsprechende Zellinie komplett verworfen und durch eine Mycoplasmen-freie Kultur ersetzt.

- BHK-21 (Baby Hamster Kidney):
  Diese Zellinie mit Fibroblasten-artiger Morphologie leitet sich von einem Nie-

renzellisolat neugeborener Goldhamster ab (Macpherson & Stoker, 1964). Sie kann durch VSV, Serotyp Indiana und SeV, nicht aber durch MoMLV infiziert werden.
Empfohlenes Kulturmedium (ATCC): 80 % Modified Eagle's BME/10 % Difco tryptose phosphate broth + 10 % FCS.
Verwendetes Kulturmedium: DMEM mit 2 mM Alanyl-Glutamin + 10 % FCS.

- CV-1:
  Diese Zellinie wurde aus dem Nierenzellisolat einer Afrikanischen Grünen Meerkatze gewonnen (Jensen et al., 1964). Die Zellinie wird seither insbesondere zu SV40-Studien verwendet, läßt sich aber auch mit einer Reihe anderer Viren infizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden CV-1-Zellen zur Vermehrung rekombinanter Vaccinia Viren eingesetzt.
  Empfohlenes Kulturmedium (ATCC): MEM mit EBSS + 10 % FCS.
  Verwendetes Kulturmedium: MEM mit EBSS + 10 % FCS.

- HepG2:
  Diese Zellinie leitet sich von einem hepatozellulären Carcinom eines 15-jährigen Patienten ab (Knowles et al., 1980). Die Zellen exprimieren zahlreiche Hepatocyten-spezifische Proteine, u. a. den ASGP-R (Schwartz et al., 1981). Es gibt keine Anhaltspunkte für eine HBV-Infektion, d. h. in den Zellen sind weder HBV-DNA-Integrate nachweisbar noch läßt sich HBsAg detektieren.
  Empfohlenes Kulturmedium (ATCC): MEM mit EBSS + 10 % FCS + NEAA + Natriumpyruvat.
  Verwendetes Kulturmedium: MEM mit EBSS/DMEM (im Verhältnis 4:1) + 10 % FCS + NEAA + Natriumpyruvat + Biotin + 4,5 g/l Glucose. Der Biotin- und der Glucose-Zusatz dienen der Stimulierung der ASGP-R Expression (Collins et al., 1988; Weiss et al., 1994). Die Mischung aus MEM und DMEM wird verwendet, da die Zellen in diesem Gemisch besser wachsen als in reinem MEM.

- HuH7:
  Diese Zellinie leitet sich von einem hepatozellulären Carcinom eines 57-jährigen Patienten ab (Nakabayashi et al., 1982). Die Zellinie ist HBsAg-negativ und exprimiert in FCS-freiem Medium zahlreiche Hepatocyten-spezifische Proteine.
  Empfohlenes Kulturmedium (Nakabayashi et al., 1982): RPMI 1640 + 20 % FCS + 0,4 % Lactalbumin-Hydrolysat.

Verwendetes Kulturmedium: M199 + 10 % FCS.

- MDCK (Madin Darby Canine Kidney):
  MDCK-Zellen leiten sich von einem Nierenzellisolat eines gesunden Cockerspaniels ab (Gaush et al., 1966). Die Zellen zeigen in Kultur eine polaren Aufbau und eignen sich daher zum Studium der Sortierung von eigenen und fremden Membranproteinen (Wessels et al., 1989).
  Empfohlenes Kulturmedium (ATCC): MEM mit EBSS +10 % FCS.
  Verwendetes Kulturmedium: MEM mit EBSS + 10 % FCS.

- M12:
  M12-Zellen, die den humanen ASGP-R stabil exprimieren, sind von MDCK-Zellen abgeleitet und wurden im Labor von M. Spiess im Biozentrum Basel etabliert. (Fuhrer et al., 1993[5]). Die ASGP-R H1 cDNA wurde mittels eines rekombinanten Retrovirus, also mittels Transduktion, die ASGP-R H2 cDNA mittels stabiler Transfektion in die Zellen eingebracht. Als Selektionsmarker dienten hierbei die Neomycin- bzw. die Histidinol-Resistenz.
  Empfohlenes Kulturmedium (M. Spiess, pers. Mitteilung): MEM mit EBSS + 10 % FCS + 2 mg/ml Histidinol.
  Verwendetes Kulturmedium: MEM mit EBSS +10 % FCS + 2 mg/ml Histidinol + 600 µg/ml G418.

- NIH 3T3:
  Hierbei handelt es sich um eine embryonale Mäuse-Fibroblasten-Zellinie (Jainchill et al., 1969), deren Zellen ursprünglich eine starke Kontaktinhibition aufwiesen. Die Zellinie ist Basis für viele retrovirale Verpackungszellinien und kann durch ecotropes oder amphotropes MoMLV, VSV und SeV infiziert werden.
  Empfohlenes Kulturmedium (ECACC): DMEM mit 2 mM Glutamin + 10 % NCS[6].
  Verwendetes Kulturmedium: DMEM mit 2 mM Alanyl-Glutamin + 10 % FCS[7].

[5]In dieser Veröffentlichung wird die Bezeichnung M(y+f) für M12-Zellen verwendet.

[6]Um die Kontaktinhibition der Zellen aufrecht zu erhalten, sollte anstelle von fötalem Kälberserum (FCS) Serum neugeborener Kälber (NCS) verwendet werden.

[7]Da die Zellen des verwendeten NIH 3T3-Klons keine Kontaktinhibition mehr auwiesen, wurde FCS anstelle von NCS verwendet.

- PE501:[8]
  Diese von 3T3tk^{-}-Zellen abgeleitete Zellinie (Miller & Buttimore, 1986) enthält ein stabil integriertes, modifiziertes MoMLV-Genom, exprimiert alle retroviralen Strukturgene (*gag, pol, env*) und eignet sich daher als Verpackungszellinie zur Generierung rekombinanter Retroviren (Miller & Buttimore, 1986). Mit Hilfe von PE501 erzeugte rekombinante Retroviren transduzieren nur Mäuse- und Rattenzellen (ecotropes Wirtsspektrum).
  Empfohlenes Kulturmedium (Miller et al., 1993): DMEM mit 2 mM Glutamin + 10 % FCS.
  Verwendetes Kulturmedium: DMEM mit 2 mM Alanyl-Glutamin + 10 % FCS.

- PA317[8]:
  Bei PA317 handelt es sich wie bei PE501 um eine retrovirale Verpackungszellinie. Im Gegensatz zu PE501 ist das ursprüngliche MoMLV *env*-Gen gegen das *env*-Gen des endogenen Maus-Retrovirus 4070A (Chattopadhyay et al., 1981) ausgetauscht. Mit Hilfe von PA317 erzeugte rekombinante Retroviren transduzieren daher ein breites Spektrum an Säugerzellen (amphotropes Wirtsspektrum).
  Empfohlenes Kulturmedium (Miller et al., 1993): DMEM mit 2 mM Glutamin + 10 % FCS.
  Verwendetes Kulturmedium: DMEM mit 2 mM Alanyl-Glutamin + 10 % FCS.

- Phoenix-Eco:[9]
  Diese von 293T-Zellen abgeleitete Zellinie (Achacoso et al., 1996) enthält ein stabil integriertes, modifiziertes MoMLV-Genom, exprimiert alle retroviralen Strukturgene (*gag, pol, env*) und eignet sich daher als Verpackungszellinie zur Generierung rekombinanter Retroviren (siehe 2.4.4.4). Mit Hilfe von Phoenix-Eco erzeugte Retroviren transduzieren nur Mäuse- und Rattenzellen. Im Vergleich zu PE501 lassen sich mit Phoenix-Eco höhere Virus-Titer erzielen.
  Verwendetes Kulturmedium: DMEM mit 2 mM Alanyl-Glutamin + 10 % FCS.

- Phoenix-Ampho:[9]
  Phoenix-Ampho stellt das amphotrope Gegenstück zu Phoenix-Eco dar (analog dem Zellinienpaar PE501/PA317).
  Verwendetes Kulturmedium: DMEM mit 2 mM Alanyl-Glutamin + 10 % FCS.

[8] PE501 und PA317 wurden freundlicherweise von A. D. Miller zur Verfügung gestellt.

[9] Phoenix-Eco und Phoenix-Ampho wurden freundlicherweise von G. P. Nolan zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Zellkultur

2.3.2.1 Allgemeines

Alle Arbeitsschritte, die steril ablaufen müssen, werden in einer Sicherheitswerkbank (Clean Air DLF/BSS 4) durchgeführt.
Medien und Puffer werden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C temperiert.
Die Kultivierung aller verwendeten Zellinien erfolgt bei 36,5 °C in 5 % CO_2-Atmosphäre in Wasser-ummantelten Inkubatoren (Forma-Scientific).

Materialien:

- 100 mM Natrium-Pyruvat-Lösung (Life Technologies);

- Fötales Kälberserum (FCS, Life Technologies);

- Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) bzw. Minimal Essential Medium (MEM) bzw. Medium 199 (M199) mit 2 mM L-Alanyl-Glutamin + 10 % FCS:
  450 ml DMEM bzw. MEM bzw. M199/Glutamax (Life Technologies) werden mit 50 ml FCS versetzt. L-Alanyl-Glutamin kann von den meisten Zellinien genauso gut wie L-Glutamin verwertet werden, ist aber in Lösung sehr viel stabiler als dieses. Das jeweilige Medium wird je nach Zellinie noch mit weiteren Supplementen versehen. Im Falle von DMEM wird immer die Variante mit hohem Glucosegehalt (4,5 g/l), Natrium-Pyruvat und $NaHCO_3$ verwendet.

- PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}:
  95,5 g Dulbecco's PBS-Pulver (Sigma) werden in 10 l bidest. Wasser gelöst, aliquotiert und autoklaviert. Die Lösung hat folgende Zusammensetzung:
  8 g/l NaCl,
  1,15 g/l Na_2HPO_4,
  0,2 g/l KH_2PO_4,
  0,2 g/l KCl.
  Die Aufbewahrung erfolgt bei 4 °C.

- Trypsin/EDTA mit Phenolrot:
  Fertiglösung (Life Technologies), die 0,25 g/l Trypsin enthält und bei -20 °C gelagert wird. Einmal aufgetaute Gebrauchslösung wird bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.2.2 Auftauen von Zellen

Folgendes Protokoll wird für alle benutzten Zellinien verwendet:

Durchführung:

- Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden möglichst rasch ins 37 °C Wasserbad überführt und aufgetaut.
- Die Zellsuspension wird vorsichtig mit 10 ml FCS-haltigem Medium vesetzt, für 2 min mit 200 ×g (Heraeus Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor) zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Das Zellsediment wird in 5 ml oder 10 ml FCS-haltigem Medium resuspendiert und in eine 50 ml- oder 260 ml-Zellkulturflasche ausgesät.

2.3.2.3 Zellpassage

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit werden die in Kultur gehaltenen Zellinien ein- bis dreimal pro Woche nach folgender Vorschrift passagiert. Die Passage erfolgt, wenn die Zellen 80 % Konfluenz erreicht haben.

Durchführung:

- Das alte Medium wird entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen (Trypsin wird durch FCS inaktiviert).
- 1 ml Trypsin/EDTA werden so zugegeben, daß der gesamte Zellrasen bedeckt ist.
- Wenn sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen, werden 4 ml DMEM + 10 % FCS zugegeben, die gesamte Zellsuspension aufgenommen, die gewünschte Menge (1/2 bis 1/20) passagiert und mit 12 ml frischem Medium versetzt.

Die Mengenangaben beziehen sich auf 260 ml-Kulturflaschen (Nunc) und können für 800 ml-Kulturflaschen einfach verdoppelt und für 50 ml-Kulturflaschen halbiert werden.

2.3.2.4 Cryokonservierung von Zellen

Materialien:

- Einfriermedium:
  70 % FCS-freies Medium, 20 % FCS, 10 % DMSO (Sigma);
- Cryoröhrchen, 2 ml (Nunc);
- Nicool Plus Einfriergerät (Air Liquide).

Durchführung:

- Die Zellen werden trypsiniert und in 10 ml FCS-haltigem Medium aufgenommen.
- Die Zellsuspension wird für 2 min mit 200 ×g zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Das Zellsediment wird in 2 ml (Zellen aus einer 260 ml-Kulturflasche) oder 4 ml (Zellen aus einer 800 ml-Kulturflasche) Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml in Cryoröhrchen überführt. Ein Cryoröhrchen wird nur mit 1 ml Einfriermedium befüllt; es dient beim Einfrieren als Referenzröhrchen.
- Die Cryoröhrchen werden in die Kühlkammer des Einfriergeräts überführt. Der Referenz-Temperaturfühler wird in das Medium des Referenzröhrchens getaucht, die Kühlkammer geschlossen und das Einfrierprogramm gestartet. Alle verwendeten Zellinien werden mit demselben Programm, das sich aus den in Tabelle 2.6 dargestellten Schritten zusammensetzt, eingefroren.
- Die eingefrorenen Kulturen werden möglichst rasch in den Stickstofftank überführt.

2.3.2.5 Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer

Materialien:

- 0,4 % (w/v) Trypanblau (Sigma);
- Hämocytometer nach Neubauer.

Tabelle 2.6: Ablauf des Programms zur Cryokonservierung von Zellen

Programmschritt	*Parameter*
Äquilibrieren:	Kammertemperatur und Medium im Referenzröhrchen werden auf 20 °C äquilibriert.
Abkühlen:	Die einzufrierenden Zellen werden mit 2,8 °C/min auf 0 °C abgekühlt.
Stickstoffpuls:	Es wird schlagartig soviel Stickstoff in die Kammer geleitet, daß die Kammer in möglichst kurzer Zeit auf -50 °C abkühlt.
Abkühlen (optional):	Erreicht die Temperatur des Mediums im Referenzröhrchen nach dem Stickstoffpuls nicht -30 °C, so wird mit 5 °C/min gekühlt, bis diese Temperatur erreicht ist.
Äquilibrieren:	Die Temperatur wird für 60 sec auf -30 °C gehalten.
Einfrieren:	Mit einer Rate von 4 °C/min wird bis auf -150 °C abgekühlt.

Durchführung:

- Die Zellen werden trypsiniert und in 10 ml DMEM + 10 % FCS aufgenommen.
- 90 µl Trypanblau werden mit 10 µl der Zellsuspension versetzt, gut gemischt und für 5–15 min inkubiert. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während durch die nicht mehr intakte Plasmamembran toter Zellen der Farbstoff eindringen kann. Die Färbung sollte nicht zu lange durchgeführt werden, da sonst auch lebende Zellen beginnen, den Farbstoff aufzunehmen.
- Auf das Hämocytometer wird ein Deckgläschen aufgelegt und die beiden Kammern mit dem Farbstoff-Zellgemisch befüllt. Die vier Eckquadrate jeder Kammer werden unter dem Mikroskop (Olympus IMT-2) ausgezählt. Lebende Zellen erscheinen weiß auf blauem Hintergrund.
- Bestimmung der Zellzahl: Ein Eckquadrat einer Kammer entspricht bei aufgelegtem Deckgläschen 10^{-4}cm^3. Da die Zellsuspension 1 : 10 in Trypanblau verdünnt wird, ergibt sich somit die Zellzahl/ml nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl}/\text{ml} = \text{Durchschnittliche Zellzahl pro Eckquadarat} \times 10^4 \times 10$$

2.3.2.6 Zellfixierung und Färbung

Zur Auszählung von Zellkolonien nach G418-Selektion wird eine Färbemethode benötigt, die bis zum Zeitpunkt der Fixierung lebende Zellen dauerhaft und kontrastreich anfärbt. Ein geeignetes Verfahren für diese Anwendung ist die Kristallviolett-Färbung, die den Vorteil kurzer Fixierungs- und Färbezeiten hat. Weiterhin sind Kristallviolettlösungen über lange Zeit stabil und müssen daher nicht (wie viele andere Färbelösungen) vor Gebrauch frisch angesetzt werden.

Materialien:

- Fixierlösung:
  TCA, 5 % (w/v). 25 g TCA werden in bidest. Wasser gelöst und auf 500 ml aufgefüllt.
- Kristallviolett-Stammlösung, 10×:
  3 % Kristallviolett in Ethanol, 40 % (w/v). 200 g Ethanol werden mit bidest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt und 15 g Kristallviolett (Fluka) in diesem Gemisch gelöst.
- Kristallviolett-Färbelösung:
  0,3 % Kristallviolett in Ethanol, 4 %. 50 ml Stammlösung werden mit bidest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Die Färbelösung ist bei Raumtemperatur stabil.

Durchführung:

- Nachdem das Medium entfernt wurde, werden die zu färbenden Zellen mit 5 ml PBS pro 6 cm-Kulturschale gewaschen.
- Die gewaschenen Zellen werden mit 3 ml TCA, 5 % pro 6 cm-Kulturschale für 15 min fixiert.
- Die Fixierlösung wird entfernt und die fixierten Zellen werden mit 3 ml Leitungswasser pro 6 cm-Kulturschale gewaschen.
- Die Färbung erfolgt für 15 min mit 3 ml Färbelösung pro 6 cm-Kulturschale.
- Die Färbelösung wird abgenommen und die Kulturschalen mit Leitungswasser gewaschen, bis aller überschüssiger Farbstoff entfernt ist.
- Abschließend werden die Kulturschalen bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.3 Transfektion

Zum Einbringen von Fremd-DNA in Säugerzellen, die in Zellkultur gehalten werden, existieren unterschiedliche Methoden. Die *Calcium-Phosphat vermittelte Transfektion* (Wigler et al., 1979) stellt eine einfache und effiziente Methode dar, bei der bis zu 20 % (in Einzelfällen mehr als 50 %) der Zellen einer Kultur Fremd-DNA aufnehmen. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme ist nicht geklärt, erfolgt aber vermutlich durch Endocytose, der der Transport der DNA zum Zellkern folgt. Bei der *Lipofektion* werden DNA-Liposomen-Gemische („Lipoplexe") eingesetzt, wobei zumeist eine Mischung aus polykationischen Lipiden (zur Bindung der DNA) und neutralen Lipiden (für die Membranfusion) verwendet wird. Mit Hilfe von Lipofektionen lassen sich - im Vergleich zur Calcium-Phosphat vermittelten Transfektion - höhere Effizienzen erzielen. Allerdings ist eine Anpassung des Lipidgemischs an den zu transfizierenden Zelltyp notwendig: zum einen sind bei gegebener Lipidzusammensetzung die Transfektionseffizienzen sehr stark Zelltyp-abhängig, zum anderen können – ebenfalls Zelltyp-abhängig – cytotoxische Wirkungen bei der Lipofektion auftreten.

2.3.3.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Materialien:

- 2,5 M $CaCl_2$:
  10,8 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ werden in 20 ml bidest. Wasser gelöst und sterilfiltriert. Die Lösung wird aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

- HBS, 2×:
  8 g = 280 mM NaCl,
  5 g = 50 mM HEPES,
  1 g = 1 mM Glucose,
  0,38 g = 10 mM KCl,
  0,19 g = 1,5 mM Na_2HPO_4.
  Alle Komponenten werden in 480 ml sterilem bidest. Wasser gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 7,12 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt. Die Lösung wird sterilfiltriert und in 10 ml-Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Durchführung:

- Einen Tag vor Transfektion werden die zu transfizierenden Zellen trypsiniert, im Hämocytometer ausgezählt und die gewünschte Zellzahl (in der Regel 5×10^5 Zellen) in 6 cm-Kulturschalen ausgesät, mit 5 ml Medium versetzt und für 24 h bei 36,5 °C inkubiert.

- Ca. 3 h vor Transfektion wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS pro Kulturschale gewaschen und frisches Medium zugegeben.

- Die Plasmid-Lösung wird mit sterilem bidest. Wasser auf 225 µl aufgefüllt und mit 25 µl $CaCl_2$, 2,5 M versetzt.

- HBS, 2× wird tropfenweise zur Plasmid-Lösung gegeben und das Gemisch für 25 min bei Raumtemperatur zur Präzipitatbildung inkubiert.

- Je 500 µl Präzipitat werden pro Kulturschale auf die Zellen gegeben und diese für 24 h bei 37 °C inkubiert.

2.3.3.2 Lipofektion

2.3.3.2.1 Transfektion mit Lipofectamine

Materialien:

- Lipofectamine (Life Technologies): 3:1 (w/w) Liposomen-Formulierung in sterilem Wasser aus dem polykationischen Lipid 2,3-Dioleyloxy-N-[2(spermin-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium-trifluor-acetat (DOSPA) und dem neutralen Lipid Dioleyl-phosphatidyl-ethanolamin (DOPE);

- DMEM;

- DMEM + 10 % bzw. 20 % FCS.

Durchführung:
Die folgende Arbeitsvorschrift beschreibt exemplarisch[10] die Transfektion in 3,5 cm-Kulturschalen. Für Transfektionen in 6,0 cm-Kulturschalen wird jeweils das Doppelte der angegebenen Mengen verwendet.

[10]Die angegebenen Bedingungen beziehen sich auf die Transfektion von NIH 3T3-Fibroblasten sowie von retroviralen Verpackungszellinien auf Mäusefibroblasten-Basis.

- Einen Tag vor Transfektion werden die zu transfizierenden Zellen trypsiniert, im Hämocytometer ausgezählt und die gewünschte Zellzahl ($2–3 \times 10^5$) in 3,5 mm-Kulturschalen ausgesät, mit 2 ml Medium versetzt und für 24 h bei 36,5 °C inkubiert.

- Je Transfektionsansatz werden 1,5 µg zu transfizierende DNA in 100 µl FCS-freiem DMEM sowie 15 µl Lipofectamine in 100 µl FCS-freiem DMEM verdünnt.

- Die Lösungen werden vereinigt, vorsichtig gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur zur Ausbildung der DNA-Liposomen-Komplexe inkubiert.

- Von den zu transfizierenden Zellen wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 2 ml FCS-freiem DMEM gewaschen.

- Die Transfektionslösung wird mit 0,8 ml FCS-freiem DMEM verdünnt und auf die zu transfizierenden Zellen gegeben.

- Die Zellen werden für 5 h bei 36,5 °C inkubiert, anschließend werden – ohne das Transfektionsgemisch zu entfernen – die Zellen mit 1 ml DMEM + 20 % FCS versetzt.

- 24 h nach Beginn der Transfektion wird das Transfektionsmedium durch 2 ml DMEM + 10 % FCS je Kulturschale ersetzt.

2.3.3.2.2 Transfektion mit Lipofectin

Materialien:

- Lipofectin (Life Technologies): 1:1 (w/w) Liposomen-Formulierung in sterilem Wasser aus dem polykationischen Lipid N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und dem neutralen Lipid Dioleyl-phosphatidylethanolamin (DOPE),

- DMEM;

- Opti-MEM (Life Technologies);

- DMEM + 10 % bzw. 20 % FCS.

Durchführung:
Die folgende Arbeitsvorschrift beschreibt exemplarisch[11] die Transfektion in 3,5 cm-Kulturschalen. Für Transfektionen in 6,0 cm-Kulturschalen wird jeweils das Doppelte der angegebenen Mengen verwendet.

- 48 h vor Transfektion werden 2×10^5 Zellen je Kulturschale ausgesät.
- Je Transfektionsansatz werden 1,5 µg zu transfizierende DNA in 100 µl Opti-MEM sowie 10 µl Lipofectin in 100 µl Opti-MEM verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Dann werden beide Lösungen vereinigt, vorsichtig gemischt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Von den zu transfizierenden Zellen wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 2 ml FCS-freiem DMEM gewaschen.
- Die Transfektionslösung wird mit 0,8 ml Opti-MEM verdünnt und auf die zu transfizierenden Zellen gegeben.
- Die Zellen werden für 8 h bei 36,5 °C inkubiert, anschließend werden – ohne das Transfektionsgemisch zu entfernen – die Zellen mit 1 ml DMEM + 20 % FCS versetzt.
- 24 h nach Beginn der Transfektion wird das Transfektionsmedium durch 2 ml DMEM + 10 % FCS je Kulturschale ersetzt.

2.3.4 Das Tet-Expressionssystem zur regulierbaren Gen-Expression

Für viele Anwendungen ist eine regulierbare Gen-Expression erwünscht: In allen Fällen, in denen die (abschaltbare) Expression toxischer Gene in stabil transfizierten Zellinien und/oder die Möglichkeit der quantitativen Regulation der Gen-Expession benötigt wird, kommen regulierbare Systeme zum Einsatz. Systeme, die auf eukaryontischen Regulationselementen basieren, sind in der Regel mit einer Reihe von Pro-

[11] Die angegebenen Bedingungen beziehen sich auf die Transfektion von 293-Zellen sowie von retroviralen Verpackungszellinien auf 293-Basis.

blemen behaftet: So ist die Induktion oftmals relativ unspezifisch und die Expressionsstärke kann nur schlecht reguliert werden. Weiterhin weisen fast alle dieser Systeme ein gewisses Maß an Expression auch im „abgeschalteten“ Zustand auf. Dagegen kommen bei Tet-Expressionssystemen (Gossen & Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) heterologe bakterielle Regulationselemente zum Einsatz, die in eukaryontischen Zellen ansonsten nicht existieren. Das System basiert auf zwei Regulationselementen, die vom Tetracyclin-Resistenz Operon des *E. coli* Tn10 Transposons abgeleitet sind: Dem Tet Repressor-Protein (TetR) und der Tet Operator-Sequenz (tetO), an die TetR bindet. Das zu exprimierende Gen wird in ein „Response“ Plasmid (z. B. pUHD10-3) stromabwärts eines CMV-Minimalpromotors (P_{minCMV}) kloniert, der mit einem Tet-responsiven Element ($7 \times$tetO) verknüpft ist. Mit Hilfe des zweiten Plasmids (dem „Regulator“, z. B. pUHD15-1[12]) wird ein Hybridprotein exprimiert, der Tet-gesteuerte Transkriptionsaktivator (tTA). Dieses Fusionsprotein besteht aus dem Wildtyp TetR und der VP16 Aktivierungsdomäne des *Herpes simplex* Virus. In Abwesenheit von Tetracyclin bindet das tTA Protein an das Tet-responsive Element und aktiviert damit die Transkription. Sobald Tetracyclin dem Kulturmedium zugesetzt wird, erfolgt die Abschaltung der Transkription in dosisabhängiger Weise, man spricht daher vom Tet-Off System. Mit Hilfe von vier Aminosäureaustauschen im Wildtyp TetR entsteht das „reverse“ TetR (rTetR, Bestandteil z. B. des Plasmids pUHG17-1[12]), das die Transkription in Anwesenheit von Doxycyclin[13] (einem Tetracyclin-Analogon) aktiviert, dies ist das Tet-On System. Beide Systeme ergeben eine stringente Kontrolle der An- und Abschaltung der Gen-Expression, eine dosisabhängige Regulierung der Induktion und eine starke Expression bei voller Induktion.

Eine vollständige Regulation (d. h. keine Expression im abgeschalteten Zustand, dosisabhängige Aktivierung und starke Expression bei voller Aktivierung) wird nur in einem vollstabilen System erreicht, d. h. die entsprechende Zellinie muß sowohl mit dem Regulator-Plasmid als auch dem Response-Plasmid stabil transfiziert sein. Dieses System wird in zwei Schritten erzeugt: Zunächst erfolgt die Etablierung einer Zellinie, die eine starke tTA bzw. rtTA Expression aufweist. Der Nachweis der tTA bzw. rtTA-Expressionsstärke kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. In der vor-

[12]pUHD15-1 und pUHG17-1 wurden freundlicherweise von J.-J. Hwang zur Verfügung gestellt.

[13]rTetR reagiert 100× empfindlicher auf Doxycyclin als auf Tetracyclin, während TetR auf beide Stoffe gleich gut anspricht. Für das Tet-On System sollte daher Doxycyclin vewendet werden, während man beim Tet-Off System Tetracyclin oder Doxycyclin einsetzen kann.

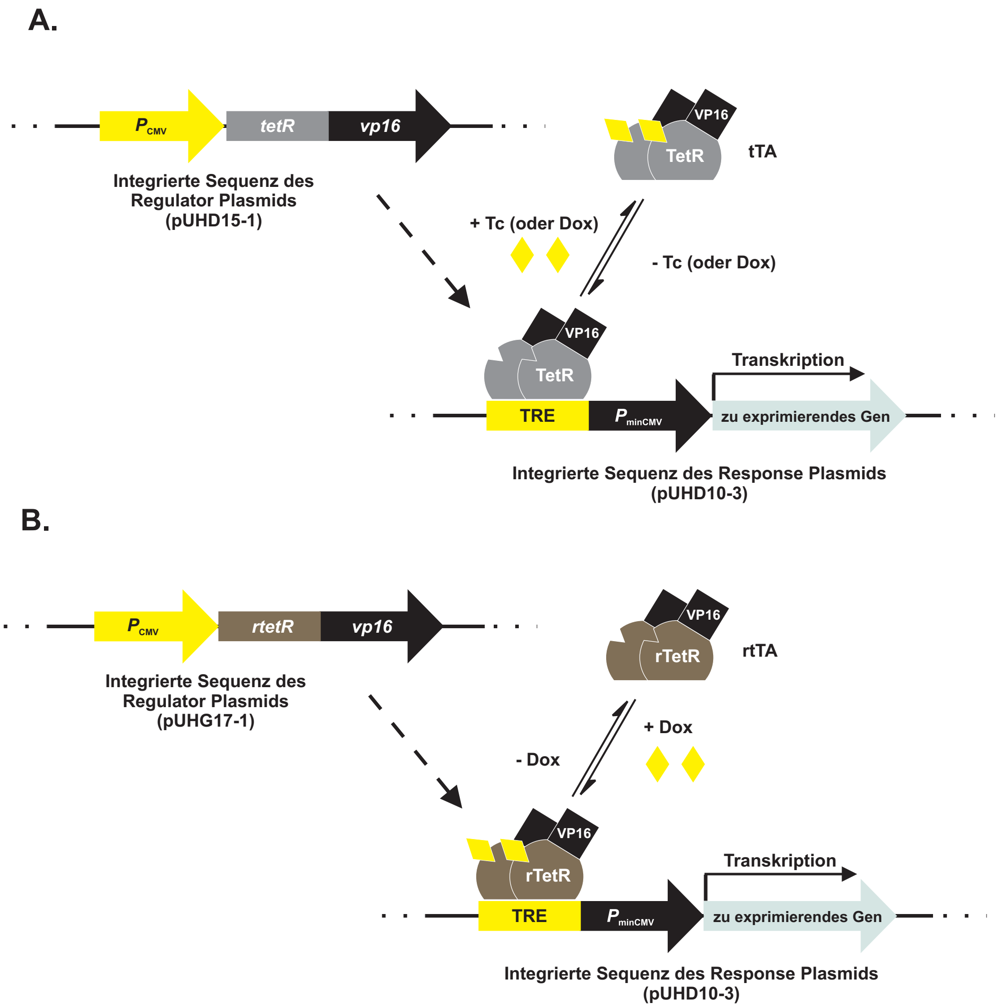

Abbildung 2.2: Funktionsschema des Tet-Off und des Tet-On Systems. **A. Tet-Off:** Der Tetracyclin-gesteuerte Transaktivator (tTA) ist ein Fusionsprotein, das aus dem Wildtyp Tet-Repressor (TetR) und der Herpes simplex VP16 Aktivierungsdomäne besteht. Mit Hilfe des Regulator-Plasmids pUHD15-1 erfolgt die tTA-Expression: In Abwesenheit von Tetracylin oder Doxycyclin (Tet bzw. Dox) bindet tTA an das Tet-responsive Element (TRE) und aktiviert somit die Transkription des Gens, das unter Kontrolle des Hybridpromotors aus TRE und dem CMV-Minimalpromotor (P_{minCMV}) steht. Diese Funktionseinheit befindet sich auf dem Response-Plasmid (pUHD10-3). Nach Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin wird die Expression abgeschaltet, da tTA, das Tetracyclin oder Doxycyclin gebunden hat, nicht mehr an TRE bindet. **B. Tet-On:** Vier Aminosäureaustausche kehren das Ansprechverhalten von TetR auf Doxycyclin um („reverses“ TetR, rTetR). Das Fusionsprotein aus rTetR und VP16 („reverser“ Tetracyclin-gesteuerter Transaktivator, rtTA) aktiviert die TRE/P_{minCMV} gesteuerte Expression in Anwesenheit von Dox, d. h. wenn rtTA Doxycyclin gebunden hat.

liegenden Arbeit wird hierzu das Gen der sezernierten Alkalischen Phosphatase als Reportergen eingesetzt (SEAP-Nachweis, Kirchhoff et al., 1995). Da SEAP sezerniert wird, erfolgt der Nachweis aus dem Zellkulturüberstand mittels Luminometrie. Hierbei werden die stabil transfizierten Klone transient mit dem Plasmid ptetO-SEAP transfiziert. ptetO-SEAP enthält das Gen der sezernierten Alkalischen Phosphatase unter der Kontrolle des Tetracyclin-responsiven TRE/P_{minCMV}-Hybridpromotors. Die SEAP-Expressionsstärke kann damit als Maß für die tTA- bzw. rtTA-Expression dienen. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle werden Überstände pCMV-SEAP- bzw. p0-SEAP-transfizierter Zellen im SEAP-Nachweis eingesetzt. Bei pCMV-SEAP erfolgt die SEAP-Expression unter der Kontrolle des starken, konstitutiven hCMV-IE-Promotors, p0-SEAP[14] enthält die SEAP cDNA ohne funktionellen Promotor. Regulierbare, expressionsstarke Klone werden dann mit dem Response-Plasmid, welches das zu exprimierende Gen enthält, sowie dem Plasmid pTK-Hyg (welches eine Selektion auf Hygromycin-Resistenz erlaubt; Clontech) stabil cotransfiziert. Aus dem Pool der somit dreifach stabil transfizierten Zellen wird der Klon ausgewählt, der das beste Regulationsverhalten zeigt.

Materialien:

- Phospha-Light Chemiluminescent Reporter Gene Assay zur Detektion sezernierter plazentaler Alkalischer Phosphatase (Tropix), bestehend aus:
  CSPD Chemilumineszenz Substrat,
  Phospha-Light Assay Puffer: enthält Inhibitoren gegen verschiedene Alkalische Phosphatasen,
  Phospha-Light Reaktionspuffer: enthält einen Lumineszenz-Verstärker.
  Verdünnungslösung (5×),
  Kontrollenzym (SEAP);
- Microlite ML2200 Mikrotiterplatten Luminometer (Dynatech);
- Mikrotestplatten (weiß) für die Luminometrie (Dynatech).

Durchführung:

- Alle Reagenzien werden vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht.

[14]ptetO-SEAP, pCMV-SEAP und p0-SEAP wurden freundlicherweise von J.-J. Hwang zur Verfügung gestellt.

- Die benötigte Menge Verdünnungspuffer wird durch Verdünnung des Konzentrats (5×) mit bidest. Wasser hergestellt.
- Das CSPD Substrat wird mit Reaktionspuffer verdünnt (Ein Teil Substratlösung auf neunzehn Teile Reaktionspuffer). Die Gebrauchslösung ist für mehrere Monate bei 4 °C stabil.
- 50 µl Zellkulturüberstand der zu untersuchenden Zellen werden mit 150 µl Verdünnungspuffer versetzt. Der verdünnte Zellkulturüberstand wird für 30 min bei 65 °C inkubiert.
- Zur Abkühlung auf Raumtemperatur wird der verdünnte Zellkulturüberstand kurz auf Eis gestellt.
- Je 100 µl werden in drei Kavitäten einer Luminometer-Mikrotiterplatte gegeben und mit je 100 µl Assay Puffer versetzt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Dann werden je 100 µl Reaktionspuffer zugegeben und das Gemisch wird für weitere 20–50 min bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Reaktion zeitabhängig ist, sollte der Reaktionspuffer im selben Zeitintervall zugegeben werden, das anschließend für eine Messung benötigt wird.
- Abschließend werden die Proben im Luminometer (Dynatech) vermessen.

2.4 Virologische Materialien und Methoden

2.4.1 Sendai Virus (SeV)

Sendai Virus (murines Parainfluenzavirus, Typ 1), das bei Mäusen Pneumonien hervorruft, gehört zur Gruppe der Paramyxoviren, die ein (–)-Strang-RNA-Genom besitzen. Der Aufbau des Genoms zeigt Ähnlichkeit mit dem des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV, ein Rhabdovirus), sowohl von der prinzipiellen Struktur als auch von der Homologie bestimmter Abschnitte her.

Im Gegensatz zu VSV besitzt SeV zwei Hüllproteine, HN und F. Das HN-Protein ist zuständig für die Bindung des Virus an die Zelloberfläche und besitzt weiterhin

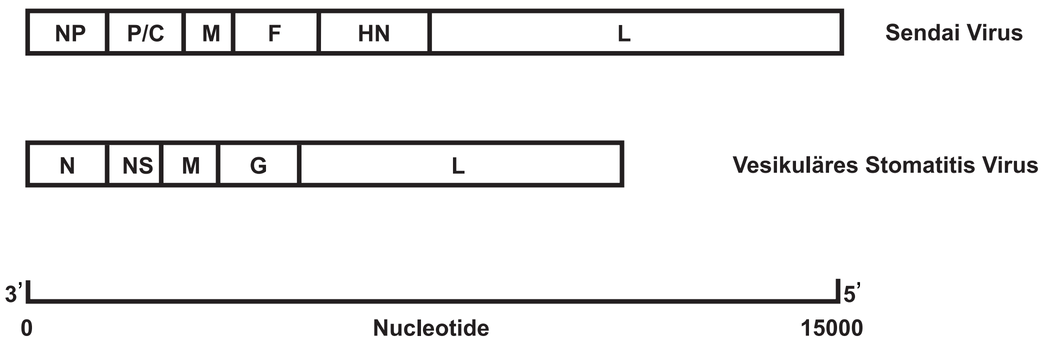

Abbildung 2.3: Schematischer Vergleich der Genome von SeV und VSV. Bedeutung der Abkürzungen: NP und N stehen für Nucleocapsidprotein; P für Phosphoprotein; C und NS für Nicht-Struktur-Protein, M für Matrixprotein, F für Fusionsglycoprotein, G für Glycoprotein, HN für Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein und L für Großes (Large) Protein (Polymerase-Komplex). C liegt innerhalb von P und besitzt einen eigenen Leserahmen. Innerhalb von NS findet sich ebenfalls ein weiterer offener Leserahmen. Abbildung nach Pringle & Heath (1990).

Hämagglutinations- und Neuraminidase-Aktivität. Das F-Protein ist notwendig für das Eindringen des Virus in die Zelle und muß hierzu durch Trypsin-Spaltung (bzw. durch Spaltung mit einem Enzym mit Trypsin-ähnlicher Spezifität) aktiviert werden, wodurch eine hydrophobe Sequenz des Proteins zugänglich wird. Für die Virus-Reifung ist die Spaltung nicht notwendig, komplette Virus-Partikel können auch nachträglich enzymatisch aktiviert werden. Da das HN-Protein an einen ubiquitären Rezeptor bindet (Sialinsäure-haltige Ganglioside), können aktivierte Wildtyp-Viren eine große Anzahl verschiedener Zelltypen infizieren. Eine wirksame Virus-Vermehrung ist aber abhängig vom Vorliegen einer Trypsin-ähnlichen Protease, da nur dann mehrere Vermehrungszyklen durchlaufen werden können.

2.4.1.1 Vermehrung von SeV in embryonierten Hühnereiern[15]

SeV läßt sich sehr gut an die Propagation in den Zellen der Chorion-Allantois-Membran von embryonierten Hühnereiern adaptieren (Mayr et al., 1974). Da die Allantoisflüssigkeit Trypsin-ähnliche Proteasen enthält, können zahlreiche Vermehrungszyklen stattfinden, die zu hohen Virus-Titern führen.

[15] Die Vermehrung von SeV wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. W. J. Neubert in der Abteilung Virusforschung (Prof. Hofschneider) am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Durchführung:

- Neun Tage bebrütete Hühnereier werden für 24 h bei 35 °C in einem belüfteten Brutschrank (*ohne* CO_2-Zufuhr) inkubiert.
- Am Morgen des Infektionstages werden unter der Schierlampe die Begrenzungen der Luftblase auf der Eischale, sowie die Injektionsstelle angezeichnet. Diese sollte möglichst nahe an der Grenze der Lufthöhle und möglichst nahe am Kopf des Embryos liegen. Unter der Schierlampe ist dieser gut als dunkler Fleck zu erkennen. Weiterhin ist darauf zu achten, daß die Injektionsstelle so liegt, daß bei der Injektion kein Blutgefäß getroffen wird. Nach dem Anzeichnen werden die Eier weiter bei 35 °C bebrütet.
- Von der Virus-Lösung wird eine Verdünnung hergestellt, die 1 KID_{50}[16]/100 µl enthält (Verdünnungen werden mit PBS durchgeführt).
- Die Eier werden gründlich mit Ethanol desinfiziert. Wenn das Ethanol verdunstet ist, wird die Eischale an der angezeichneten Injektionsstelle vorsichtig angeschliffen (Karborund-Vulkanscheibe).
- Auf eine 1 ml-Spritze wird eine $0,9 \times 40$ mm Injektionsnadel aufgesetzt und 400 µl der Infektionslösung aufgezogen.
- Man durchsticht die Eischale an der angeschliffenen Stelle, führt die Nadel soweit ein, daß der Schliff nicht mehr zu sehen ist und schiebt die Nadel nochmals um 2–3 mm nach. Dann injiziert man 100 µl Infektionslösung in die Allantoishöhle. Die Injektion muß langsam und ruckfrei erfolgen, da sonst Flüssigkeit an der Injektionsstelle austritt. Mit derselben Nadel und Spritze werden noch drei weitere Eier infiziert. Auf diese Weise wird die gewünschte Anzahl von Eiern infiziert.
- Die Injektionsstellen werden mit Klebeband steril abgedeckt und die Eier wieder zurück in den Brutschrank gestellt.
- Dann erfolgt die Nachbrut für 72 h bei 35 °C.
- Am Ende der Nachbrut werden die Eier über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, so daß die Embryonen absterben.

[16] 1 KID_{50} entspricht ca. 5000 pfu/ml.

- Vor dem Öffnen der Eischale am Luftsack wird gründlich mit Ethanol desinfiziert. Nachdem das Ethanol verdunstet ist, wird die Eischale entlang der Luftsackbegrenzung mit einer chirurgischen Pinzette entfernt.

- Mit der abgeflammten Pinzette durchstößt man vorsichtig die Haut des Luftsacks und die Allantoishülle. Dann wird die Spitze einer 10 ml-Pipette auf die geschlossenen Enden der Pinzette aufgesetzt, beide ca. 5 mm in die Allantoishöhle eingetaucht und die Allantoisflüssigkeit[17] abgesaugt. Dabei verbleibt die Pipettenspitze auf der Pinzette, um zu verhindern, daß Membranhäute oder andere festen Bestandteile die Pipette verstopfen. Ist die Allantoisflüssigkeit hämolytisch oder durch Eigelb getrübt, muß sie verworfen werden.

- Die vereinigten Allantoisflüssigkeiten werden abschließend für 5 min mit 3000 ×g zentrifugiert, um Membranreste, etc. abzutrennen.

- Die Allantoisflüssigkeit wird mittels HA-, HAD- und KID-Test (s. u.) auf ihre Infektiosität untersucht und charakterisiert. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C, aufgetaute Virus-Lösungen werden nicht wieder eingefroren, sondern bei 4 °C aufbewahrt, wobei die Infektiosität für 1–3 Wochen erhalten bleibt.

2.4.1.2 Vermehrung von SeV in Zellkultur

Bei der Infektion von Zellkulturen kann nur ein Vermehrungszyklus durchlaufen werden, da eine Trypsin-ähnliche Aktivität im Zellkulturmedium fehlt. Um einen infektiösen Zellkulturüberstand zu erhalten, muß dieser mit acetyliertem Trypsin aktiviert werden. Da dieses durch FCS vollständig inaktiviert wird, erfolgt die Infektion und Vermehrung in FCS-freiem Medium, das einen geeigneten Serum-Ersatz enthält.

Materialien:

- Nutridoma-Medium:
  DMEM mit L-Alanyl-Glutamin und Natrium-Pyruvat,
  Nutridoma SR (Boehringer Mannheim).
  Das gewünschte Volumen DMEM wird mit 1/100 Volumen Nutridoma SR versetzt.

[17] Nach 10 Tagen beträgt das Volumen der Allantoisflüssigkeit 4–6 ml, nach 13 Tagen ca. 13 ml. Dies ist deshalb die maximale Menge, die pro infiziertem Ei geerntet werden kann (Mayr et al., 1974)

Alternativ: Ultra Culture (Bio Whittaker). Ultra Culture ist ein Serum-freies Komplettmedium auf DMEM/F12 Basis.

- Acetyliertes Trypsin, 100× (0,1 mg/ml):
  Lyophylisiertes acetyliertes Trypsin (Sigma),
  FCS-freies DMEM.
  1 mg acetyliertes Trypsin-Lyophylisat werden in 10 ml FCS-freiem DMEM gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Durchführung:

- Einen Tag vor Infektion werden NIH 3T3-Zellen in 50 ml-Kulturflaschen ausgesät (1×10^6 Zellen pro Flasche).
- Nachdem das Medium abgenommen wurde, wird zwei- bis dreimal mit 5 ml PBS je Kulturflasche gewaschen, um alle FCS-Reste zu entfernen.
- Von der Virus-Lösung werden die gewünschten Verdünnungen mit Nutridoma-Medium angesetzt.
- Die Zellen werden mit 1 ml Virus-Lösung pro 50 ml-Kulturflasche infiziert und für eine Stunde bei 36,5 °C inkubiert (Flaschen verschließen).
- Es folgt die Zugabe von 4 ml Nutridoma-Medium.
- Dann erfolgt Inkubation für 24 h bei 36,5 °C (Flaschen wie normal belüften).
- Der Nachweis der erfolgreichen Infektion kann durch einen HAD-Test erfolgen. Eine erfolgreiche Infektion ist bei höheren Viruskonzentrationen bereits am auftretenden CPE (12- 24 h nach Infektion) erkennbar.
- Der Zellkulturüberstand wird für 5 min mit 3000 ×g zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer abzutrennen.
- Der Überstand wird bei -80 °C gelagert oder zur Aktivierung mit 1/100 Volumen acetyliertem Trypsin versetzt und für 10 min bei 36,5 °C inkubiert.
- Der aktivierte Überstand kann nun zur Infektion weiterer Zellkulturen verwendet werden.

2.4.2 Virologische Tests zur Charakterisierung von SeV

Materialien:

- Alsevers Lösung:
  20,5 g Dextrose,
  8 g Natriumcitrat oder 8,48 g Natriumcitrat-Dihydrat,
  0,55 g Citronensäure,
  4,2 g NaCl
  werden in 1000 ml bidest. Wasser gelöst und sterilfiltriert. Die Lösung besitzt einen pH-Wert von 6,1.

- Erythrozyten-Suspension für HA-, HAD- und KID-Test:

  - Stammlösung:
    Es werden Humanerythrozyten der Blutgruppe 0 benötigt. Pro 7 ml Blut werden in der Spritze 3 ml Alsevers Lösung vorgelegt. Das gewonnene Blut wird für 5 min bei 800 ×g zentrifugiert und dreimal mit Alsevers Lösung gewaschen. Nach jedem Waschschritt wird der Zentrifugationsschritt wiederholt. Abschließend wird das Erythrozytensediment mit Alsevers Lösung aufgefüllt. Diese Suspension ist bei 4 °C für mindestens 14 Tage haltbar.

  - Gebrauchslösung:
    Die sedimentierten Erythrozyten werden im Alsevers Überstand resuspendiert und ein Aliquot der Suspension in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wird mit PBS versetzt und für 5 min bei 800 ×g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Sediment in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Falls der Überstand noch eine deutliche Rotfärbung aufweist, wird dieser Schritt wiederholt. Der Überstand wird abgenommen, ein Aliquot des Erythrozytensediments entnommen und eine 1 % Suspension in FCS-freiem Medium oder PBS hergestellt. Diese Suspension wird in den virologischen Tests eingesetzt. Die restlichen Erythrozyten werden wieder mit Alsevers Lösung überschichtet und bei 4 °C aufbewahrt.

- Mikrotiterplatten für die Zellkultur mit U-förmigen Kavitäten (Greiner).

2.4.2.1 Bestimmung der hämagglutinierenden Einheiten mittels HA-Test

Dieser Test macht keine Aussage über die Anzahl infektiöser SeV-Partikel, sondern nur über die Anzahl HN-tragender Partikel. Der Unterschied ist von Bedeutung, da bei der mehrfachen Passage von hohen SeV-Konzentrationen in Hühnereiern zunehmend sog. defektive interferierende Partikel(DI-Partikel) auftreten, die nicht mehr infektiös sind, in ihrer Hülle aber das HN-Protein tragen. Prinzip des Tests ist die Bindung des HN-Proteins an humane Erythrozyten der Blutgruppe 0 oder an Hühnererythrozyten. Durch schrittweise Verdünnung der Virus-Suspension in einer Mikrotiterplatte wird ein Endpunkt der Hämagglutination = HA-Titer erreicht.

Durchführung:

- In einer Mikrotiterplatte werden mit DMEM + 10 % FCS Verdünnungen der auszutestenden Virus-Lösung angelegt, wobei mit unverdünnter Virus-Lösung begonnen wird, die schrittweise um den Faktor 2 verdünnt wird (es werden 12 Verdünnungsstufen angelegt). Das Volumen an Virusverdünnung pro Kavität beträgt hierbei 25 µl.
- In jede Kavität werden nun 25 µl Erythrozyten-Suspension, 1 % zugegeben.
- Die Mikrotiterplatte wird für 1 h bei 4 °C inkubiert.
- Auswertung: Eine HA-Einheit ist die Virusverdünnung, bei der gerade noch vollständige Hämagglutination eintritt.

2.4.2.2 Quantitative Bestimmung infektiöser Virus-Partikel mittels KID_{50}-Test

In diesem Test werden NIH 3T3-Zellen mit steigenden Virusverdünnungen infiziert. Infizierte Zellen exprimieren das HN-Protein auf ihrer Oberfläche, das durch Hämadsorption von Erythrozyten an die Zellen nachgewiesen wird.

Durchführung:

- In einer Mikrotiterplatte werden mit DMEM + 10 % FCS Verdünnungen der auszutestenden Virus-Lösung angelegt, wobei mit unverdünnter Virus-Lösung begonnen wird, die schrittweise um den Faktor 2 verdünnt wird (es werden 24 Verdünnungsstufen angelegt). Das Volumen an Virusverdünnung pro Kavität beträgt hierbei 25 µl.

- Zu den Virusverdünnungen werden je 25 µl einer NIH 3T3-Zellsuspension zugegeben, die $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml enthält.
- Die Mikrotiterplatte wird für 24 h bei 36,5 °C inkubiert.
- In jede Kavität werden nun 25 µl Erythrozyten-Suspension, 1 % zugegeben.
- Die Mikrotiterplatte wird für 1–2 h bei 4 °C inkubiert.
- Auswertung: Eine KID ist die Virusverdünnung, bei der der virale Effekt (in diesem Fall die Hämagglutination) gerade noch erreicht wird. Der KID_{50}-Titer ist der reziproke Wert der gerade noch positiven Verdünnungsstufe und wird in KID/ml angegeben.

Der Test kann auch als qualitativer Nachweis mit infizierten Zellkulturen in Zellkulturflaschen durchgeführt werden und wird dann als Hämadsorptionstest (HAD-Test) bezeichnet:

- Hierzu wird das Medium 24 h nach Infektion abgenommen, die Zellen mit 5 ml PBS pro 260 ml-Kulturflasche gewaschen und anschließend mit 2 ml Erythrozyten-Suspension, 1 % versetzt und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Dann wird der Zellrasen drei- bis fünfmal mit je 5 ml PBS gewaschen und die Kulturen unter dem Mikroskop auf infizierte Zellen (= Zellen, bei denen Hämadsorption stattgefunden hat) untersucht.

2.4.3 Rekombinante Vaccinia Viren zur Gen-Expression

Vaccinia Virus (VV) – ein Mitglied der Familie *Poxviridae* – besitzt eine lineares, doppelsträngiges DNA-Genom von fast 200000 bp Länge. Das Genom enthält 198 ORFs, von denen 56 für die Virus-Replikation entbehrlich sind. Damit bestehen zahlreiche Möglichkeiten rekombinantes, replikationskompetentes Virus zu erzeugen (Moss, 1992). Am häufigsten wird hierbei vom VV*tk*-Gen Gebrauch gemacht, das mittels homologer Rekombination durch das interessierende Gen ersetzt wird. Durch den Wegfall des *tk*-Gens läßt sich rekombinantes Virus in tk^--Zellinien identifizieren, da dann keine Verstoffwechselung des toxischen Nucleosidanalgons 5-Bromdesoxyuridin (BrdU) mehr erfolgt, d. h. rekombinante VV sind – im Gegensatz zum Ausgangsvirus – BrdU-resistent.

2.4.3.1 Das pTM1-F/vTF7-3 Expressionssystem

Aufgrund ihrer hohen Transkriptionsaktivität, der Promotor-Spezifität, der hohen Prozessivität und der monomeren Struktur eignet sich T7-Polymerase sehr gut als Basis prokaryontischer Expressionssysteme. Mit Hilfe einiger Modifikationen kann T7-Polymerase auch für die Expression in eukaryontischen Zellen eingesetzt werden. Das in dieser Arbeit verwendete T7-Polymerase-gesteuerte eukaryontische Expressionssystem (Moss et al., 1990; Elroy-Stein & Moss, 1993) besteht aus folgenden Komponenten: Einem rekombinanten Vaccinia Virus, vTF7-3, das die T7-Polymerase unter Kontrolle eines Virus-eigenen Promotors (P7.5) anstelle des Virus-eigenen *tk*-Gens enthält, sowie einem Expressionsplasmid, pTM1, das das zu exprimierende Gen (in diesem Fall SeV-F cDNA, Gerner, 1995; siehe Abbildung 2.4) unter Kontrolle des T7 ϕ10-Promotors enthält.[18] Nach Infektion mit dem rekombinanten Virus kommt es zum Erliegen der zellulären Proteinsynthese, d. h. es werden fast ausschließlich virale Gene und damit auch die T7-Polymerase exprimiert. Damit steht viel Polymerase zur effizienten Transkription des durch nachfolgende Transfektion in die Zelle eingebrachten T7-Expressionsplasmids zur Verfügung. Da das durch die T7-Polymerase erzeugte Transkript keine Cap-Struktur besitzt, die für eine effiziente Translation notwendig ist, enthält das Expressionsplasmid die EMCV-UTR (eine „internal ribosomal entry site“, kurz IRES), die eine effektive Cap-unabhängige Translation ermöglicht. Sowohl die Virus-Replikation als auch die T7-Polymerase-gesteuerte Expression laufen vollständig im Cytoplasma – also ohne Beteiligung des Zellkerns – ab. Da die VV-Infektion zu einem starken CPE und damit zum Zelltod führt, ist eine dauerhafte Expression nicht möglich, was den Hauptnachteil dieses Systems darstellt.

Materialien:

- rekombinantes Vaccinia Virus vTF7-3 mit bekanntem Titer;
- DMEM ohne FCS;

[18] Das rekombinante Vaccinia Virus vTF7-3 sowie das SeV-F Expressionsplasmid pTM1-F wurden freundlicherweise von W. J. Neubert zur Verfügung gestellt.

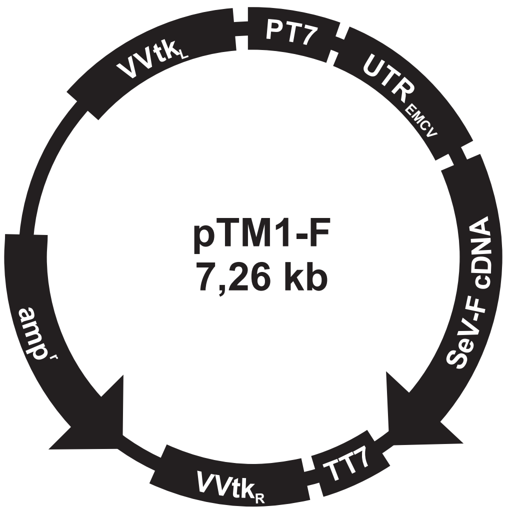

Abbildung 2.4: Aufbau des Plasmids pTM1-F. Die Expression der SeV-F cDNA erfolgt unter der Kontrolle des T7 ϕ10-Promotors (PT7). Der Transkriptionsstop erfolgt am T7 Transkriptionsterminator (TT7). Zur effizienten Cap-unabhängigen Translation ist zwischen Promotor und SeV-cDNA eine IRES (internal ribosomal entry site) zwischengeschaltet (UTR_{EMCV}). Die flankierenden VV*tk*-Sequenzen sind für die Expression ohne Bedeutung. Sie dienen zur Herstellung rekombinanter VV mittels homologer Rekombination.

- Materialien für die Lipofektion (siehe 2.3.3.2).

Durchführung:

- Einen Tag vor der Infektion/Transfektion werden die Zellen in der gewünschten Dichte in die Kavitäten einer 6 Well-Platte ausgesät.
- Vor der Infektion werden die Zellen zweimal mit 2 ml FCS-freiem Medium je Kavität gewaschen.
- Die vTF7-3 Stammlösung wird aufgetaut und gründlich gemischt. Entsteht hierbei keine homogene Suspension, wird die Viruslösung zusätzlich für 30 sec im Eis-/Wasserbad mit Ultraschall behandelt.
- Mit FCS-freiem Medium wird ein Aliquot der Virusstammlösung so verdünnt, daß mit 500 µl eine MOI von 5–10 je 6 Well-Kavität erreicht wird. Nicht benötigte Stammlösung kann ohne Verlust der Infektiosität wieder eingefroren und bei -20 °C bzw. -80 °C bis zum erneuten Gebrauch gelagert werden.
- Die Zielzellen werden für 1 h mit 500 µl Virusverdünnung je Kavität inkubiert.

- Die Viruslösung wird von den Zellen abgenommen und diese wiederum zweimal mit FCS-freiem Medium gewaschen.

- An die Infektion schließt sich eine Transfektion (siehe 2.3.3.2) an, wobei 1–1,5 µg Plasmid je Kavität eingesetzt werden.

2.4.3.2 SeV-F exprimierendes rekombinantes Vaccinia Virus[19]

Dieses rekombinante Vaccinia Virus (rVV-F) dient der effizienten Expression des SeV-F Proteins (Sakaguchi et al., 1993; Sanderson et al., 1994). Hierbei ist das viruseigene *tk*-Gen durch die SeV-F cDNA ersetzt, die unter der Kontrolle des Virus-eigenen Promotors P7.5 exprimiert wird. Zur Expression des Hüllproteins werden die in Frage kommenden Zielzellen mit rVV-F infiziert. Im Vergleich zu dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen System, bei dem eine Infektion und eine Transfektion durchgeführt werden müssen, führt hier bereits die Infektion zur Expression des interessierenden Gens.

2.4.3.3 Vermehrung rekombinanter Vaccinia Viren

Vaccinia Viren können zwar eine große Anzahl unterschiedlicher Zelltypen infizieren, die Replikation jedoch findet nicht in allen Zellen mit gleicher Effizienz statt. Zur Propagierung der in dieser Arbeit verwendeteten rekombinanten VV werden CV-1-Zellen eingesetzt, die sich neben HeLa S3 besonders zur Vermehrung von rekombinanten VV eignen (Earl et al., 1993).

Materialien:

- CV-1-Zellen;

- Stammlösung des rekombinanten Vaccinia Virus mit bekanntem Titer;

- MEM (Life Technologies) mit und ohne FCS;

- Trypsin/EDTA mit Phenolrot:
  Fertiglösung (Life Technologies), die 0,25 g/l Trypsin enthält und bei -20 °C gelagert wird. Einmal aufgetaute Gebrauchslösung wird bei 4 °C aufbewahrt.

[19] rVV-F wurde freundlicherweise sowohl von D. P. Nayak als auch T. Yoshida zur Verfügung gestellt.

Durchführung:

- In acht 750 ml Zellkulturflaschen werden CV-1-Zellen ausgesät.
- Wenn die Zellen 80 % Konfluenz erreicht haben, werden die Zellen mit Vaccinia Virus infiziert. Hierzu wird zunächst aus der Virus Stammlösung mit FCS-freiem MEM eine Verdünnung hergestellt, die 0,1 pfu Vaccinia Virus/ml enthält.
- Von den zu infizierenden Zellen wird das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit FCS-freiem MEM gewaschen. Anschließend werden je 8 ml der Virusverdünnung auf den Zellrasen einer Kulturflasche gegeben.
- Zur Infektion werden die mit dem Virusmedium überschichteten Zellen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Virusmedium durch MEM + 10 % FCS ersetzt.
- Die infizierten Zellen werden für 48 h bei 37 °C inkubiert.
- Dann wird der Mediumüberstand in 50 ml Falcon-Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellen werden mit 3 ml Trypsin-Lösung je Kulturflasche überschichtet und für 10 min bei 37 °C inkubiert.
- Die abgelösten Zellen werden mit dem bereits abgenommenen Überstand vereinigt und für 10 min mit 1000 ×g bei 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand wird bis auf einen Rest von ca. 1 ml abgenommen und das Zellsediment darin resuspendiert. Die Zellsuspension wird in Cryoröhrchen überführt und drei Frier/Tau-Zyklen im Ethanol/Trockeneisbad bzw. im 37 °C Wasserbad unterworfen.
- Zur Lagerung wird die Suspension bei -20 °C bzw. zur langfristigen Lagerung bei -80 °C eingefroren.

2.4.4 Die Generierung rekombinanter Retroviren

Bei Gentransfer-Systemen auf retroviraler Basis muß gewährleistet sein, daß das rekombinante Retrovirus, welches als Genfähre dient, völlig frei von replikationskompetentem Wildtyp-Virus ist (Valerio, 1992). Um diesem Sicherheitsaspekt gerecht zu werden, macht man sich die Tatsache zunutze, daß bei der Bildung vollständiger retroviraler Partikel die zu verpackende retrovirale RNA ein *trans*-Element sein kann. Geeignete Zellinien (sog. Verpackungszellinien) sind in der Lage, alle retroviralen Proteine zu synthetisieren, sie können aber keine verpackungsfähige retrovirale Wildtyp-RNA bilden. Grund hierfür ist eine Deletion im Verpackungssignal des Retrovirus-Genoms, das stabil im Genom der Verpackungszellinie integriert ist. Die Verpackungszellinie wird nun mit einem Plasmid transfiziert, das auf cDNA-Ebene die Information für eine verpackungsfähige RNA besitzt, die jedoch keine Information mehr für virale Proteine trägt. Statt dessen enthält sie ein Fremdgen, z. B. für einen Selektionsmarker (am häufigsten neo^r, das für die Aminoglycosid-Phosphotransferase codiert und G418-Resistenz verleiht), das unter der Kontrolle eines starken Promotors steht. Nach Transfektion wird die cDNA in RNA umgeschrieben, so daß nun vollständige retrovirale Partikel gebildet werden, die „infektiös“ aber replikationsdefizient sind. Mit diesen rekombinanten Retroviren können nun geeignete Zielzellen transduziert werden, wobei der Erfolg der Transduktion über die Expression des Selektionsmarkers kontrolliert werden kann (z. B. durch Selektion der transduzierten Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum, wenn es sich bei dem Selektionsmarker um ein Resistenzgen handelt). Als Verpackungszellinien werden in den hier beschriebenen Experimenten die Zellinien PE501, PA317 (Miller & Buttimore, 1986; Miller et al., 1993) sowie Phoenix-Eco und Phoenix-Ampho (Achacoso et al., 1996) eingesetzt. Als retroviraler Vektor werden pLXSN (Miller & Rosman, 1989) und davon abgeleitete Konstrukte sowie pLZ12 (Gallileo et al., 1990) eingesetzt.

2.4.4.1 Der retrovirale Vektor pLXSN

Das Plasmid pLXSN (Miller & Rosman, 1989) enthält in DNA-Form retrovirale Sequenzen, die keine Information für virale Proteine mehr enthalten, jedoch als Träger für ein zu transferierendes Gen dienen können. Diese Sequenzen sind im einzelnen:

- ein 5’ Hybrid-LTR, der sich aus LTR-Sequenzen des Moloney murine sarcoma virus (MoMSV) und des MoMLV zusammensetzt.
- ein Verpackungssignal ψ, das die Verpackung des Transkripts in ein Retrovirus-Partikel ermöglicht.

- eine Polycloning-site mit singulären Schnittstellen zum Einfügen des zu transferierenden Gens.
- ein Neomycin-Resistenzgen (Aminoglycosid-Phosphotransferase des Transposons TN 5), das unter der Kontrolle eines SV40-Promotors exprimiert wird und als Selektionsmarker dient.
- der 3' LTR des MoMLV.

Diese Sequenzen sind mit einem 2,5 kb-Fragment des Plasmids pBR322 verknüpft, das einen *ori* sowie das *amp*^{r}-Gen enthält. Damit ist eine selektive Vermehrung in bzw. Gewinnung aus *E. coli* möglich.

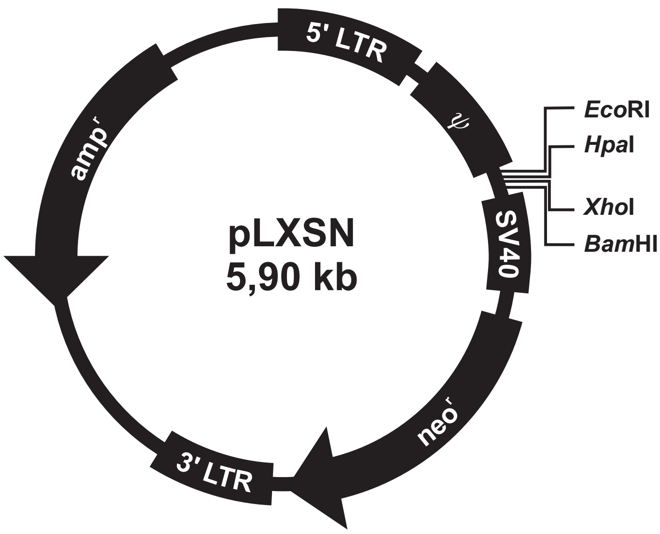

Abbildung 2.5: Schema des retroviralen Vektors pLXSN. Die einzelnen Elemente sind im Text erläutert.

2.4.4.2 Der retrovirale Vektor pLZ12

Bei dem Vektor pLZ12 (Gallileo et al., 1990) handelt es sich um einen retroviralen Vektor, der für zwei Reportergene codiert. Neben dem bereits erwähnten *neo*^{r}-Resistenzgen enthält der Vektor noch das Gen der β-Galactosidase aus *E. coli*, verknüpft mit der Kernlokalisationssequenz des großen SV40 T-Antigens (*nls-lacZ*). Damit bestehen zwei Möglichkeiten, die Transduktion von Zielzellen mit rekombinanten Retroviren nachzuweisen: zum einen mittels Selektion auf Neomycin-Resistenz (siehe 2.4.4.7.1), zum anderen durch histochemischen Nachweis der β-Galactosidase Expression (siehe 2.4.4.7.2). Im einzelnen ist der Vektor aus folgenden Komponenten aufgebaut:

- einem 5' Hybrid-LTR, der sich aus LTR-Sequenzen des MoMSV und des MoMLV zusammensetzt.
- einem Verpackungssignal ψ, das die Verpackung des Transkripts in ein Retrovirus-Partikel ermöglicht.
- einem Neomycin-Resistenzgen (Aminoglycosid-Phosphotransferase des Transposons TN 5), das unter der Kontrolle des 5' LTRs exprimiert wird und als Selektionsmarker dient.
- dem Gen der β-Galactosidase aus *E. coli*, verknüpft mit der Kernlokalisationssequenz des großen SV40 T-Antigens (*nls-lacZ*). Die Expression erfolgt unter der Kontrolle eines trunkierten *Rous Sarcoma Virus*-Promotors (ΔRSV).
- dem 3' LTR des MoMLV.

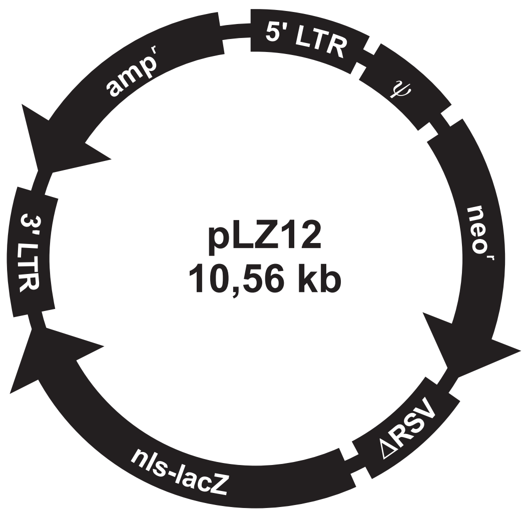

Abbildung 2.6: Schema des retroviralen Vektors pLZ12. Die einzelnen Elemente sind im Text erläutert.

2.4.4.3 PE501 und PA317: Verpackungszellen der zweiten Generation

Die ersten Verpackungszellinien besaßen in der retroviralen DNA lediglich eine Deletion des Verpackungssignals (Mann et al., 1983; Cone & Mulligan, 1984; Miller et al., 1985). Die Entstehung von replikationskompetentem Helfer-Virus durch homologe Rekombination mit dem transfizierten Vektor war deshalb ein relativ häufiges Ereignis (nur ein Rekombinationsereignis ist notwendig). Daher wurde bei sog. Verpackungszellen der zweiten Generation wie z. B. PE501 und PA317 (Miller & Buttimore, 1986) die retrovirale DNA noch an weiteren Stellen verändert, um die Wahrscheinlichkeit herabzusetzen, daß durch homologe Rekombination replikationsfähiges Helfer-Virus entstehen kann. Abbildung 2.7 zeigt die wesentlichen Merkmale der viralen Sequenzen von PE501 bzw. PA317 und pLXSN.

2.4.4.4 Phoenix-Eco und Phoenix-Ampho: Verpackungszellen der dritten Generation

Phoenix Zellen (Achacoso et al., 1996) sind sowohl in Bezug auf die Sicherheit als auch auf die erreichbaren Virus-Titer den oben beschriebenen Verpackungszellinien PE501 und PA317 überlegen. So befinden sich die retroviralen Gene nicht mehr auf einem einzigen Konstrukt, sondern die Expression von *gag* und *pol* einerseits und *env* andererseits erfolgt separat („split packaging function", eingeführt durch Markowitz et al., 1988). Der 5' LTR wurde vollständig durch einen RSV-Promotor (*gag-pol*-Konstrukt) bzw. CMV-Promotor (*env*-Konstrukt) ersetzt (siehe Abbildung 2.8). In Abbildung 2.8 sind die wesentlichen Merkmale der Phoenix Verpackungszellinien dargestellt. Weiterhin lassen sich Phoenix-Zellen, die von 293-Zellen abgeleitet sind, sehr viel besser transfizieren als die von Mäusefibroblasten abgeleiteten Linien PE501 und PA317, wodurch sich entsprechend höhere Virus-Titer erzielen lassen.

2.4.4.5 Die Generierung transienter Retrovirus-Produzentenzellen

Materialien:

- Materialien für die Transfektion: siehe 2.3.3;
- Sterilfilter mit Durapore Membran (Millipore), 0,45 µm Porenweite.

Durchführung:

- Einen Tag vor Transfektion werden PE501- oder PA317-Zellen in 6 cm-Kulturschalen ausgesät (5×10^5 Zellen pro Schale). Phoenix-Eco oder Ampho Zellen werden zwei Tage vor Transfektion ausgesät (3×10^5 Zellen pro Schale).

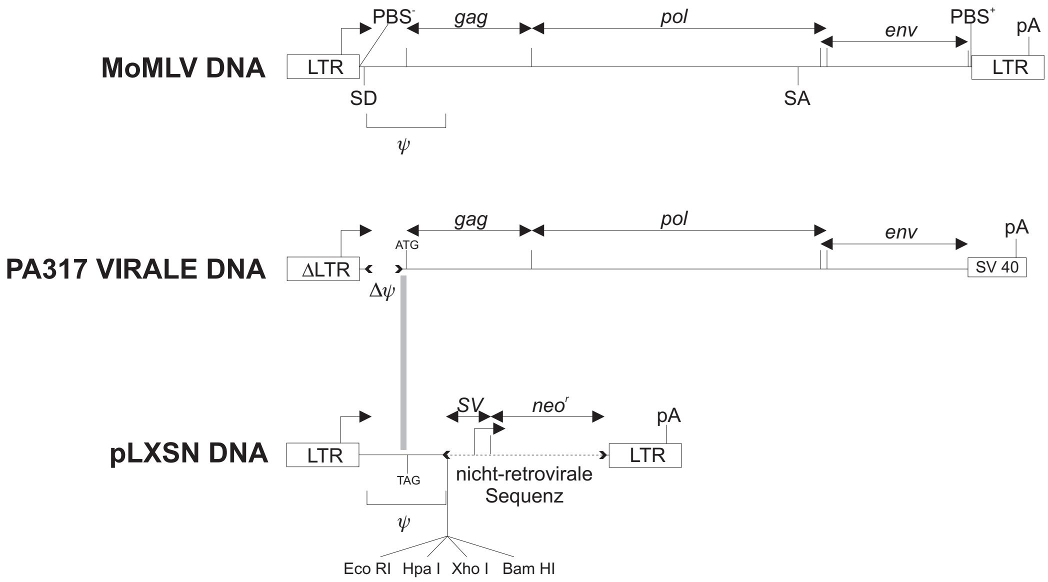

Abbildung 2.7: Vergleich der retroviralen Sequenzen von PE501/PA317 und pLXSN. Ganz oben ist die cDNA-Sequenz des replikationskompetenten Wildtyp-MoMLV gezeigt. In PA317 ist die *env*-Region und ein Teil der *pol*-Region durch die des amphotropen Virus 4070A ersetzt. Durch Ersatz des 3' LTR durch die SV40 polyA-Region und die teilweise Deletion des 5' LTR werden die Sequenzhomologien zu pLXSN auf ein Minimum begrenzt. Das schraffierte Rechteck symbolisiert die homologe 59 bp-Region der viralen DNA in PA317 und pLXSN. Durch homologe Rekombination könnte hier die funktionelle 5'-retrovirale Sequenz von pLXSN mit der defizienten Helfer-Virus DNA in PA317 verknüpft werden. Ein zusätzlicher homologer Bereich existiert am 3'-Ende von ψ. Diese Überlappung kommt dadurch zustande, daß die Verpackungssequenz den 5'-terminalen Teil von *gag* beinhaltet und nicht ohne Funktionsverlust deletiert werden kann. Am 3'-Ende der viralen DNA aus PA317 und pLXSN existieren keine homologen Abschnitte. Zur Entstehung von replikationskompetentem Helfer-Virus sind mindestens zwei unabhängige Rekombinationsereignisse notwendig (Wiederherstellung des Verpackungssignals, Ersatz der SV40 polyA-Region durch 3' LTR). Erläuterung der Abkürzungen: PBS+ und PBS- sind Primer-Bindungsstellen des Plus- bzw. Minus-Strangs; pA steht für Polyadenylierungssignal; LTR für die retroviralen Long Terminal Repeats von MoMLV, ΔLTR für einen LTR mit 5'-Deletion; SV für den SV40 early-Promotor; neo^r für das Gen der Aminoglycosid-Phosphotransferase, das Neomycin-Resistenz verleiht; ψ für das retrovirale Verpackungssignal, Δψ für das deletierte Verpackungssignal. Abbildung nach Miller & Rosman (1989).

- Die Verpackungszellinie wird mit der gewünschten Menge retroviralen Vektors (in der Regel 10 µg bzw. 3 µg pro 6 cm-Kulturschale für Calciumphosphat-Transfektion bzw. Lipofektion) transfiziert.
- 24 h nach der Transfektion wird das Medium erneuert.
- 48 h nach der Transfektion wird das Medium, das die rekombinanten Retrovi-

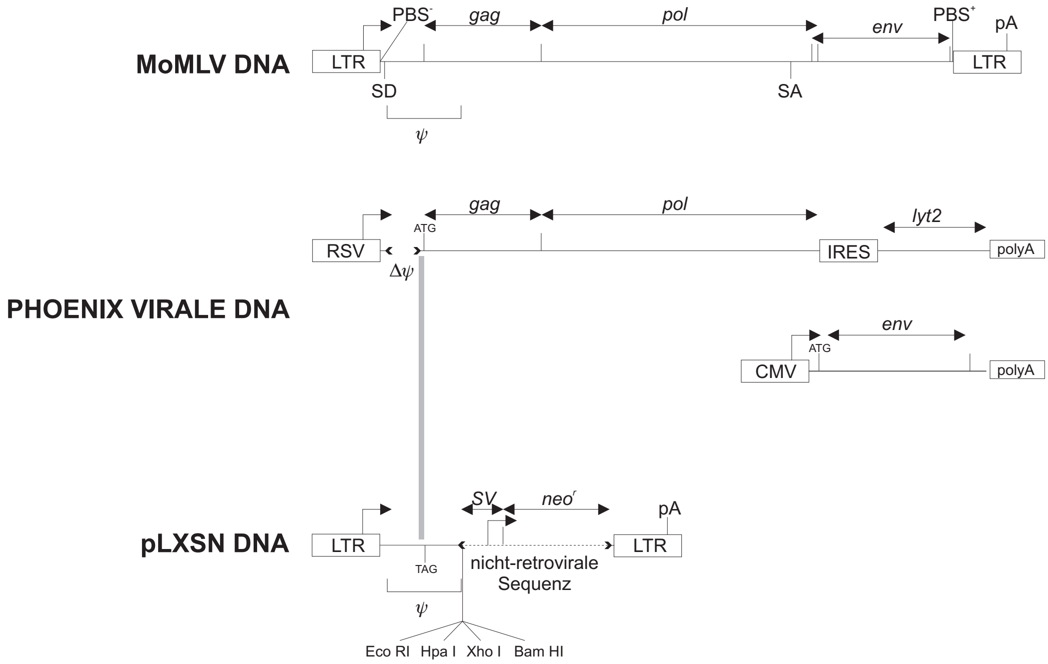

Abbildung 2.8: Vergleich der retroviralen Sequenzen von Phoenix-Eco bzw. Ampho und pLXSN. Ganz oben ist die cDNA-Sequenz des replikationskompetenten Wildtyp-MoMLV gezeigt. Im *gag-pol*-Expressionskonstrukt der Phoenix Zellen ist der 5' LTR vollständig durch einen RSV-Promotor ersetzt. Das *env*-Gen ist durch *lyt2* ersetzt, dem eine IRES vorgeschaltet ist. Somit erfolgt die *lyt2*-Expression ebenfalls unter RSV-Kontrolle und stellt ein indirektes Maß für die *gag-pol*-Expression dar (*lyt2* codiert für den CD8 Oberflächenmarker und erlaubt somit die Sortierung von *gag-pol* exprimierenden Phoenix-Zellen mittels FACS). Die *env*-Expression erfolgt unter CMV-Promotor Kontrolle unabhängig über ein zweites Expressionskonstrukt. Das schraffierte Rechteck symbolisiert die homologe 59 bp-Region der viralen DNA in Phoenix-Eco bzw. Ampho und pLXSN. Durch homologe Rekombination könnte hier die funktionelle 5'-retrovirale Sequenz von pLXSN mit dem defizienten *gag-pol*-Expressionskonstrukt verknüpft werden. Ein zusätzlicher homologer Bereich existiert am 3'-Ende von ψ. Diese Überlappung kommt dadurch zustande, daß die Verpackungssequenz den 5'-terminalen Teil von *gag* beinhaltet und nicht ohne Funktionsverlust deletiert werden kann. Am 3'-Ende der viralen DNA aus Phoenix Zellen und pLXSN existieren keine homologen Abschnitte. Zur Entstehung von replikationskompetentem Helfer-Virus sind mindestens drei unabhängige Rekombinationsereignisse notwendig (Wiederherstellung des Verpackungssignals, Wiederherstellung einer kompletten *gag-pol-env*-Sequenz, Ersatz der polyA-Region durch 3' LTR). Erläuterung der Abkürzungen: PBS^+ und PBS^- sind Primer-Bindungsstellen des Plus- bzw. Minus-Strangs; polyA steht für Polyadenylierungssignal; LTR für die retroviralen Long Terminal Repeats von MoMLV, RSV für den Rous Sarcoma Virus Promotor; SV für den $SV40_{early}$-Promotor; neo^r für das Gen der Aminoglycosid-Phosphotransferase, das Neomycin-Resistenz verleiht; ψ für das retrovirale Verpackungssignal, Δψ für das deletierte Verpackungssignal.

ren enthält, abgenommen und für 5 min mit 3000×g (Heraeus Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor) bei 4 °C zentrifugiert oder durch einen 0,45 µm Sterilfilter mit niedriger Proteinbindung (Millipore) filtriert (Abtrennen von u. U. in das Medium gelangten Zellen und Zelltrümmern).

- Die transfizierten Zellen werden entweder erneut mit frischem Medium überschichtet, um nochmals Virus-haltiges Medium zu gewinnen oder verworfen.
- Der retrovirale Überstand kann nun sofort zur Transduktion von Zielzellen verwendet (siehe 2.4.4.7) oder aber bei -80 °C gelagert werden.

2.4.4.6 Die Etablierung stabiler Retrovirus-Produzentenzellinien

Werden größere Mengen an rekombinantem Retrovirus benötigt, bietet sich die Etablierung einer stabilen Zellinie an, die dauerhaft das gewünschte Virus produziert. Um die Gefahr der Entstehung von replikationskompetentem Helfer-Virus möglichst gering zu halten und möglichst definierte Klone zu erzeugen, erfolgt dies nicht durch direkte Transfektion des retroviralen Vektors in Verpackungszellen und anschließende Selektion der transfizierten Verpackungszellen. Stattdessen wird zunächst mittels *Transfektion* eine transiente Retrovirusproduzenten-Kultur erzeugt, mit deren Überstand eine zweite Verpackungszellinie *transduziert* wird. Bei einer direkten Transfektion mit nachfolgender Selektion gelangen mehrere tausend Plasmide in jede transfizierte Zelle, so daß die Gefahr der homologen Rekombination ansteigt, wobei dann die entsprechenden Zellen sowohl rekombinantes, replikationsdefizientes Retrovirus als auch replikationskompetentes Helfer-Virus produzieren. Damit ist es nicht möglich, durch Selektion Helfer-Virus-produzierende Zellen zu eliminieren, da das in denselben Zellen ebenfalls vorhandene rekombinante Retrovirus-Genom für das entsprechende Resistenzgen codiert. Bei einer Transduktion mit Überstand einer transienten Retrovirusproduzenten-Kultur werden die Zellen in der Regel nicht mehr als einmal transduziert[20], so daß transduzierte Zellen nur ein rekombinantes retrovirales Genom enthalten. Zu beachten ist weiterhin, daß die transfizierte Verpackungszellinie nicht dasselbe *env*-Protein exprimiert wie die zu transduzierende, da sonst eine Transduktion

[20] Mit PA317 bzw. PE501/pLXSN lassen sich transiente Titer von max. 1×10^5 cfu/ml erzielen, mit Phoenix Zellen sind es max. 5×10^6 cfu/ml. Damit wird eine moi von höchstens 0,2 bzw. 10 bei der Transduktion von 5×10^5 Zellen erreicht.

nicht möglich ist (sog. Interferenzphänomen, Miller, 1996). Die Expression desselben *env*-Proteins blockiert eine Transduktion über den entsprechenden Rezeptor. Zur Generierung einer ecotropen Produzentenzellinie muß daher für die initiale Transfektion eine amphotrope Verpackungszellinie verwendet werden und umgekehrt.

Materialien:

- siehe 2.4.4.5, sowie;
- Polybrene-Medium:
  DMEM + 10 % FCS mit 4–8 µg/ml Polybrene (s. u.);
- Polybrene-Lösung, 100×:
  4–8 mg Polybrene (Hexadimethrin-Bromid, Fluka) werden in 10 ml PBS gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die aufgetaute Lösung wird bei 4 °C gelagert.
- G418-Stammlösung, 100 mg/ml:
  1 g G418 (Life Technologies) werden in 10 ml PBS gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Einmal aufgetaute Lösung wird bei 4 °C gelagert.
- Puromycin-Stammlösung, 1 mg/ml: 10 mg Puromycin (Fluka) werden in 10 ml PBS gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Einmal aufgetaute Lösung wird bei 4 °C gelagert.
- Cloning Cylinders (Sigma).

Durchführung:

- Zunächst wird in der unter 2.4.4.5 beschriebenen Weise durch transiente Transfektion Retrovirus-Überstand erzeugt.
- Einen Tag vor Transduktion werden die zu transduzierenden Verpackungszellen in 50 ml-Zellkulturflaschen oder 6 cm-Kulturschalen ausgesät (5×10^5 Zellen pro Flasche bzw. Kulturschale).
- Die Zellen werden mit dem gereinigten und Polybrene-haltigen retroviralen Überstand versetzt und für 2–12 h in virushaltigem Medium kultiviert.

- 24 h nach Transduktion werden die Zellen trypsiniert, 5 %, 10 %, 25 % und 60 % der Zellen jeweils in 10 cm-Kulturschalen ausgesät und mit je 10 ml G418- bzw. Puromycin-haltigem Medium versetzt.

- Alle 3–5 Tage wird das G418- bzw. Puromycin-Medium erneuert, um tote Zellen zu entfernen.

- Auswachsende Einzelklone werden mit Hilfe von Cloning Cylinders (Sigma) geerntet und in Selektionsmedium in die Kavitäten von 24 Well-Platten ausgesät.

- Sobald die Klone konfluent werden, wird der Überstand zur Transduktion von NIH 3T3-Zellen verwendet (s. u.), um den retroviralen Titer zu ermitteln.

- Klone, deren Überstände die höchsten Titer ergeben, werden expandiert und cryokonserviert, um einen Vorrat an Retrovirusproduzentenzellen anzulegen.

- Gegebenenfalls kann eine Subklonierung der ausgewählten Klone erfolgen, um sicherzustellen, daß man Produzentenzellen identischen Ursprungs erhält.

2.4.4.7 Bestimmung des retroviralen Titers

Die Bestimmung des retroviralen Titers erfolgt in Abhängigkeit des Markergens, das im retroviralen Vektor enthalten ist. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren enthalten zum einen die Antibiotika-Resistenzgene *neo*^{r} (Neomycin- bzw. G418-Resistenz) und *pac* (Puromycin-Acetyltransferase, d. h. Puromycin-Resistenz), zum anderen *nls-lacZ*, d. h. das Gen der *E. coli* β-Galactosidase, verknüpft mit der Kernlokalisationssequenz des großen SV40 T-Antigens. Um das Ausmaß der Bildung von rekombinanten Retroviren zu quantifizieren, werden NIH 3T3-Zellen als geeignete Zielzellen mit verschiedenen Verdünnungen des Zellkulturüberstands der (transienten oder stabilen) Retrovirusproduzentenzellen versetzt. Zellen, die erfolgreich transduziert werden, integrieren das Genom des rekombinanten Retrovirus und exprimieren dann das Markergen. Dient eine Antibiotika-Resistenz als Selektionsmarker (also *neo*^{r} oder *pac*), sind die Zellen in der Lage, in Medium, das G418 bzw. Puromycin enthält, zu proliferieren, während nicht transduzierte Zellen absterben. Erfolgt der Transduktionsnachweis mit Hilfe des *nls-lacZ*-Gens, so werden die transduzierten Zellen mit Hilfe einer histochemischen Färbemethode (X-Gal) sichtbar gemacht.

2.4.4.7.1 Titerbestimmung mittels Selektion auf Antibiotika-Resistenzen

Materialien:

- siehe 2.4.4.6.

Durchführung:

- Einen Tag vor Transduktion werden 3T3-Zellen in 50 ml-Zellkulturflaschen oder 6 cm-Kulturschalen ausgesät (5×10^5 Zellen pro Flasche bzw. Kulturschale).
- Die Zellen werden mit verschiedenen Verdünnungen des retroviralen Übestandes versetzt und für 24 h in Polybrene-Medium kultiviert.
- Die Zellen werden trypsiniert, 1/4–1/20 der Zellen in 6 cm-Kulturschalen ausgesät (Doppelbestimmung, pro Verdünnungsstufe zwei Schalen) und mit 5 ml G418- bzw. Puromycin-haltigem Medium versetzt.
- Alle 3–5 Tage wird das G418- bzw. Puromycin-Medium erneuert, um tote Zellen zu entfernen.
- Nach 12–14 Tagen bzw. 7–12 Tagen werden die Zellen fixiert und gefärbt und die Zahl der resistenten Kolonien ausgezählt.
- Berechnung des Virus-Titers:

  $$\text{Titer in cfu/ml} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Volumen des Virus-Mediums in ml}} \times K$$

  mit
  K = Kehrwert des ausgesäten Bruchteils der transduzierten Zellen
  Virus-Medium = Anteil des retroviralen Überstands in der Verdünnungsstufe.

2.4.4.7.2 Titerbestimmung mittels Nachweis der Expression von β-Galactosidase

Materialien:

- Paraformaldehyd-Lösung, 4 %:
  8 g Paraformaldehyd werden in 150 ml β-gal PBS (s. u.) gelöst (im Abzug) und

unter Rühren auf 60 °C erwärmt bis sich das gesamte Paraformaldehyd gelöst hat (die Lösung bleibt leicht getrübt). Abschließend wird mit PBS auf 200 ml aufgefüllt. Die Lösung ist bei 4 °C für ca. einen Monat stabil.

- Glutaraldehyd-Lösung, 25 %, (Sigma).

- β-gal PBS:
  150 mM NaCl,
  11 mM Na_2HPO_4,
  4 mM NaH_2PO_4,
  Die Lösung besitzt einen pH-Wert von ca. 7,3 (einstellen nicht erforderlich).

- Fixierlösung:
  Die Fixierlösung wird unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt, sterilfiltriert und setzt sich (bezogen auf 100 ml) zusammen aus:
  50 ml Paraformaldehyd-Lösung, 4 %,
  0,8 ml Glutaraldehyd-Lösung, 25 %,
  49,2 ml β-gal PBS.

- X-Gal-Stammlösung:
  400 mg X-Gal werden in 10 ml DMSO gelöst und lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt.

- $K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung, 50 mM:
  0,8236 g Kalium-Hexacyanoferrat-Eisen-(III) werden in 50 ml PBS gelöst. Die Lösung wird lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

- $K_4[Fe(CN)_6]$-Lösung, 50 mM:
  1,056 g Kalium-Hexacyanoferrat-Eisen-(II)·$3H_2O$ werden in 50 ml β-gal PBS gelöst. Die Lösung wird lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

- $MgCl_2$-Lösung, 1 M:
  1,017 g $MgCl_2$ werden in 5 ml bidest. Wasser gelöst.

- Färbelösung:
  Die Färbelösung wird direkt vor Gebrauch nach folgendem Schema hergestellt und sterilfiltriert:
  77,5 ml β-gal PBS,

10 ml $K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung,
10 ml $K_4[Fe(CN)_6]$-Lösung,
200 µl $MgCl_2$-Lösung,
2,5 ml X-Gal-Stammlösung (als letzte Komponente zugeben, da sonst ein schwerlöslicher Niederschlag entsteht).

Durchführung:

- 48 h nach Transduktion wird das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit β-gal PBS gewaschen.
- Pro 6 cm-Schale werden 5 ml Fixierlösung aufgegeben und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Danach werden die fixierten Zellen wiederum zweimal mit β-gal PBS gewaschen.
- Pro 6 cm-Schale werden 5 ml Färbelösung aufgegeben und bei 37 °C inkubiert, bis sich die Färbung voll entwickelt hat. Die notwendige Färbedauer kann zwischen 30 min und 12 h liegen. Die gefärbten Zellen können in der Färbelösung bei 4 °C aufbewahrt werden.
- Je nach Effizienz der Transduktion werden 10 % bis zur kompletten Fläche der Schale ausgezählt.
- Berechnung des Virus-Titers:

$$\text{Titer in ffu/ml} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Volumen des Virus-Mediums in ml}} \times K$$

mit
K = Kehrwert des ausgesäten Bruchteils der transduzierten Zellen
Virus-Medium = Anteil des retroviralen Überstands in der Verdünnungsstufe.

2.5 Proteinchemische Materialien und Methoden

2.5.1 Zellaufschluß

Zur Gewinnung des Gesamtproteins aus kultivierten, adhärenten Zellen werden diese mechanisch (also nicht enzymatisch, um eine Schädigung von Membran- und Matrixproteinen zu vermeiden) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Anschließend erfolgt zur Freisetzung der zellulären Proteine ein Zellaufschluß, wobei je nach interessierender Proteinfraktion und/oder experimenteller Methode verschiedene Lysepuffer zum Einsatz kommen. Im Gegensatz zur Isolierung von Proteinen aus Geweben oder Organen ist die Gefahr eines Proteasen-vermittelten Abbaus der freigesetzten Proteine sehr viel geringer, so daß dem Lysepuffer in der Regel keine Proteasehemmer zugesetzt werden müssen.

Materialien:

- RIPA-Puffer (Roux & Waldvogel, 1982):
  150 mM NaCl,
  10 mM Tris-HCl,
  1 % Natrium-Desoxycholat,
  1 % Triton X100,
  0,1 % SDS,
  pH 8,8.
  Dieser Aufschlußpuffer wurde ursprünglich für die Radio-Immunpräzipitation verwendet. In dieser Arbeit wird der Puffer zur Gewinnung von Proteinproben für Western Blotting Experimente verwendet.

- Lysepuffer für den hypotonen Zellaufschluß:
  25 mM Tris-HCl,
  0,5 mM EDTA,
  pH 7,0.
  Nach dem Resuspendieren der Zellen im Lysepuffer wird die Suspension vier Frier/Tau-Zyklen (20 sec Ethanol/Trockeneis, 20 sec 37 °C (Wasserbad) unterworfen.

- Lysepuffer zur Gewinnung von Membranproteinen:
  10 mM Tris-HCl,
  10 mM EDTA,
  0,2 % Triton X100,
  pH 7,6.

- Lysepuffer für die Immunpräzipitation:
  150 mM NaCl,
  50 mM Tris-HCl,
  2 mM PMSF,

1 % Nonidet P40,
pH 7,6.

Durchführung:

- Zunächst werden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschen- bzw. Schalenboden abgelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt.

- Nach Zentrifugation für 5 min mit 200 ×g bei 4 °C wird der Überstand abgenommen und verworfen, das Zellsediment in Lysepuffer aufgenommen (z. B. 500 µl für die Zellen einer 10 cm-Schale) und in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt.

- Um ein homogenes Lysat zu erhalten, wird die Suspension (unter Kühlung auf Eis oder Trockeneis) zehn- bis zwanzigmal durch eine $0,9 \times 70$ mm Kanüle aufgezogen. Zur Abtrennung von Zelltrümmern kann das Lysat für 10 min mit 15000 ×g bei 4 °C zentrifugiert werden. In diesem Fall wird nur der Überstand weiterverwendet.

- Die Lagerung der gewonnenen Lysate erfolgt bei -80 °C.

2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode (Bradford, 1976) basiert auf der Eigenschaft von Coomassie brilliant blue G250, daß es nach Bindung des Farbstoffs an Proteine zu einem (konzentrationsabhängigen) Farbumschlag von braun nach blau kommt. Die Bindung erfolgt hauptsächlich an basische (speziell Arginin) und aromatische Aminosäure-Reste. Zu beachten ist, daß zahlreiche Substanzen, insbesondere Detergentien, diesen Test stören können. Für die in den oben beschriebenen Lysepuffern enthaltenen Komponenten gelten die in Tabelle 2.7 aufgeführten Konzentrationsgrenzen. Um eine Störung des Tests zu vermeiden, müssen die Proben ggf. verdünnt oder vor der eigentlichen Proteinbestimmung mit TCA gefällt und in PBS resuspendiert werden.

Materialien:

- Bradford-Reagenz:
  100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 werden in 47,5 ml EtOH (100 %, unvergällt) gelöst. Dann werden 100 ml Phosphorsäure (85 %) zugegeben, und die

Tabelle 2.7: Mit der Proteinbestimmung nach Bradford interferierende Substanzen[a]

Komponente	*maximale Konzentration*
EDTA	2,5 mM
NaCl	125 mM
Natrium-Desoxycholat	0,0025 %
Nonidet P40	nicht bekannt
Tris-HCl	50 mM
Triton X100	0,0025 %

[a]Die Angaben stellen Endkonzentrationen (Konzentration im Gemisch aus Probe und Reagenz) dar und beziehen sich auf eine Mikrotiterplattenbestimmung bei der 10 µl Proteinprobe und 200 µl Bradford-Reagenz eingesetzt werden.

Lösung mit bidest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung ist bei 4 °C ca. ein Jahr haltbar.

- Proteinstandards:
  BSA in den Konzentrationen 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml und 0,25 mg/ml, gelöst in Detergentien-freiem Lysepuffer. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20 °C.

Durchführung:

- Von den interessierenden Zellysaten werden jeweils 10 µl einer 1:10, 1:5 und 1:2 Verdünnung hergestellt. Diese Verdünnungen bzw. je 10 µl der Standards werden mit je 400 µl Bradford-Reagenz versetzt. Je 200 µl werden für Doppelbestimmungen in die Kavitäten einer ELISA-Platte gegeben. Als Leerwert dient Detergentien-freier Lysepuffer (10 µl + 200 µl Bradford-Reagenz je Kavität).
- Die Platte wird im ELISA-Reader (Dynatech MR7000) bei 600 nm vermessen und ausgewertet (Berechnung der Eichgerade und Bestimmung der Probenkonzentrationen).

2.5.3 Immunpräzipitation

Zum Anreichern sehr kleiner Mengen an nachzuweisendem Protein eignet sich die Immunpräzipitation. Hierbei wird mit einem für das betreffende Protein spezifischen Antikörper, der mittels Protein A oder G an leicht zentrifugierbare Sepharose-Beads gekoppelt wird, das nachzuweisende Protein aus dem Zellysat gebunden und angereichert.

Materialien:

- ProteinG-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech);
- Lysepuffer für die Immunpräzipitation (siehe 2.5.1);
- Waschpuffer für die Immunpräzipitation:
  150 mM NaCl,
  20 mM HEPES,
  10 % Glycerol,
  0,1 % Nonidet P40;
- Antikörper zur Immunpräzipitation:
  Im Rahmen dieser Arbeit wird hierfür der monoklonale, gegen das SeV-F Glycoprotein gerichtete Antikörper mAk 48-F verwendet.

Durchführung:

- Herstellung des Zellysats:
  Ca. 2×10^7 Zellen werden in der unter 2.5.1 beschriebenen Weise in 500 µl Lysepuffer für die Immunpräzipitation aufgenommen, lysiert und zur Abtrennung von Zelltrümmern zentrifugiert.
- Vorbereitung der Protein-G-Sepharose Beads:
  Je Zellysat (ausgehend von ca. 1×10^7 Zellen) werden 27 µl ethanolische Protein-G-Sepharose Beads Suspension verwendet. Zur Entfernung des Ethanols werden die Beads kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 6000 ×g), der Überstand abgenommen und verworfen und die Beads in Waschpuffer resuspendiert. Der Vorgang wird wiederholt und die Beads im gleichen Volumen Waschpuffer resuspendiert (27 µl ethanolische Protein-G-Sepharose Beads Suspension enthalten 20 µl Beads, d. h. es wird in 20 µl Waschpuffer resuspendiert).
- Die Antikörper-Lösung (Hybridoma-Überstand) wird sterilfiltriert und 0,5 ml der filtrierten Lösung mit PBS auf 3 ml aufgefüllt. Anschließend werden die gewaschenen Protein-G-Sepharose Beads zur verdünnten Antikörper-Lösung gegeben und für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

- Die Protein-G-Sepharose Antikörper-Konjugate werden kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 6000 ×g), der Überstand abgenommen und verworfen und die Beads in Waschpuffer resuspendiert. Der Vorgang wird wiederholt und die Beads im gleichen Volumen Waschpuffer resuspendiert.
- Zellysat und Beads werden vereinigt und für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.
- Die Beads werden dreimal gewaschen und abschließend in 60 µl Probenpuffer, 2× resuspendiert.

2.5.4 Deglycosylierung von Glycoproteinen

Die Detektion von Proteinen mittels Western Blotting kann dadurch erschwert sein, daß das zu detektierende Protein nicht einheitlich vorliegt, sondern unterschiedliche Glycosylierungsmuster aufweist. Damit ergeben sich unterschiedliche Molekulargewichte, folglich entsteht bei der elektrophoretischen Auftrennung keine einheitliche Bande, sondern ein meist unscharfes Bandenmuster, was zu einem unscharfen und meist schwachen Signal bei der Western Blot Detektion führt. Um eine Bande einheitlicher Größe zu erhalten, können die Proben vor der elektrophoretischen Auftrennung vollständig deglycosyliert werden. Dies geschieht mit Hilfe der Peptidase: N-Glycosidase F (PNGase F), die die Bindung zwischen dem innersten N-Acetyl-Glucosamin der Zuckerseitenkette und dem Asparaginsäure-Rest spaltet. Auf diese Weise werden praktisch alle N-verknüpften Zuckerketten vom High Mannose-, Hybrid- und Komplex-Typ von Glycoproteinen abgespalten.

Materialien:

- PNGase F (New England Biolabs) 500000 NEB U/ml;
- Denaturierungspuffer, 10×:
  5 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol;
- G7-Puffer, 10×:
  500 mM Natrium-Phosphat, pH 7,5;
- Nonidet P-40, 10 %.

Durchführung:

- Die zu deglycosylierende Probe wird mit der entsprechenden Menge Denaturierungspuffer, 10× versetzt und für 10 min bei 100 °C inkubiert.
- Dann wird 1/10 Volumen G7-Puffer, 10× und 1/10 Volumen Nonidet P-40, 10 % zugesetzt.
- Je 20 µg Glycoprotein werden 500–2500 U PNGase F zugesetzt und der Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.5.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Bei dem verwendeten elektrophoretischen Verfahren (Laemmli, 1970) erfolgt die Trennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen (Anwesenheit von SDS und β-Mercaptoethanol), wobei eine Kombination von zwei Geltypen eingesetzt wird: Zum einen ein großporiges Sammelgel, in welchem die Proteine konzentriert und zu einer scharf begrenzten Zone gesammelt werden, zum anderen ein darunter liegendes kleinporiges Trenngel, in welchem die Proteine nach Molekulargewicht getrennt werden. Als Gelmaterial kommt Polyacrylamid zum Einsatz. Das Trennvermögen dieser diskontinuierlichen Elektrophorese beruht auf der Kombination des Molekularsiebeffekts mit einem Konzentrierungseffekt. Letzterer wird dadurch verursacht, daß sich in Trenn- und Sammelgel andere Ionen (Leitionen: Chlorid-Anionen) als in den Elektrodengefäßen (Folgeionen: Glycinat[21]) befinden und der pH-Wert im Sammelgel niedriger als im Elektrodenpuffer und im Trenngel ist. Die effektive Beweglichkeit aller an der Elektrophorese beteiligten Ionen verhält sich dabei wie folgt: Leitionen > Proteine > Folgeionen. Bei Anlegen einer Gleichspannung wandern die Leitionen infolge ihrer hohen Beweglichkeit den Proteinen und Folgeionen im Sammelgel voraus und hinterlassen eine Zone geringerer Leitfähigkeit. Dadurch steigt die Feldstärke, was wiederum eine Beschleunigung der Proteine und Folgeionen hervorruft. Da die Proteine nicht schneller wandern als die Leitionen, andererseits von den Folgeionen nicht überholt werden können, entsteht eine schmale, konzentrierte Proteinschicht. Beim Übergang vom Sammel- zum Trenngel nimmt – infolge des alkalischeren pH-Wertes im Trenngel – die Beweglichkeit der Folgeionen stark zu und erreicht

[21] Glycin ist ein Zwitterion und der Ladungszustand demzufolge stark pH-abhängig.

die Beweglichkeit der Leitionen. Damit wandern im Trenngel Leit- und Folgeionen der Proteinschicht voraus. Die Trennung der Proteine erfolgt in Anwesenheit von SDS und β-Mercaptoethanol, also unter denaturierenden Bedingungen, hauptsächlich nach der Größe der Proteine. SDS als starkes Detergenz zerstört alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen, während mit Hilfe von β-Mercaptoethanol Disulfidbrücken reduziert werden. Weiterhin binden die SDS-Anionen an die Proteinkette und zwar ein SDS-Anion je zwei Aminosäure-Reste, so daß ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen stark negative Ladung der Zahl der Aminosäure-Reste und damit dem Molekulargewicht ungefähr proportional ist. Die durch das gebundene SDS hervorgerufene negative Ladung „überdeckt" im Regelfall die ursprüngliche Nettoladung des Proteins bei weitem, so daß diese bei der Auftrennung keine Rolle mehr spielt.

Materialien:

- Materialien, Acrylamid/Bisacrylamid (30 %):
  Rotiphorese Gel 30 (Roth), gebrauchsfertig.

- Tris-HCl, 1 M (pH 8,7) für Trenngel:
  60,55 g Tris Base werden in 400 ml bidest. Wasser gelöst, der pH mittels conc. HCl auf 8,7 eingestellt und die Lösung auf 500 ml aufgefüllt.

- Tris-HCl, 1 M (pH 6,8) für Sammelgel:
  12,11 g Tris Base werden in 80 ml bidest. Wasser gelöst, der pH mittels conc. HCl auf 6,8 eingestellt und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt.

- SDS (20 %):
  28,84 g SDS werden in 100 ml bidest. Wasser gelöst.

- Elektrophoresepuffer (5×):
  15,1 g Tris Base,
  94 g Glycin,
  10 g SDS,
  werden in 900 ml bidest. Wasser gelöst, der pH auf 8,3 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt (Eine 10× Lösung kann aufgrund der mangelnden Löslichkeit des Glycins nicht angesetzt werden!).

- APS-Stammlösung (10 %):
  1 g APS in 10 ml bidest. Wasser. Die Stammlösung wird aliquotiert und bei -

20 °C gelagert Die Lösung ist bei -20 °C praktisch unbegrenzt haltbar, die Aliquots sollten aber nur einmal aufgetaut werden.

- Probenpuffer (2×):
  1 ml Tris (1 M, pH 6,8),
  2 ml Glycerol,
  2 ml SDS (20 %)
  werden mit bidest. Wasser auf 9 ml aufgefüllt und mit
  2 mg Bromphenolblau
  versetzt. Unmittelbar vor Gebrauch wird der benötigten Menge 10 % β-Mercaptoethanol
  zugesetzt (entspricht 100 mM Tris, pH 6,8, 20 % Glycerol, 4 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau, 10 % β-Mercaptoethanol).

- Molekulargewicht-Standards:
  Low Weight Protein Marker (Boehringer Mannheim),
  Full Range Recombinant Protein Marker (Amersham).

Gießen des Gels:

- Vorarbeiten:
  Für 16 × 18 cm Gele (1 mm dick) werden die entsprechenden Glasplatten (Ohren- und Spacerplatten) je 2× mit EtOH (80 %) und bidest. Wasser gereinigt (Kimwipes, fusselfrei verwenden). Auf die Spacerplatte wird erst die Silicondichtung dann die Ohrenplatte aufgelegt und der Sandwich mit den entsprechenden Klammern fixiert.

- Gießen des Trenngels (10 %):
  Für zwei große Gele werden benötigt:
  24 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %/0,8 %),
  17,8 ml bidest. Wasser,
  27 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,7),
  300 µl SDS (20 %),
  300 µl APS (10 %),
  30 µl TEMED.
  Nach Zugabe der beiden letzten Komponenten wird jeweils kurz gemischt und

die Gele sofort gegossen. Direkt nach dem Gießen wird die Flüssigkeit mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet, um einen geraden Gelrand zu erhalten. Nach ca. 1 h wird vom polymerisierten Trenngel das n-Butanol abgegossen und mit bidest. Wasser nachgespült, verbliebene Flüssigkeitsreste werden mit Whatman 3MM Filterpapier abgesaugt.

- Gießen des Sammelgels (5 %):
  3,6 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %/0,8 %),
  15,5 ml bidest. Wasser,
  2,8 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8),
  110 µl SDS (20 %)
  werden zusammengeben, die Polymerisationsreaktion durch Zugabe von
  110 µl APS (10 %), 12 µl TEMED
  gestartet und die polymerisierten Trenngele mit der Sammelgellösung überschichtet. Direkt nach dem Gießen werden die Probenkämme eingesetzt. Nach ca. 1–2 h ist die Polymerisierungsreaktion vollständig und die Gele können mit den Proben beladen werden.

Gel-Lauf:

- Vorarbeiten:
  Der Kamm wird entfernt, und die eventuell vorhandenen Gelreste vorsichtig aus den Taschen mit bidest. Wasser ausgewaschen. Dann wird der Gelsandwich in die Gelkammer (Biometra) eingebaut. Vor dem Probenauftrag werden die Probentaschen mit Laufpuffer gespült und Luftblasen am unteren Gelrand entfernt.

- Probenvorbereitung:
  Die benötigten Zellysate werden aufgetaut und jeweils die gewünschte Menge entnommen. Alle Proben sowie der Molekurgewichtsstandard[22] werden mit Lysepuffer auf das gleiche Volumen gebracht und mit der entsprechenden Menge Probenpuffer (2×) versetzt. Die Proben werden für 10 min bei 90 °C inkubiert[22] und anschließend aufs Gel aufgetragen.

[22] Full Range Recombinant Molekurgewichtsstandard sollte weder mit Probenpuffer versetzt noch erhitzt werden, da dies die an die Proteine gekoppelten Farbstoffe zerstört. Damit geht der entscheidende Vorteil dieses Markers verloren, nämlich die Sichtbarkeit der Proteinbanden sowohl im Gel als auch auf der Membran nach erfolgtem Proteintransfer.

- Der Probeneinlauf erfolgt mit konstanter Spannung (50–80 V), die Auftrennung der Proben bei 100–120 V über Nacht. Die Elektrophorese wird abgebrochen, wenn die Bromphenolblau-Bande die untere Gelgrenze erreicht hat.

2.5.6 Western Blotting

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde in Analogie zu den DNA- und RNA-Nachweisverfahren Southern- und Northern-Blotting eine Methode entwickelt, die als Western Blotting bezeichnet wird (Burnette, 1981; Towbin & Gordon, 1984). Hierbei werden die Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld vom Gel auf eine Trägermembran übertragen (das eigentliche Blotting). Die immobilisierten Proteine werden mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Durchgesetzt haben sich nicht-radioaktive Methoden, bei denen ein sekundärer Antikörper – der gegen den F_c-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist – verwendet wird, der mit einem Enzym gekoppelt ist, das eine leicht detektierbare Reaktion katalysiert (siehe 2.5.6.2).
Materialien:

- Blotpuffer (Towbin-Puffer):
  2,42 g Tris,
  11,26 g Glycin
  werden mit 700 ml bidest. Wasser versetzt und auf pH 8,3 eingestellt. Dann werden 200 ml Methanol zugesetzt und abschließend mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

- Ponceau S-Lösung:
  Stammlösung (10×):
  2 g Ponceau S,
  30 g TCA,
  30 g Sulfosalicylsäure
  werden mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Alternativ: Ponceau S-Konzentrat (Sigma).
  Gebrauchslösung:
  1:10 Verdünnung (mit bidest. Wasser) der Stammlösung. Die Gebrauchslösung

kann mehrfach verwendet werden und ist für mindestens 1 Monat bei Raumtemperatur stabil.

2.5.6.1 Semi-Dry Blotting

Durchführung:

- Vorbereitung der PVDF-Membran (Hybond P, Amersham):
  Die Membran wird vollständig mit Methanol benetzt, dann 5 min in bidest. Wasser zum Entfernen des Methanols unter leichtem Schütteln eingeweicht (Wasser 2–3× wechseln) und abschließend für 15 min in Blotpuffer eingeweicht (wobei darauf geachtet werden muß, daß die relativ hydrophobe PVDF-Membran immer vollständig benetzt ist).

- Zusammenbau des Blot-Sandwichs:
  Zwölf Whatman 3MM Filterpapiere werden auf Gelgröße zugeschnitten und in Blotpuffer eingeweicht. Die passende Mylarmaske (abhängig von der Gelgröße) wird auf die Anode der Semi-Dry Blotkammmer (Semiphor, Hoefer) aufgelegt und mit Klebeband fixiert. Sechs mit Blotpuffer getränkte Whatman Papiere werden luftblasenfrei aufgelegt, dann die vorbereitete Membran. Das Trenngel wird auf ein mit Blotpuffer getränktes Whatman Papier überführt und so schnell wie möglich auf die Membran aufgelegt (luftblasenfrei), da die PVDF-Membran nicht trocken werden darf. Wegen der einsetzenden Bindung der Proteine an die Membran sollte das Gel nach Möglichkeit nicht mehr nachträglich gegen die Membran verschoben werden. Abschließend werden die restlichen fünf Whatman Papiere aufgelegt.

- Proteintransfer (Blotting):
  Die Semi-Dry-Apparatur wird mit dem Kathodendeckel geschlossen, und die Proteinproben mit einer konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm^2 Membranfläche (entspricht 160 mA für einen $12 \times 16{,}5$ cm Blot) für 90 min bei Raumtemperatur geblottet.

- Ponceau S-Färbung (nur bei Verwendung des Low Weight Protein Markers):
  Mit Hilfe dieser temporären Proteinfärbung kann überprüft werden, inwieweit der Proteintransfer auf die Membran funktioniert hat. Hierzu wird die geblottete Membran für 5–10 min unter leichtem Schütteln in Ponceau S-Gebrauchslösung

angefärbt, anschließend die Färbelösung entfernt und der überschüssige Farbstoff durch mehrmaliges Waschen mit bidest. Wasser entfernt. Für die spätere Protein-Größenbestimmung wird die Markerspur abgeschnitten und die Färbung mit Essigsäure (5 %) fixiert.

2.5.6.2 ECL-Detektionssystem

Das enhanced-chemiluminescence (ECL) System ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von immobilisierten Antigenen, die direkt oder indirekt mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Antikörper markiert werden. Die Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) oxidiert ein geeignetes organisches Substrat – das Diacylhydrazid Luminol – unter Umsetzung von H_2O_2 zu H_2O. Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand aus dem es unter Lichtemission, die mittels Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird, wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Die Reaktion erreicht ca. 5 min nach Substratzugabe das Maximum der Lichtemission, dann fällt die Signalstärke langsam ab. In Abbildung 2.9 ist das Funktionsprinzip des ECL-Systems schematisch dargestellt.

Materialien:

- TBS:
  150 mM NaCl (8,76 g/l),
  13 mM Tris (1,57 g/l),
  werden in 900 ml bidest. Wasser gelöst auf pH 7,5 gebracht (am pH-Meter mit HCl, 32 % einstellen) und auf 1000 ml aufgefüllt.

- TBS-T:
  1 l TBS, pH 7,5 werden mit 0,02 % Triton X-100 (200 µl) versetzt.

- Block-Lösung:
  Rotiblock-Konzentrat (Roth) 1:10 in bidest. Wasser verdünnt (50–100 ml pro Blot).

- Primärantikörper:
  Die Antikörper-Lösung wird im gewünschten Maße in Block-Lösung verdünnt (10–20 ml pro Blot).

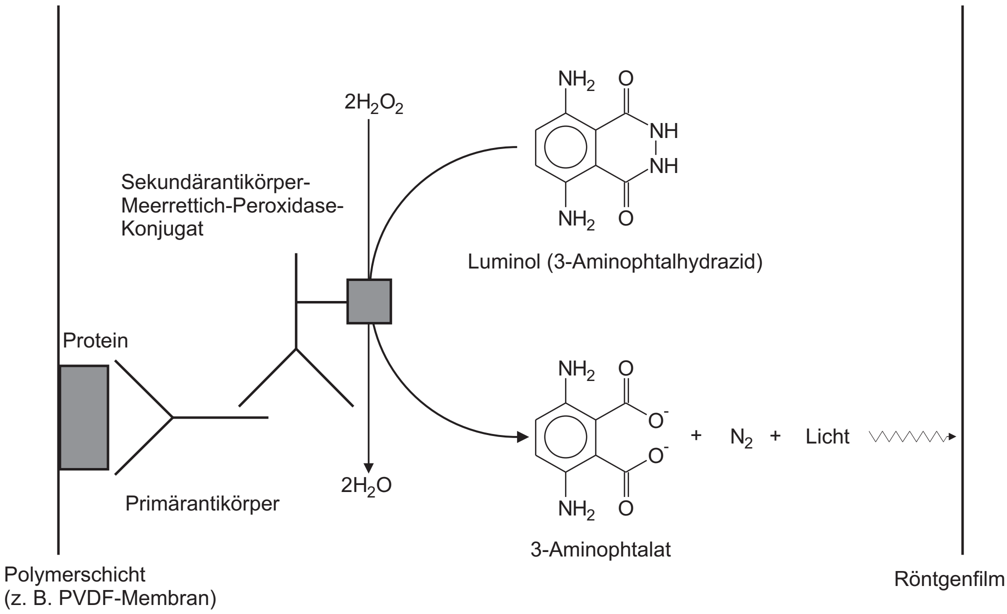

Abbildung 2.9: Prinzip der ECL-Detektion. An das immobilisierte Protein bindet der für das zu detektierende Protein spezifische Primärantikörper. Dessen F_c-Teil wird vom Sekundärantikörper erkannt, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. Diese setzt das Substrat Luminol in einer lichterzeugenden Reaktion um. Die Lichtemission wird mit Hilfe eines Films detektiert.

- Sekundärantikörper (Anitkörper-HRP-Konjugat, Amersham):
  Die Antikörper-Lösung wird im gewünschten Maße in Block-Lösung verdünnt (10–20 ml pro Blot).

- ECL-Detektionslösungen 1 und 2:
  Fertiglösungen von Amersham.

- Hybridisierungsofen und Hybridisierungsröhrchen (Bachofer)

- ECL-Hyperfilm (Amersham)

Durchführung:

- Blocken der Membran:
  Die Membran wird in ein Hybridisierungsröhrchen überführt (Proteinseite nach innen) und 50–100 ml Block-Lösung zugegeben, dann wird für 1 h bei 20 °C im Hybridisierungsofen geblockt. Danach wird die Block-Lösung verworfen.

- Bindung des primären Antikörpers:
  Die Antikörper-Verdünnung wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und in das Hybridisierungsröhrchen mit der geblockten Membran überführt. Dann wird für 1–2 h bei 20 °C im Hybridisierungsofen inkubiert (wobei auf die waagrechte Lage des Röhrchens geachtet werden muß, da sonst die Membran nicht gleichmäßig von der Antikörper-Lösung benetzt wird). Die Antikörper-Verdünnung kann mehrfach verwendet werden (Lagerung bei 4 °C).

- Waschen:
  Die Antikörper-Lösung wird entfernt, Reste mit TBS-T ausgewaschen und dann 3×10 min mit je 50 ml TBS-T gewaschen.

- Bindung des sekundären Antikörpers: Die Antikörper-HRP-Konjugat-Verdünnung wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und in das Hybridisierungsröhrchen mit der gewaschenen Membran überführt. Dann wird für eine Stunde bei 20 °C im Hybridisierungsofen inkubiert (wobei auf die waagrechte Lage des Röhrchens geachtet werden muß, da sonst die Membran nicht gleichmäßig von der Antikörper-Lösung benetzt wird).

- Waschen:
  Die Antikörper-Lösung wird entfernt, Reste mit TBS-T ausgewaschen und dann 6×10 min mit je 50 ml TBS-T gewaschen.

- Detektion:
  Die gewaschene Membran wird auf einen aufgeschnittenen Vernichtungsbeutel (Brand) überführt. Je 7,5 ml ECL-Reagenz 1 und 2 werden gemischt, auf die Membran aufgegeben und dann für 60 sec inkubiert. Überschüssiges Reagenz wird durch Abtropfen entfernt, dann wird die Membran auf einen neuen (in eine Filmkassette geklebten) aufgeschnittenen Vernichtungsbeutel gelegt. Der Beutel wird zugeklappt und Luftblasen durch Ausstreichen entfernt. In der Dunkelkammer wird ein ECL-Hyperfilm aufgelegt (es wird mit 15 sec Belichtungszeit begonnen, dann bei jedem neuen Film die Belichtungszeit verdoppelt) und anschließend entwickelt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Plasmidkonstrukte

3.1.1 Der retrovirale Vektor pLXSP

Für einige der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde ein retroviraler Vektor benötigt, der anstelle der G418-Resistenz für ein anderes Resistenzgen codiert. Damit ist eine Selektion von Zellen nach retroviraler Transduktion möglich, die bereits eine G418-Resistenz aufweisen. Verwendet wurde das Puromycin-Resistenzgen, wobei als Quelle für das Gen der Puromycin-Acetyltransferase (*pac*) das Plasmid pPUR diente[1] (de la Luna et al., 1988[2]). Für die Umklonierung als günstig erwies sich die Tatsache, daß *pac* in pPUR und *neo*^{r} in pLXSN unter der Kontrolle des SV40$_{\text{early}}$-Promotors stehen. Daher konnte bei der Klonierung auf eine Schnittstelle innerhalb dieses Promotors zurückgegriffen werden. Abbildung 3.1 verdeutlicht die gewählte Klonierungsstrategie. Durch *Nco*I Verdau wurde das 3'-Ende des SV40$_{\text{early}}$-Promotors sowie der größte Teil des *neo*^{r}-Gens aus pLXSN entfernt. Analog wurde aus pPUR durch Verdau mit demselben Restriktionsenzym ein Fragment, bestehend aus dem 3'-Ende des SV40$_{\text{early}}$-Promotors und dem vollständigen *pac*-Gen, ausgeschnitten. Dieses wurde dann in das dephosphorylierte pLXSN Vektorfragment eingefügt. Bei richtiger Orientierung wird somit ein funktioneller SV40$_{\text{early}}$-Promotor

[1] pPUR wurde freundlicherweise von W. J. Neubert zur Verfügung gestellt.

[2] In dieser Veröffentlichung wird pPUR als pBS*pac*ΔP bezeichnet.

wiederhergestellt, der eine Expression des *pac*-Gens ermöglicht. Das – infolge der ge-

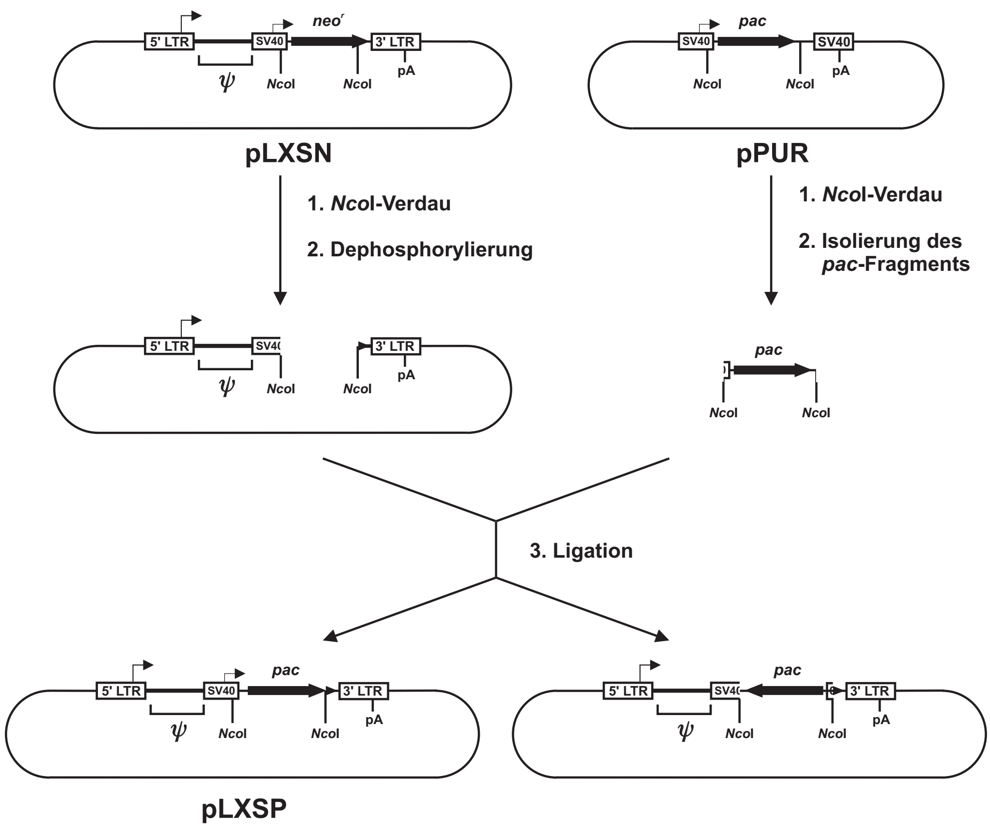

Abbildung 3.1: Klonierung des retroviralen Vektors pLXSP.

wählten Klonierungsstrategie – in pLXSP verbliebene 3'-Fragment von neo^r ist funktionslos. Dies wurde durch Transfektion (siehe 2.3.3.2) von pLXSP in NIH 3T3-Zellen und anschließende Selektion mit 600 µg/ml G418 (Geneticin) überprüft, die zu einem vollständigen Absterben der transfizierten Zellen führte. Dagegen zeigten die pLXSP-transfizierten Zellen die erwartete Puromycin-Resistenz bei Selektion mit 5 µg/ml Puromycin.[3] Bei der funktionellen Überprüfung ergaben sich mit pLXSP retrovirale Titer in der gleichen Größenordnung wie bei Verwendung von pLXSN. Der retrovirale Vektor pLXSP stellt somit eine gleichwertige Alternative zu pLXSN dar.

[3]Zur Ermittlung der geeigneten Konzentrationen zur Selektion auf die jeweilige Antibiotikum-Resistenz siehe die Fußnoten 8 und 9 auf den Seiten 124 und 129.

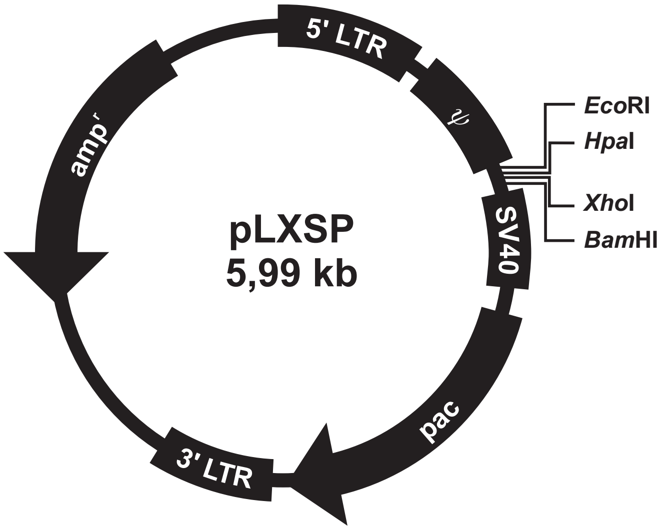

Abbildung 3.2: Aufbau des retorviralen Vektors pLXSP. Der Vektor stellt ein Analogon des unter 2.4.4.1 beschriebenen Vektors pLXSN dar. Anstelle des Aminoglycosid-Phosphotransferase Gens, das Neomycin-Resistenz (*neo*^{r}) verleiht, enthält pLXSP das Puromycin-Acetyltransferase Gen *pac*, das Puromycin-Resistenz verleiht.

3.1.2 Plasmide für die Expression viraler Hüllproteine

Als Grundgerüst für die Expression viraler Hüllproteine wurde der Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) gewählt. Dieses Plasmid enthält stromabwärts des hCMV-IE-Promotors zahlreiche singuläre Schnittstellen, die den Einbau der zu exprimierenden Sequenz ermöglichen. Gefolgt werden diese von einer Polyadenylierungsstelle, die der Stablisierung des Transkripts dient. Um die Etablierung stabiler Klone nach Transfektion zu ermöglichen, enthält pcDNA3 eine zweite Expressionskasette bestehend aus dem $SV40_{early}$-Promotor, dem Neomycin-Resistenzgen und der SV40-Polyadenylierungsstelle, die eine G418-Selektion transfizierter Zellen erlaubt. Um durchgeführte Klonierungen mittels Sequenzierung überprüfen zu können, wurden mit Hilfe des Programmes PRIMER (Bestandteil der Sequenzanalyse-Software HUSAR, European Molecular Biology Laboratories, EMBL, Heidelberg) folgende Primer[4] gewählt:

- pcdna3hin:
  `5′ CCCACTGCTTACTGGCTTAT 3′`
  Dieser Primer bindet unmittelbar vor der MCS von pcDNA3 und ermöglicht so die Kontrolle des Übergangs von pcDNA3 zum 5’-Ende der eingefügten cDNA.

[4] Die Synthese der Primer erfolgte durch durch die Firma Pharmacia Biotech.

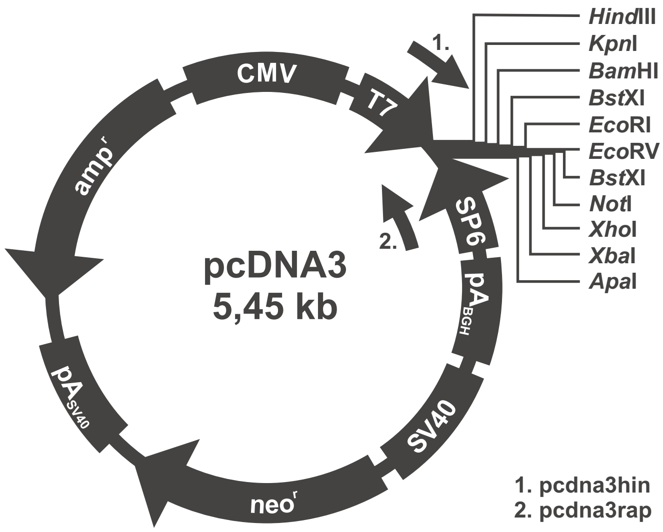

Abbildung 3.3: Aufbau des Expressionsplasmids pcDNA3. Die einzelnen Elemente sind größtenteils im Text erläutert. Erläuterung der Abkürzungen: CMV stellt den immediate early-Promotor des humanen Cytomegalievirus dar; T7 und SP6 sind virale Promotoren, die für die *in vitro* Transkription genutzt werden können; dazwischen befindet sich die aus zehn verschiedenen Schnittstellen bestehende multiple Klonierungsstelle; pA_{BGH} steht für die Polyadenylierungsstelle des Gens für das Rinderwachstumshormon (bovine growth hormone); SV40 für den $SV40_{early}$-Promotor; *neo*^{r} für das Neomycin-Resistenzgen; pA_{SV40} für die SV40-Polyadenylierungsstelle; *amp*^{r} für das (in Bakterien exprimierbare) Ampicillin-Resistenzgen. Die mit 1. und 2. markierten Pfeile stehen für die Seqenzier-Primer pcdna3hin und pcdna3rap (siehe Text).

- pcdna3rap:
  `5′ CGAGGCTGATCAGCGAGCTC 3′`
  Dieser Primer bindet nach der letzten Restriktionschnittstelle (*Apa*I) der MCS von pcDNA3 und ermöglicht so die Kontrolle des Übergangs vom 3’-Ende der eingefügten cDNA zu pcDNA3.

3.1.2.1 pcDNA3-G für die Expression des VSV-G Hüllproteins

Da der Einbau des VSV-G Hüllproteins in Retroviruspartikel sehr gut funktioniert (Emi et al., 1991; Burns et al., 1993), wurde die Erzeugung von MoMLV(VSV-G) Pseudotypen als Positivkontrolle für die Bildung retroviraler Pseudotyppartikel herangezogen. Hierzu wurde ein Expressionsplasmid benötigt, mittels dem nach transienter Transfektion in retroviralen Verpackungszellen das VSV-G Protein exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde die VSV-G cDNA aus pSVGL1 (Rose & Bergmann, 1982) in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) umkloniert. In pSVGL1 ist die VSV-G cDNA an beiden Enden jeweils von *Bam*HI-, *Eco*RI- und *Xho*I-Schnittstellen flankiert, die für die Umklonierung genutzt werden können, da keines der drei Enzyme innerhalb der VSV-G cDNA schneidet. Gewählt wurde die *Bam*HI-Schnittstelle; damit ergab sich folgender Klonierungsverlauf: Mittels *Bam*HI-Verdau wurde pcDNA3 linearisiert und dasselbe Restriktionsenzym zum Ausschneiden der VSV-G cDNA aus pSVGL1 benutzt, die dann in das linearisierte und dephosphorylierte pcDNA3 Plasmid eingefügt wurde. In Abbildung 3.4 ist der Ablauf der Klonierung schematisch dargestellt. Die Klonierungsübergänge von Vektor (pcDNA3) zu VSV-G cDNA wurden, unter Verwendung der Primer pcdna3hin und pcdna3rap (siehe 3.1.2), mittels Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft.

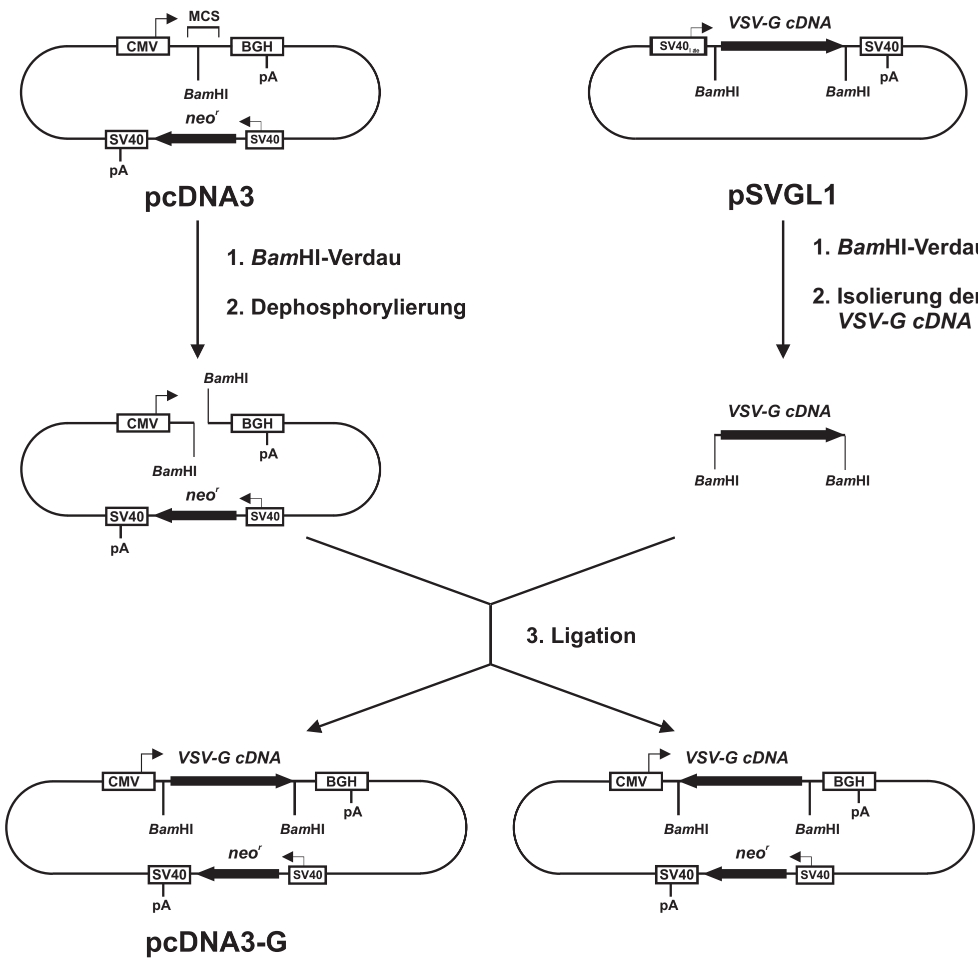

Abbildung 3.4: Klonierung des VSV-G Expressionsplasmids pcDNA3-G.

3.1.2.2 pcDNA3-F für die Expression des SeV-F Proteins

Zur Expression des SeV-F Proteins in retroviralen Verpackungszellen wurde die SeV-F cDNA in den Vektor pcDNA3 umkloniert. Als Quelle für die F-cDNA diente das Plasmid pUC29-F (Gerner, 1995). In diesem Konstrukt ist die F-cDNA von einer *Eco*RI- und einer *Xho*I-Schnittstelle flankiert, die auch (in der richtigen Abfolge) in der MCS von pcDNA3 vorhanden sind. Damit ergab sich der auch in Abbildung 3.5 skizzierte Ablauf der Klonierung. Mittels *Eco*RI/*Xho*I-Verdau wurde pcDNA3 linearisiert. Dieselben Restriktionsenzyme konnten zum Ausschneiden der SeV-F cDNA aus pUC29-F benutzt werden, die dann in das linearisierte pcDNA3 Plasmid eingefügt wurde. Die Klonierungsübergänge von Vektor (pcDNA3) zu SeV-F cDNA wurden, unter Verwendung der Primer pcdna3hin und pcdna3rap (siehe 3.1.2), mittels Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft.

In Abbildung 3.6 sind die analog aufgebauten Expressionsplasmide pcDNA3-G und pcDNA3-F noch einmal schematisch dargestellt.

3.1.2.3 pcF$_N$PUR

Um stabile SeV-F exprimierende Klone aus bereits G418-resistenten Zellen erzeugen zu können, wurde die gesamte SeV-F Expressionskassette aus pcDNA3-F (bestehend aus hCMV IE Promotor, SeV-F cDNA und BGH polyA) in den Vektor pPUR umkloniert. Die Umklonierung der SeV-F Expressionskassette erfolgte als blunt-end Klonierung nach dem in Abbildung 3.7 dargestellten Schema. Mittels *Nru*I/*Pvu*II-Verdau wurde die SeV-F Expressionskassette aus pcDNA3-F als blunt-end Fragment ausgeschnitten. Die Linearisierung von pPUR erfolgte unmittelbar vor dem SV40-Promotor der *pac*-Expressionskassette. Dort wurde dann die SeV-F Expressionskassette eingefügt. Als gewünschtes Konstrukt wurde dasjenige mit gegenläufiger Anordnung der Expressionskassetten für die SeV-F cDNA und *pac* gewählt.

3.1.2.4 pcF$_{WT}$PUR

Die zur Verfügung stehende SeV-F cDNA, die vom F-Gen des SeV Stammes *Fushimi* abgeleitet ist, besitzt in der Sequenz des Signalpeptids eine Punktmutation. Diese war ursprünglich eingefügt worden, um eine *Nco*I-Schnittstelle einzuführen, führt aber

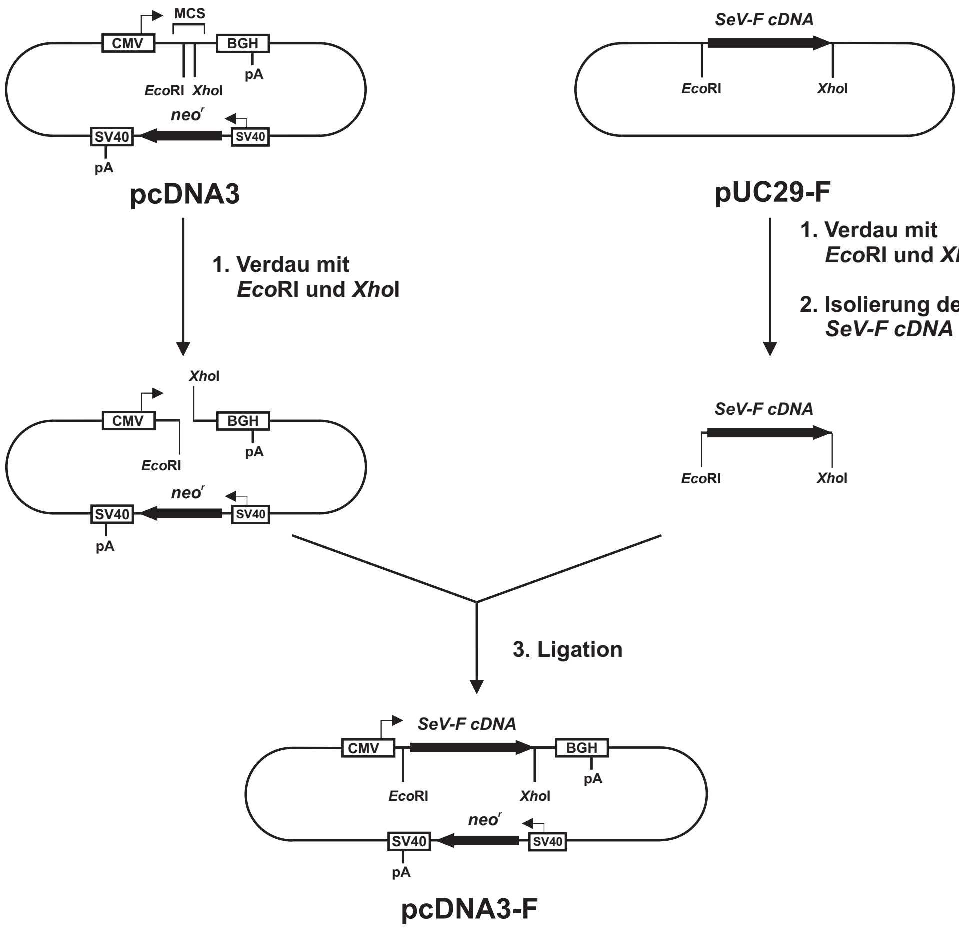

Abbildung 3.5: Klonierung des SeV-F Expressionsplasmids pcDNA3-F.

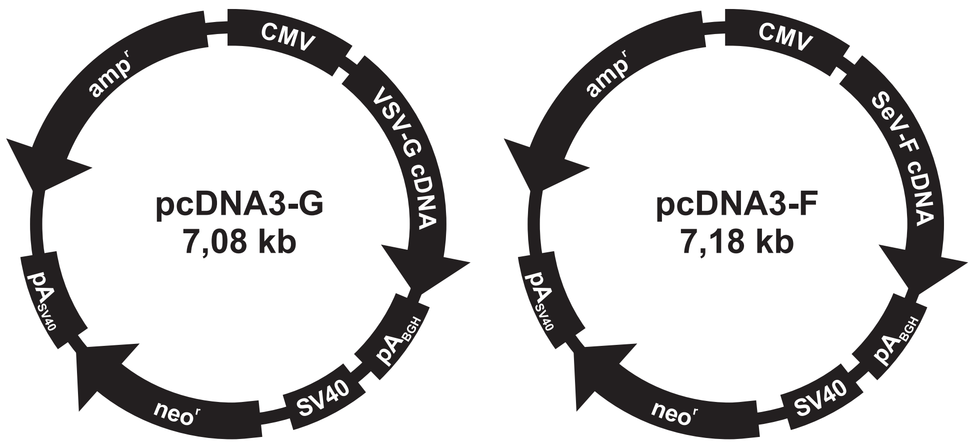

Abbildung 3.6: Aufbau des VSV-G Expressionsplasmids pcDNA3-G und des SeV-F Expressionsplasmids pcDNA3-F.

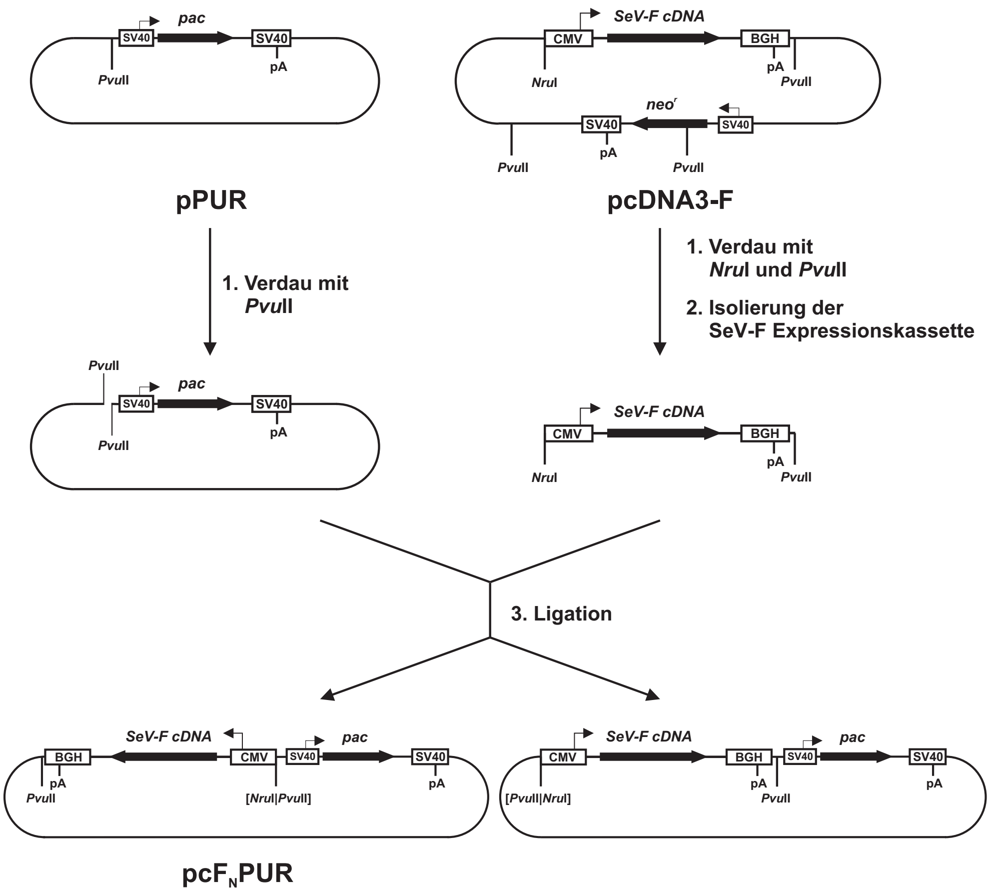

Abbildung 3.7: Klonierung des SeV-F Expressionsplasmids pcF$_N$PUR.

somit auch zu einem veränderten Signalpeptid:

```
Original-Sequenz:   ...CCATGACAGCA...
                         |  |  |
                         M  T  A
                       NcoI
Mutierte Sequenz:   ...CCATGGCAGCA...
                         |  |  |
                         M  A  A
```

Mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese (Deng & Nickoloff, 1992; siehe 2.2.11) wurde diese A→G Mutation wieder rückgängig gemacht. Hierzu wurden zunächst mit Hilfe des Programmes PRIMER (Bestandteil der Sequenzanalyse-Software HUSAR, European Molecular Biology Laboratories, EMBL, Heidelberg) folgende Primer[5] ausgewählt:

[5]Die Synthese und Reinigung der Primer erfolgte durch die Firma Eurogentech

- Mutageneseprimer:
  `5′ CGGCCATGACAGCATATATC 3′`
- Selektionsprimer:
  `5′ ACTTCTGACAACCATCGGAG 3′`

Abbildung 3.8 zeigt die Bindungsstellen dieser Primer in pcF$_N$UR und die durch sie eingeführten Mutationen.

A.

```
                       M  T  A  Y  I

Mutageneseprimer: CGGCCATGACAGCATATATC

    SeV-F Signalpeptid, Start->
                           |
                         NcoI
  ...GTGCTGGAATTCCGCGGCCATGGCAGCATATATCCAGAGGTCACAGTGCATCTCAACATC...
4981 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 5040
  ...CACGACCTTAAGGCGCCGGTACCGTCGTATATAGGTCTCCAGTGTCACGTAGAGTTGTAG...

                        M  A  A  Y  I  Q  R  S  Q  C  I  S  T  S
```

B.

```
           L  L  T  T  I  G  G
Selektions-
primer:    ACTTCTGACAACCATCGGAG

                      PvuI
  ...CAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACAT...
2751 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2810
  ...GTTGAATGAAGACTGTTGCTAGCCTCCTGGCTTCCTCGATTGGCGAAAAAACGTGTTGTA...

      N  L  L  L  T  T  I  G  G  P  K  E  L  T  A  F  L  H  N  M
```

Abbildung 3.8: Mutagenisierung der SeV-F Signalsequenz in pcF$_N$PUR. **A.** Der Mutageneseprimer setzt die SeV-F Signalsequenz auf die Wildtypsequenz zurück. Durch den G→A-Austausch erfolgt auf Aminosäure-Ebene ein Wechsel von Alanin (A) zurück zu Threonin (T). Der Verlust der *Nco*I-Schnittstelle auf Nucleinsäure-Ebene ist für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ohne Belang. **B.** Der Selektionsprimer führt eine stille Punktmutation in das *amp*^{r}-Gen ein (G→C-Austausch), der zum Verlust der singulären *Pvu*I-Schnittstelle, auf Aminosäure-Ebene aber zu keiner Änderung führt.

Obwohl relativ kurze Primer für die Mutagenisierung verwendet wurden sowie auf eine ungünstige (eine GATC-Sequenz enthaltende) Selektionsschnittstelle selektioniert wurde (Stratagene Cloning Systems, 1997) und damit die Effizienz aufgrund der suboptimalen Bedingungen herabgesetzt war, gelang die Mutagenisierung von pcF$_N$PUR zu pcF$_{WT}$PUR. Die Mutagenisierung wurde sowohl über den Verdau mit

*Nco*I (pcF$_{WT}$PUR zeigt infolge des Wegfalls der mutierten *Nco*I-Schnittstelle ein anderes Fragmentmuster als pcF$_N$PUR) als auch durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung konnte mit Hilfe der Primer pcdna3hin und pcdna3rap (siehe 3.1.2) durchgeführt werden, da die komplette SeV-F Expressionskassette aus pcDNA3-F in pcF$_N$PUR umkloniert worden war (siehe 3.1.2.3).

Das Plasmid pcF$_{WT}$PUR wurde in den (in Abschnitt 3.4.2.1 beschriebenen) Experimenten zur Optimierung der SeV-F Expression eingesetzt.

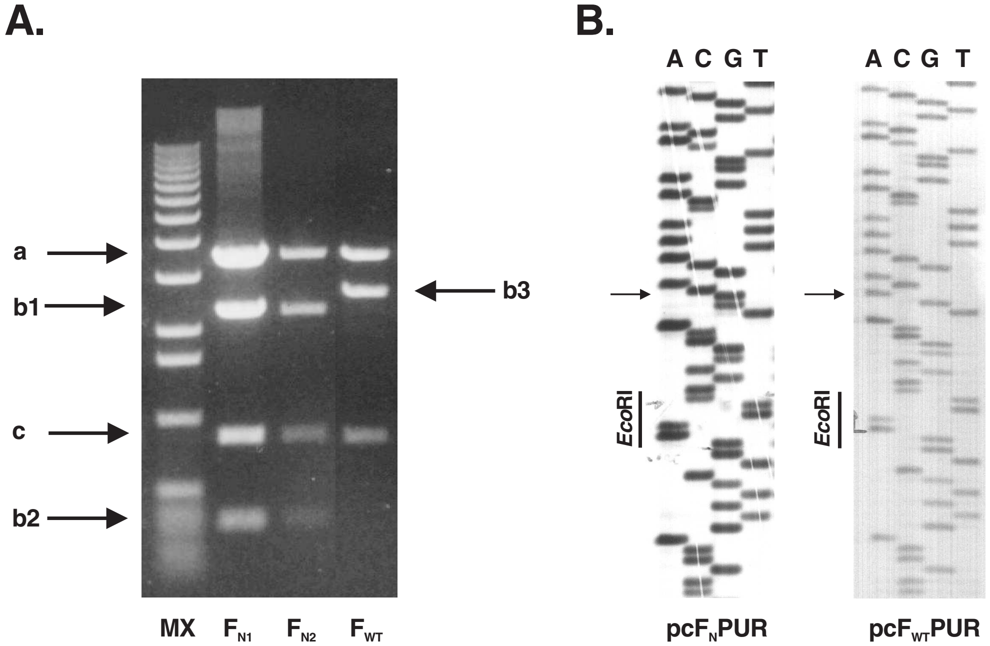

Abbildung 3.9: Ergebnis der Mutagenisierung der SeV-F Signalsequenz in pcF$_N$PUR. **A.** Durch die Mutagenisierung kommt es zum Wegfall einer *Nco*I-Schnittstelle. MX: Marker X (1 kb-Leiter, Life Technologies); F$_{N1}$: Plasmid pcFNPUR (500 ng); F$_{N2}$: Erfolglose Mutagenisierung; F$_{WT}$: Erfolgreiche Mutagenisierung zu pcF$_{WT}$PUR. Während der Verdau von pcF$_N$PUR mit *Nco*I zu vier Fragmenten mit den Größen 3580 bp (a), 2299 bp (b1), 848 bp (c) und 339 bp (b2) führt, entstehen nach der Mutation zu pcF$_{WT}$PUR drei Fragmente der Größe 3580 bp (a), 2638 bp (b3) und 848 bp (c). **B.** Sequenzierung des entsprechenden Abschnitts in pcF$_N$PUR und pcF$_{WT}$PUR. Angezeichnet ist der Übergang von Vektor-DNA zu SeV-F cDNA (*Eco*RI-Schnittstelle). Die Pfeile markieren die Position des Austauschs von G (pcF$_N$PUR) nach A (pcF$_{WT}$PUR).

3.1.2.5 Konstrukte für die Tetracyclin-regulierte Expression des SeV-F Proteins

Da bei Verwendung konstitutiver viraler Promotoren (siehe Abschnitte 3.4.2.1 und 3.4.2.2) nur eine geringe SeV-F Expression erzielt wurde, lag die Vermutung nahe, daß die dauerhafte Expression des SeV-F Proteins cytotoxisch ist. Für Fusionsproteine verschiedener (-)-Strang-RNA-Viren wurde eine Toxizität bereits nachgewiesen (Florkiewicz & Rose, 1984; Horvath et al., 1992; Schnell et al., 1996). Daher wurde ein System etabliert, daß ein gezieltes An- und Abschalten der SeV-F Expression erlaubt. Aus den in in 2.3.4 genannten Gründen wurde dabei auf das Tetracyclin-regulierbare System von Gossen & Bujard (1992) zurückgegrriffen.

3.1.2.5.1 Die Regulator-Plasmide pTet-On/P und pTet-Off/P

Zunächst wurden die zur Verfügung stehenden Regulator-Plasmide pUHD15-1 und pUHG17-1 dahingehend modifiziert, daß zusätzlich eine *pac*-Expressionskassette eingefügt wurde. Damit ist – im Vergleich zur Verwendung eines separaten Resistenz-Plasmids, das zusammen mit dem Regulatorplasmid cotransfiziert werden muß – eine höhere Effizienz bei der Etablierung stabiler Zellinien gegeben. Mittels *Xho*I-Verdaus wurde das Ausgangsplasmid pUHD15-1 (Tet-Off) bzw. pUHG17-1 (Tet-On) linearisiert. Anschließend wurden die linearisierten Plasmide dephosphoryliert und die 5'-überhängenden Enden aufgefüllt. Durch *Nde*I/*Bam*HI-Verdau wurde die *pac*-Expressionskassette aus pPUR ausgeschnitten, dann erfolgte ebenfalls das Auffüllen der 5'-überhängenden Enden. In einer blunt-end Ligation wurde dann die *pac*-Expressionskassette in das jeweilige (linearisierte, dephosphorylierte und aufgefüllte) Regulator-Plasmid eingefügt. Als gewünschtes Konstrukt wurde dasjenige mit gegenläufiger Anordnung der Expressionskassetten für tTA bzw. rtTA und *pac* gewählt (pTetOff/P bzw. pTetOn/P). Abbildung 3.10 zeigt die gewählte Klonierungsstrategie, in Abbildung 3.11 sind die generierten Konstrukte noch einmal schematisch dargestellt.

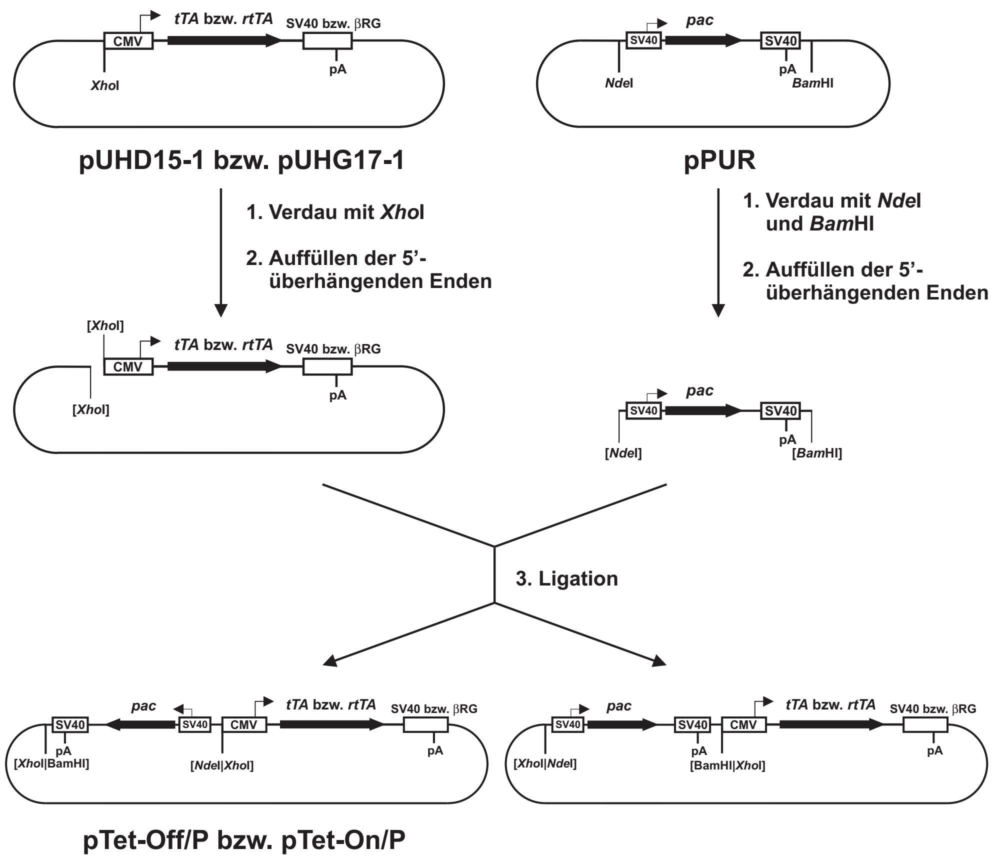

Abbildung 3.10: Klonierung der Regulator-Plasmide pTet-Off/P bzw. pTet-On/P.

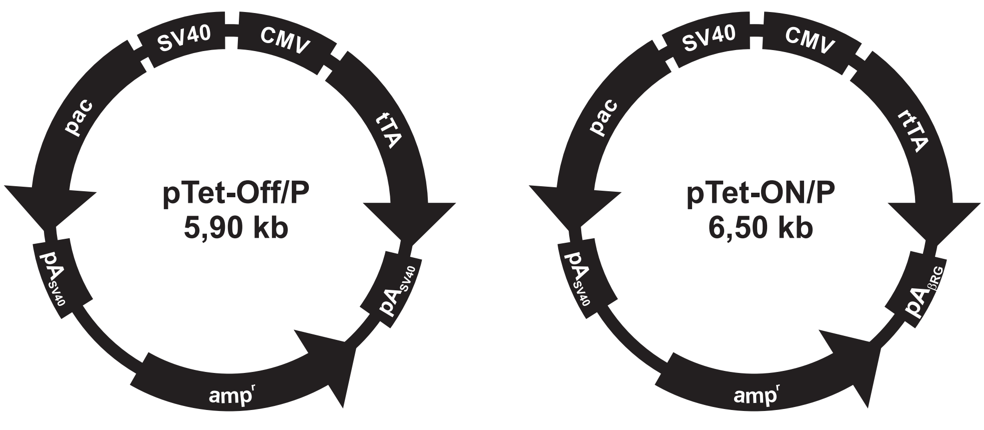

Abbildung 3.11: Die Regulator-Plasmide pTet-Off/P und pTet-On/P.

3.1.2.5.2 Das Tet-responsive Plasmid ptetO-IMCS

Als Tetracyclin-responsives Plasmid stand zunächst nur ptetO-SEAP (siehe 2.3.4) zur Verfügung. Um ein allgemein verwendbares Tetracyclin-responsives Konstrukt zu erhalten, wurde aus ptetO-SEAP das komplette SEAP-Gen sowie die SV40-Polyadenylierungsstelle entfernt und durch eine Sequenz aus pI.18[6] ersetzt, die das Intron A aus CMV[7], eine MCS sowie eine CMV-Polyadenylierungsstelle beinhaltet. Zunächst wurde aus ptetO-SEAP die SEAP cDNA sowie die SV40-Polyadenylierungsstelle durch Verdau mit *Hind*III und *Sal*I entfernt. Anschließend wurde das Vektorfragment dephosphoryliert und die 5'-überhängenden Enden aufgefüllt. Durch *Eag*I/*Hind*III-Verdau wurde aus pI.18 die Sequenz bestehend aus Intron A, MCS und CMV-Polyadenylierungsstelle ausgeschnitten, dann erfolgte ebenfalls das Auffüllen der 5'-überhängenden Enden. In einer blunt-end Ligation wurde dann die Sequenz – bestehend aus Intron A, MCS und CMV-Polyadenylierungsstelle – in das (linearisierte, dephosphorylierte und aufgefüllte) Response-Plasmid eingefügt. Bei richtiger Orientierung des eingefügten Fragments entsteht eine Tetracyclin-regulierbare, leere Expressionskassette, in deren MCS das zu exprimierende Gen eingefügt werden kann. Die MCS enthält singuläre Schnittstellen für folgende Restriktionsenzyme: *Bam*HI, *Xba*I[8], *Bgl*II, *Eco*RV, *Sal*I.

3.1.2.5.3 Das Tet-responsive Plasmid ptetO-IF

In das nun zur Verfügung stehende Konstrukt ptetO-IMCS wurde die SeV-F cDNA – wie in Abbildung 3.13 dargestellt – eingefügt. Zunächst wurde ptetO-IMCS mittels *Bam*HI-Verdau linearisiert. Nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzyms erfolgte das Auffüllen der 5'-überhängenden Enden. Anschließend wurde mit *Sal*I verdaut. Analog wurde pcDNA3-F mit *Eco*RI verdaut, die entstehenden 5'-überhängenden Enden aufgefüllt und dann mit *Xho*I verdaut. Das so gewonnene SeV-F Fragment besitzt 5' glatte Enden (passend zur aufgefüllten *Eco*RI-Schnittstelle im ptetO-IMCS Frag-

[6]pI.18 wurde freundlicherweise von W. J. Neubert zur Verfügung gestellt.

[7]Das Intron dient der Verstärkung der Expression und der Stabilisierung des Transkripts, siehe auch Abschnitt 3.4.2.2.

[8]Die MCS enthält noch eine zweite *Xba*I-Schnittstelle, die jedoch durch *dam*-Methylierung blockiert ist.

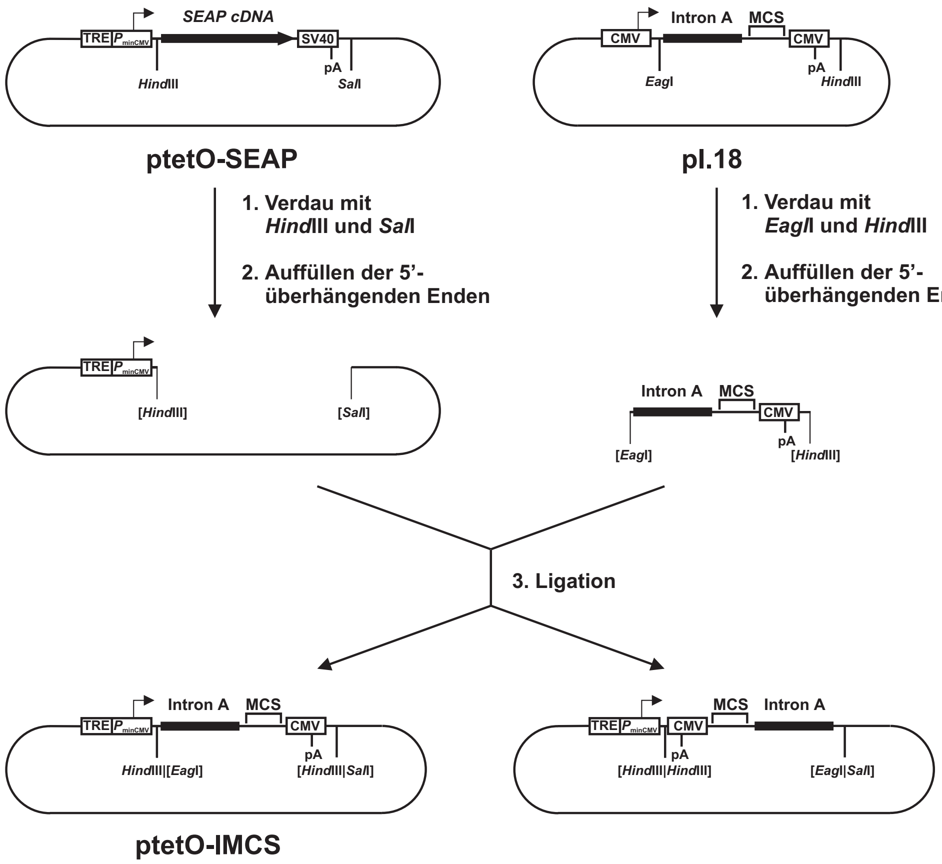

Abbildung 3.12: Klonierung des Tetracyclin-responsiven Plasmids ptetO-IMCS.

ment) und 3' einen durch den *Xho*I-Verdau entstandenen 5'-Überhang (der mit dem durch den *Sal*I-Verdau von ptetO-IMCS entstandenen 5'-Überhang kompatibel ist!). Damit wurde erreicht, daß die SeV-F cDNA in der anschließenden Ligation nur in der gewünschten Orientierung in ptetO-IMCS eingefügt wurde.

3.1.2.5.4 Das Tet-responsive Plasmid ptI-SEAP

Um die Regulierbarkeit pTet-Off/P bzw. pTet-On/P transfizierter Zellen zu überprüfen, wurde auf den in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen SEAP Nachweis zurückgegriffen. Zusätzlich zu dem zur Verfügung stehenden Konstrukt ptetO-SEAP wurde das Plasmid ptI-SEAP als exaktes Analogon zu ptetO-IF generiert, indem das SEAP-Gen in ptetO-IMCS eingefügt wurde. Zu diesem Zweck wurde das SEAP-Gen mittels *Hind*III/*Xba*I-Verdau aus pCMV-SEAP ausgeschnitten. Nach Auffüllen der 5'-überhängenden Enden mit Klenow-Enzym wurde das gelgereinigte SEAP-Fragment in den mit *Eco*RV-verdauten und mit SAP dephosphorylierten Vektor ptetO-IMCS in einer blunt-end Li-

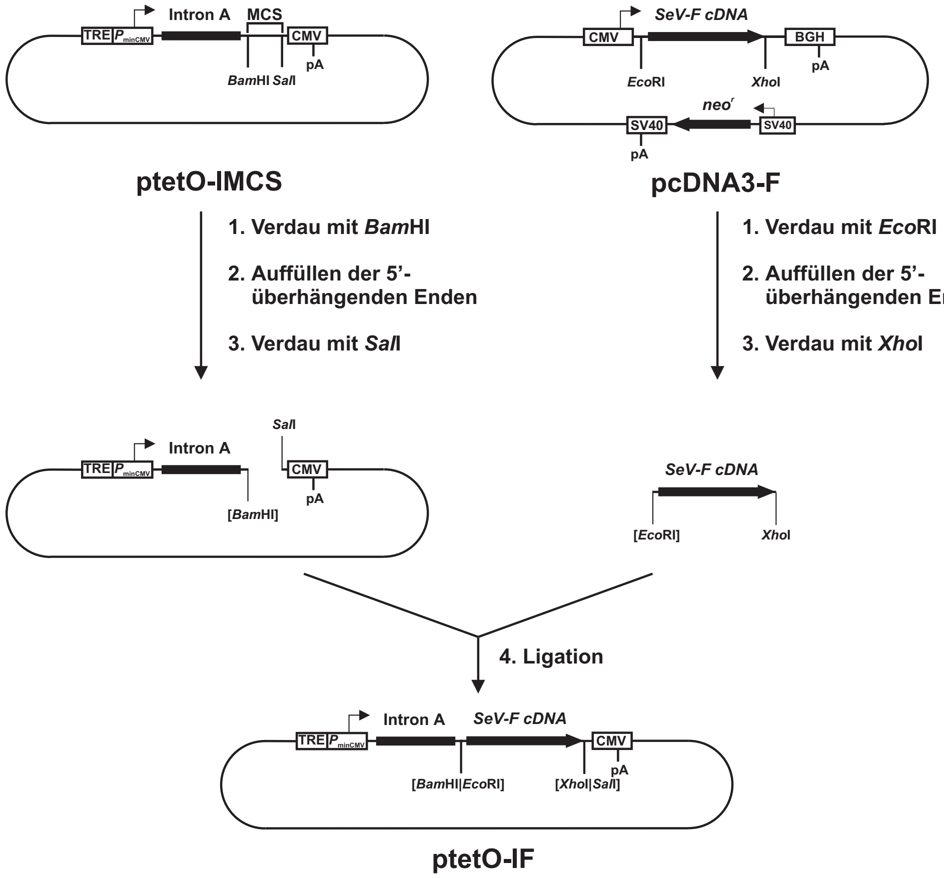

Abbildung 3.13: Klonierung des Tetracyclin-responsiven SeV-F Expressionsplasmids ptetO-IF.

gation eingefügt. In Abbildung 3.14 ist die Klonierungsstrategie schematisch dargestellt.

3.2 Etablierung eines ASGP-R restringierten retroviralen Gentransfer-Systems

3.2.1 Generierung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen mit Hilfe eines SeV-F cDNA codierenden retroviralen Vektors

Bei dem retroviralen Vektor pLFSN (Spiegel, 1995) handelt es sich um ein pLXSN-Derivat, der neben dem Neomycin-Resistenzgen noch die SeV-F cDNA enthält. Die Expression der SeV-F cDNA erfolgt dabei unter der Kontrolle des retroviralen 5' LTRs. Nach Transfektion dieses Vektors in geeignete Verpackungszellen sollte es zur Bil-

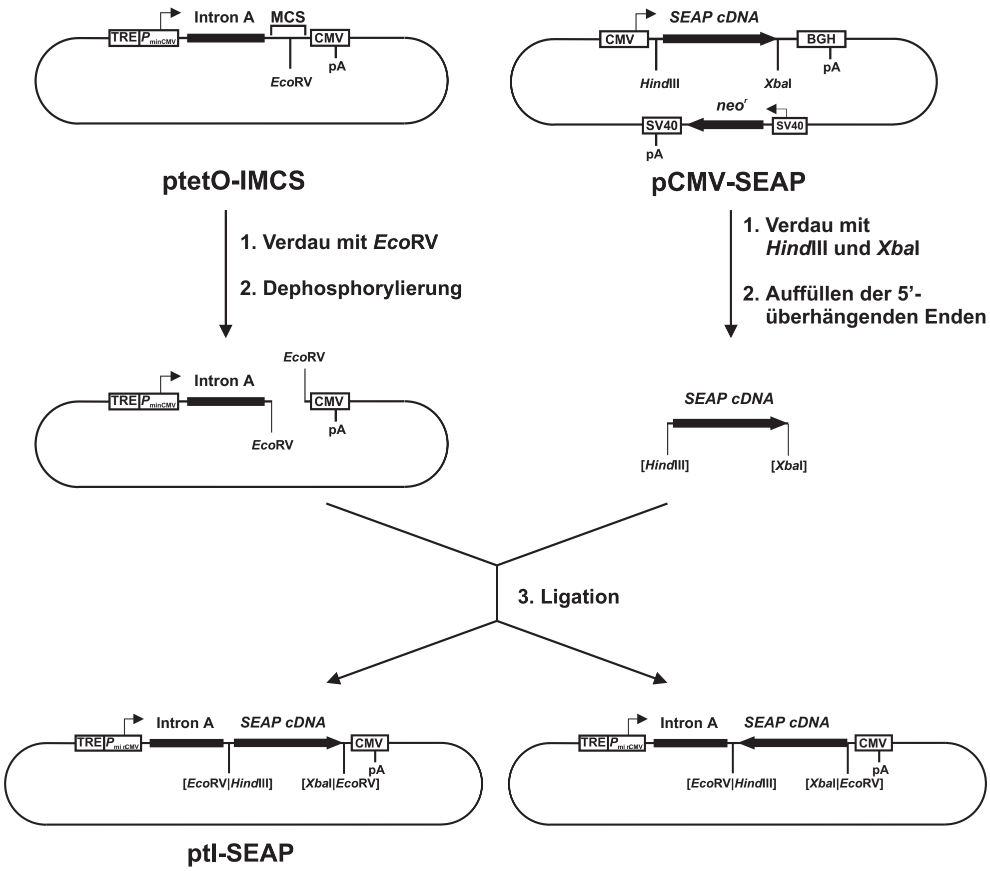

Abbildung 3.14: Klonierung des Tetracyclin-responsiven SEAP Expressionsplasmids ptI-SEAP.

dung von transduktionskompetenten Retroviruspartikeln und zur Expression der SeV-F cDNA kommen. Bei einem Einbau des F-Proteins in die retrovirale Hülle sollte die Transduktion von ASGP-R exprimierenden Zellen möglich sein. Als Positivkontrolle wurde der retrovirale Vektor pLGSN (Spiegel, 1995) eingesetzt, der anstelle der SeV-F cDNA die VSV-G cDNA enthält. Da sich Retroviren sehr gut mit VSV-G Protein pseudotypisieren lassen, sollte dieses Experiment Aufschluß über die Machbarkeit des gewählten Ansatzes ergeben. Vorteil dieses Ansatzes ist der Einsatz eines einzigen Plasmids zur Transfektion, was im Vergleich zu Cotransfektionen Vorteile bezüglich der Transfektionseffizienz ergeben sollte. Zur Generierung der Virusüberstände wurden jeweils 5×10^5 Zellen der Verpackungszellinie PE501 mit 10 µg pLGSN bzw. pLFSN transfiziert (Calcium-Phosphat Methode, siehe 2.3.3.1). 24 h nach Transfektion wurde das reguläre Medium (DMEM + 10 % FCS) durch DMEM + 1 % Nutridoma ersetzt, um Serum-freien Virusüberstand zu erhalten. Die Abwesenheit von Serum war notwendig, um eine Aktivierung der Fusionseigenschaften des SeV-F Proteins durch Spaltung mit acetyliertem Trypsin durchführen zu können (siehe 2.4.1.2). 12 h nach

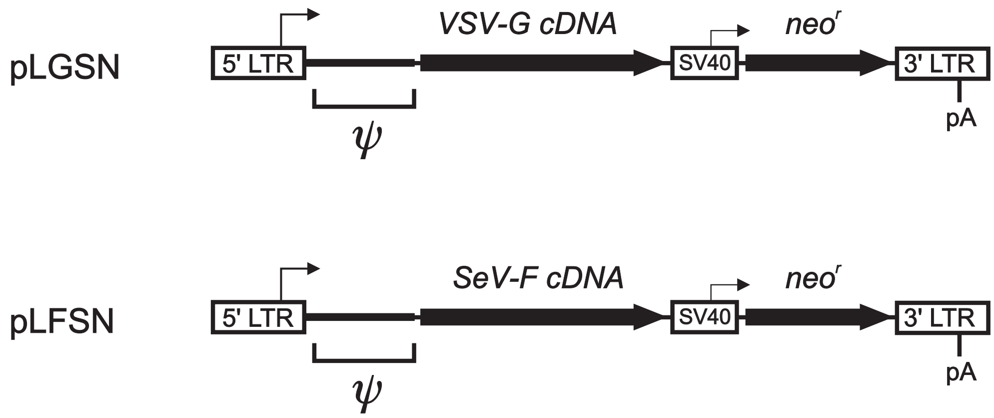

Abbildung 3.15: Schema der retroviralen Vektoren pLGSN und pLFSN. Nur der für die Retrovirus-Bildung wichtige Teil der Plasmide ist dargestellt. Die Expression der Virushüllproteine erfolgt unter der Kontrolle des retroviralen LTR.

diesem Mediumwechsel erfolgte die Ernte der Virusüberstände. Nach Behandlung der Überstände mit acetyliertem Trypsin erfolgte dann die Transduktion geeigneter Zielzellen (siehe 2.4.4.5). Zum Nachweis der Bildung von MoMLV(VSV-G)-Pseudotypen wurden Transduktionen der Hamsternierenzellinie BHK-21 durchgeführt, da diese nicht durch ecotropes Retrovirus aber durch VSV infizierbar ist (Gazdar et al., 1977). Zum Nachweis von MoMLV(SeV-F) Pseudotypen wurden Transduktionen der ASGP-R exprimierenden humanen Hepatomzellinie HepG2 durchgeführt. Aufgrund der Interaktion von SeV-F und dem ASGP-R sollte es daher zum erfolgreichen Gentransfer in die HepG2 Zellen kommen, die ebenfalls einer Infektion mit ecotropem Retrovirus nicht zugänglich sind. Allerdings führte weder die Transfektion der ecotropen Verpackungszelllinie PE501 mit pLGSN noch die Transfektion der gleichen Verpackungszellinie mit pLFSN zu Virusüberständen, mit denen eine Transduktion von BHK-21- bzw. HepG2-Zellen möglich gewesen wäre. Da bereits die Bildung von MoMLV(VSV-G)-Pseudotypen scheiterte, liegt der Schluß nahe, daß die Expression unter Kontrolle des retroviralen 5' LTR nicht ausreichte, um die für die Pseudotypisierung benötigte Menge an heterologem Virus-Hüllprotein bereitzustellen. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß eine Kultivierung von pLGSN-transfizierten Verpackungszellen (unter kontinuierlicher Selektion mit G418) über einen längeren Zeitraum möglich war. Dagegen führt eine starke Expression von VSV-G bekanntermaßen innerhalb eines Zeitraums von zwei bis drei Wochen zu Zellfusionen und einem Absterben der VSV-G exprimierenden Zellen (Burns et al., 1993; Zhang & Ghosh, 1994).

3.2.2 Generierung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen durch Cotransfektion

Da die Expression heterologer Virushüllproteine unter Kontrolle des MoMLV 5' LTR sich als nicht ausreichend für die Pseudotypbildung erwies, wurde als Alternative der folgende Ansatz gewählt: Die Expression des heterologen Hüllproteins sollte über ein separates Konstrukt erfolgen, bei dem die jeweilige cDNA unter Kontrolle des hCMV-IE-Promotors steht. Dieser führt in einer ganzen Reihe von Zelltypen zu einer sehr starken Expression (Foecking & Hofstetter, 1986). Zusätzlich wird noch ein retroviraler Vektor cotransfiziert über den ein verpackungsfähiges, rekombinantes Retrovirus-Genom bereitgestellt wird. In Abbildung 3.16 ist die Vorgehensweise schematisch dargestellt.

Je 5 µg Expressionsplasmid und 5 µg retroviraler Vektor wurden (wie unter 2.3.3.1 beschrieben) zur Calcium-Posphat-vermittelten Transfektion von 5×10^5 Verpackungszellen eingesetzt. 24 h nach Transfektion wurden die Verpackungszellen zum Sammeln der sezernierten Viruspartikel mit FCS-freiem Medium versetzt, das 1 % Nutridoma als Serum-Ersatz enthielt. Damit war es möglich, SeV-F Protein mit acetyliertem Trypsin zu spalten und so in den fusionsaktiven Zustand zu überführen (siehe 2.4.1.2). Die erhaltenen virushaltigen Zellkulturüberstände (siehe 2.4.4.5) wurden zur Transduktion (siehe 2.4.4.7) der Zielzellen eingesetzt. Unmittelbar vor Zugabe von Polybrene bzw. der Transduktion der Rezipientenzellen erfolgte die Behandlung der retroviralen Überstände mit 1 µg/ml acetyliertem Trypsin für 30 min bei 37 °C. Als Zielzellen wurden NIH 3T3-, BHK-21- und HepG2-Zellen verwendet. Die viralen Titer wurden über G418-Selektion ermittelt (siehe 2.4.4.7.1). Hierbei wurden folgende G418-Konzentrationen[8] eingesetzt: NIH 3T3: 600 µg/ml, BHK-21: 600 µg/ml, HepG2: 1000 µg/ml. Analog wurde – als Positivkontrolle – versucht, durch Cotransfektion von PE501-Zellen mit pcDNA3-G und pLXSN MoMLV(VSV-G)-Pseudotypen herzustellen. Als Negativkontrolle diente die Cotransfektion von pLXSN und dem leeren Expressionsplasmid pcDNA3. Tabelle 3.1 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Die erfolgreiche Transduktion von NIH 3T3-Zellen in allen Ansätzen zeigt, daß jeweils die Bil-

[8]Die notwendigen Konzentrationen waren zuvor durch Kultivierung nicht-transduzierter Zellen in G418-Medium (mit G418-Konzentrationen von 100–1000 µg/ml) ermittelt worden. Als geeignete G418-Konzentration für Selektionen wurde jeweils diejenige gewählt, bei der die Zellen vollständig abstarben, zuzüglich einer Reserve von 100 µg/ml.

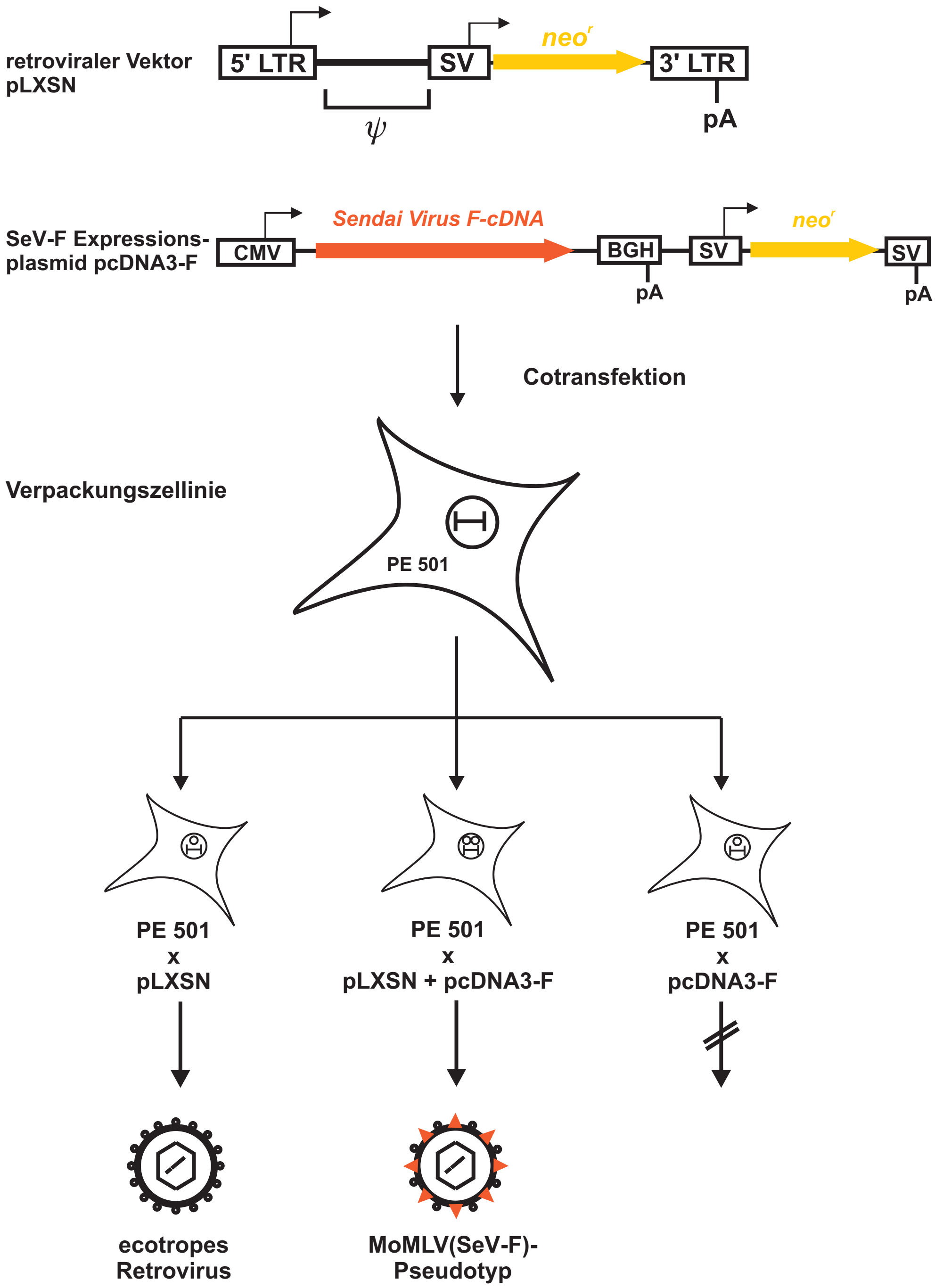

Abbildung 3.16: Generierung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen durch Cotransfektion der Plasmide pLXSN und pcDNA3-F. Die Darstellung der Plasmide beschränkt sich auf die für die Expression des heterologen Hüllproteins bzw. die für die Transkription des retroviralen Genoms relevanten Abschnitte. Gelangen beide Konstrukte nach Cotransfektion in die Verpackungszellen, so kann es sowohl zur Expression des SeV-F Proteins als auch zur Bildung des verpackungsfähigen Retrovirusgenoms kommen. Damit sind die Voraussetzungen für die Bildung von retroviralen Pseudotyppartikeln gegeben.

Tabelle 3.1: Generierung von MoMLV-Pseudotypen durch transiente Cotransfektion von Verpackungszellen.

Expressions-Plasmid	Virus-Titer (10^2 cfu/ml) auf Zellen[a]		
	NIH 3T3 (A–/E+)	BHK-21 (A–/E–)	HepG2 (A+/E–)
pcDNA3	19,0	0,0	0,0
pcDNA3-G	6,0	1,8	n. d.[b]
pcDNA3-F	2,4	0,0	1,0

[a]A+: ASGP-R positiv, A–: ASGP-R negativ, E+: Rec-1 positiv, E–: Rec-1 negativ, (Rec-1: ecotroper Rezeptor); alle drei Zellinien sind VSV-G Rezeptor positiv

[b]n. d.: nicht durchgeführt

dung funktioneller, ecotroper, rekombinanter Retroviren erfolgte. Erwartungsgemäß führte die Cotransfektion von pLXSN und dem leeren Expressionsplasmid pcDNA3 nur zur Bildung ecotroper Retroviren, so daß lediglich Rec-1-exprimierende NIH 3T3-Zellen transduziert werden konnten. Die Transduktion von BHK-21-Zellen im Falle der Cotransfektion mit pLXSN und pcDNA3-G zeigt, daß es zum Einbau von VSV-G in die retrovirale Hülle gekommen sein muß, da eine Transduktion der BHK-21-Zellen nur über den VSV-G Rezeptor möglich ist (BHK-21 Zellen exprimieren *nicht* Rec-1, den ecotropen Rezeptor). Damit hatte sich die Methode der transienten Cotransfektion eines retroviralen Vektors zusammen mit einem Virus-Hüllprotein Expressionsplasmid als geeginet für die Generierung von gemischten (d. h. das retrovirale *env*-Protein *und* das heterologe Hüllprotein enthaltenden) Pseudotypen erwiesen. Auch die Cotransfektion von pLXSN und pcDNA3-F führte zu funktionellen MoMLV-Pseudotypen. Als Nachweis diente die Transduktion von HepG2-Zellen. Diese humane Hepatomzellinie (siehe 2.3.1) läßt sich durch ecotrope Retroviren nicht transduzieren, da der entsprechende Rezeptor (Rec-1) von humanen Zellen nicht exprimiert wird. Eine Transduktion ist daher nur möglich, wenn in die retrovirale Hülle das SeV-F Protein eingebaut wurde, dieses somit eine Interaktion von Virushülle und ASGP-R ermöglicht und diese Interaktion auch zur Aufnahme der Viruspartikel in die Zielzellen führt. Die Transduktion der HepG2-Zellen mit dem Überstand der mit pLXSN und pcDNA3-F cotransfizierten Verpackungszellen (PE501) erwies sich tatsächlich als erfolgreich, wobei ein Titer von $1{,}0 \times 10^2$ cfu/ml erreicht wurde. Die Titer auf NIH 3T3-Zellen waren etwas höher, lagen aber in der gleichen Größenordnung ($2{,}4 \times 10^2$ cfu/ml); Rec-1 und ASGP-R negative BHK-21-Zellen dagegen konnten mit MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen nicht transduziert werden. Damit war erstmals die Generierung von MoMLV-Pseudotypen gelungen, deren Hülle das Fusionsprotein des Sendai Virus enthält. Weiterhin ergab sich, daß diese Pseudotyp-Viren sowohl den ecotropen Rezeptor Rec-1 als auch den ASGP-R für die Aufnahme in Zielzellen nutzen können.

3.2.3 Generierung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen mit Hilfe einer modifizierten Verpackungszellinie

3.2.3.1 Generierung einer stabil SeV-F exprimierenden Verpackungszellinie

Im nächsten Schritt wurde versucht, die ecotrope Verpackungszellinie PE501 dahingehend zu modifizieren, daß neben den retroviralen Strukturproteinen zusätzlich das SeV-F Protein stabil exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden 5×10^5 PE501-Zellen (wie unter 2.3.3.2 beschrieben) mit 3 µg des SeV-F Expressionsplasmids pcDNA3-F transfiziert. Da pcDNA3-F eine neo^r-Expressionskassette enthält (siehe Abbildung 3.6) kann nach Transfektion eine Selektion auf stabil transfizierte Klone mittels G418-Selektion erfolgen. Daher wurden die transfizierten Zellen 48 h nach Transfektion in verschiedenen Konzentrationen in G418-Medium (enthielt 600 µg/ml G418) ausgesät. Nach zwei Wochen kontinuierlicher Selektion wurden die auswachsenden Einzelklone mit Hilfe von Cloning Cylinders (Sigma) geerntet, in die Kavitäten von 24 Well-Platten (Greiner) überführt, weiter mit G418 selektioniert und expandiert. Auf diese Weise wurden 59 Einzelklone gewonnen und vermehrt. Nachdem von jedem Klon genügend Zellmaterial zur Verfügung stand, wurden diese auf ihre Fähigkeit zur Bildung gemischter MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen getestet. Hierzu wurden die Zellen ausgesät und mit je 3 µg des retroviralen Vektors pLXSN (wie unter 2.3.3.2 beschrieben) unter Verwendung von Lipofectamine als Transfektionsreagenz transfiziert. Die Gewinnung des retroviralen Überstandes und die Aktivierung des SeV-F Proteins erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. Als Zielzellen für die Transduktion dienten HepG2-Zellen, wobei eine Transduktion mit den Überständen von 6 der 59 Klone möglich war. Die entsprechenden Klone waren somit in der Lage, neben den retroviralen Strukturgenen auch die SeV-F cDNA zu exprimieren und damit funktionelle gemischte MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen zu bilden. Aufgrund der erreichten Titer wurde für die weiteren Experimente der Klon Nr. 21 (im folgenden als FE21 bezeichnet) ausgewählt.

3.2.3.2 Generierung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen mit Hilfe der Verpackungszellinie FE21

Zunächst wurde überprüft, ob die mit Hilfe des Verpackungszellklons generierten MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen dieselbe Spezifität aufweisen wie Viruspartikel, die durch Cotransfektion von PE501-Verpackungszellen mit dem retroviralen Vektor pLXSN und dem SeV-F Expressionsplasmid pcDNA3-F erzeugt wurden (siehe Abschnitt 3.2.2). Zusätzlich zur Zellinie HepG2 wurde in den Transduktionsexperimenten eine weitere ASGP-R-positive humane Hepatom-Zellinie, HuH7 eingesetzt. Die Generierung der MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen erfolgte mittels Transfektion von FE21-Zellen mit einem retroviralen Vektor, wobei zusätzlich zu pLXSN der Vektor pLZ12 eingesetzt wurde. Die Verwendung des Vektors pLZ12, der das Gen der *E. coli* β-Galactosidase unter Kontrolle des RSV-Promotors enthält, erlaubte die Kontrolle des Transduktionserfolges bereits 48 h nach Transduktion mittels histochemischer Färbung auf β-Galactosidase Expression (siehe 2.4.4.7.2). Tabelle 3.2 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 3.2: Generierung von MoMLV-Pseudotypen mit Hilfe der modifizierten Verpackungszellinie FE21.

Retroviraler Vektor	Detektion	Virus-Titer (10^2 cfu/ml) auf Zellen[a]			
		NIH 3T3 (A–/E+)	BHK-21 (A–/E–)	HepG2 (A+/E–)	HuH7 (A+/E–)
pLXSN	G418-Selektion	5,0	0,0	4,1	3,9
pLZ12	Xgal-Färbung	3,3	0,0	2,0	n. d.[b]

[a] A+: ASGP-R positiv, A–: ASGP-R negativ, E+: Rec-1 positiv, E–: Rec-1 negativ, (Rec-1: ecotroper Rezeptor)

[b] n. d.: nicht durchgeführt

Während BHK-21-Zellen, die weder den ecotropen Rezeptor (Rec-1) noch den ASGP-R exprimieren, einer Transduktion nicht zugänglich waren, erfolgte die Rec-1-vermittelte Transduktion von NIH 3T3-Zellen und die ASGP-R vermittelte Transduktion von HepG2- bzw. HuH7-Zellen mit ähnlicher Effizienz ($5{,}0 \times 10^2$ cfu/ml und $4{,}1 \times 10^2$ cfu/ml bzw. $3{,}9 \times 10^2$ cfu/ml bei Verwendung von pLXSN als retroviralem Vektor bzw. $3{,}3 \times 10^2$ ffu/ml und $2{,}0 \times 10^2$ ffu/ml bei Verwendung von pLZ12 als retroviralem Vektor). Die geringeren Titer bei Verwendung von pLZ12 dürften in erster

Linie darauf zurückzuführen sein, daß pLZ12 fast doppelt so groß wie pLXSN ist (siehe Abbildungen 2.6 und 2.5), zur Transfektion der Verpackungszellinie FE21 aber gleiche Plasmidmengen (jeweils 3 µg) eingesetzt wurden.

3.2.3.3 Transduktion des Zellinienpaares MDCK/M12 als direkter Nachweis der ASGP-R Spezifität von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen

Zur näheren Charaktersierung der Spezifität von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen wurden zwei Zellinien herangezogen, die sich nur hinsichtlich der ASGP-R Expression unterscheiden. Verwendet wurde das unter 2.3.1 beschriebene Zellinienpaar MDCK/M12 (Fuhrer et al., 1993). Als retroviraler Vektor wurde pLXSP eingesetzt, der als Reportergen *pac* enthält (siehe 3.1.1), da M12-Zellen bereits G418-resistent sind. Zur Generierung der entsprechenden MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen wurden $7{,}5 \times 10^5$ FE21-Zellen mit 3 µg pLXSP transfiziert (siehe 2.3.3.2). 24 h nach Transfektion erfolgte der Wechsel von DMEM + 10 % FCS auf Serum-freies Ultra Culture (Bio Whittaker) als Kulturmedium. 12 h später wurde der Virus-haltige Zellkulturüberstand abgenommen und in der bereits mehrfach beschriebenen Weise mit acetyliertem Trypsin behandelt, mit Polybrene versetzt und dann zur Transduktion der Zielzellen eingesetzt. Die Bestimmung des Titers erfolgte mittels Puromycin-Selektion (siehe 2.4.4.7.1), wobei folgende Puromycin-Konzentrationen[9] zur Selektion eingesetzt wurden: NIH 3T3: 5 µg/ml, MDCK: 2 µg/ml, M12: 2 µg/ml. Tabelle 3.3 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 3.3: Transduktion des Zellinienpaares MDCK/M12.

Retroviraler Vektor	Virus-Titer (10^2 cfu/ml) auf Zellen[a]		
	NIH 3T3 (A–/E+)	MDCK (A–/E–)	M12 (A+/E–)
pLXSP	5,5	0,0	7,2

[a] A+: ASGP-R positiv, A–: ASGP-R negativ, E+: Rec-1 positiv, E–: Rec-1 negativ, (Rec-1: ecotroper Rezeptor)

Die Transduktion der Mäusefibroblasten-Zellinie NIH 3T3 diente der Kontrolle der Retrovirusbildung. Der erreichte Titer ($5{,}5 \times 10^2$ cfu/ml) liegt in der gleichen

[9] Die notwendigen Konzentration waren zuvor durch Kultivierung nicht-transduzierter Zellen in Puromycin-Medium (mit Puromycin-Konzentrationen von 1–10 µg/ml) ermittelt worden. Als geeignete Puromycin-Konzentration für Selektionen wurde jeweils diejenige gewählt, bei der die Zellen erstmals vollständig abstarben.

Größenordnung wie bei der Verwendung von pLXSN als retroviralem Vektor ($5{,}0 \times 10^2$ cfu/ml) und zeigt, daß pLXSP zur Generierung von Retroviren mindestens genausogut verwendbar ist wie pLXSN. Dagegen war die Rec-1-negative Zellinie MDCK einer Transduktion nicht zugänglich. Wurden dagegen die stabil den ASGP-R exprimierenden (von MDCK-Zellen abgeleiteten) M12-Zellen als Zielzellen verwendet, wurde ein Titer von $7{,}2 \times 10^2$ cfu/ml erreicht. Da sich MDCK- und M12-Zellen nur in der Expression des ASGP-R unterscheiden, konnte auf diese Weise ein direkter Nachweis der ASGP-R vermittelten Transduktion durch MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen geführt werden.

3.2.3.4 Etablierung einer stabilen MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp Produzentenzellinie

Mit dem retroviralen Vektor pLXSP und der SeV-F exprimierenden Zellinie FE21 standen die Komponenten zur Etablierung einer stabilen MoMLV(SeV]-Pseudotyp-Produzentenzellinie zur Verfügung. Im Gegensatz zu dem unter Abschnitt 2.4.4.6 beschriebenen Verfahren, erfolgte das Einbringen des rekombinanten retroviralen Genoms nicht durch Transduktion, sondern direkt durch Transfektion. Nach Transfektion von FE21-Zellen mit dem retroviralen Vektor pLXSP erfolgte eine *doppelte* Selektion der transfizierten Zellen sowohl auf Puromycin- als auch auf G418-Resistenz (FE21-Zellen sind aufgrund der stabilen Transfektion mit pcDNA3-F G418-resistent, siehe Abschnitt 3.2.3.1). Diese Kombination aus Transfektion und Doppelselektion ist eine leicht abgewandelte Version des Verfahrens nach Wirth et al. (1994) zur Etablierung stabiler Retrovirus-Produzentenzellinien. Mit den Überständen der 27 erhaltenen doppelt resistenten Klone wurden M12-Zellen transduziert, wobei mit Überständen von 6 Klonen eine Transduktion möglich war. Der Klon, mit dessen Überstand der höchste Titer auf M12-Zellen erzielt wurde (im folgenden FELP6 genannt), wurde als Produzentenzellinie für die folgenden Experimente ausgewählt. Zunächst erfolgte die Transduktion von NIH 3T3-, MDCK- und M12-Zellen, um sicherzustellen, daß die generierten Pseudotypen die gewünschte Spezifität aufweisen. Tabelle 3.4 zeigt die erhaltenen Ergebnisse. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die mit Überständen von transient mit pLXSP transfizierten FE21-Zellen erhalten wurden (siehe Tabelle 3.3) zeigt sich, daß die gewünschte Spezifität erhalten geblieben war, gleichzeitig jedoch um den Faktor 10 höhere Titer erreicht werden konnten.

Tabelle 3.4: Transduktion der Zellinien NIH 3T3, MDCK und M12 mit Überständen der MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Produzentenzellinie FELP6.

Retroviraler Vektor	Virus-Titer (10^2 cfu/ml) auf Zellen[a]		
	NIH 3T3 (A–/E+)	MDCK (A–/E–)	M12 (A+/E–)
pLXSP	50	0	73

[a]A+: ASGP-R positiv, A–: ASGP-R negativ, E+: Rec-1 positiv, E–: Rec-1 negativ, (Rec-1: ecotroper Rezeptor)

3.2.3.5 Hemmung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Transduktionen mit Hilfe eines ASGP-R-Antikörpers

Zur Vervollständigung der funktionellen Nachweise bezüglich der Spezifität von MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Transduktionen wurde untersucht, ob und inwieweit eine Hemmung der ASGP-R-vermittelten Transduktionen durch einen spezifischen ASGP-R-Antikörper[10] möglich ist. Zunächst wurde untersucht, ob die Anwesenheit des Antikörpers zu einer unspezifischen Hemmung der retroviral vermittelten Transduktion führt. Zu diesem Zweck erfolgte die Transduktion von NIH 3T3-Zellen mit Überständen der Produzentenzellinie FELP6 mit und ohne Zusatz des ASGP-R-Antiserums. In diesem und allen weiteren Inhibitionsexperimenten wurde das Antiserum in einer Konzentration von 2 mg/ml[11] eingesetzt. Da sich keine Unterschiede in der Transduktionseffizienz ergaben, konnte ein unspezifischer Hemmeffekt ausgeschlossen werden. Da bei 37 °C mit Protein beladene ASGP-R Moleküle schnell internalisiert werden und kurze Zeit später unbeladen wieder zurück zur Zelloberfläche gelangen (Schwartz et al., 1982), wurden die eigentlichen Inhibitionsexperimente bei 4 °C durchgeführt. Vor der Transduktion wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C mit dem ASGP-R Antikörper vorinkubiert, anschließend erfolgte die Transduktion in An- und Abwesenheit des Antikörpers für 1 h bei 4 °C. Tabelle 3.5 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Es ergab sich, daß bei 4 °C eine Transduktion von NIH 3T3-Zellen über den ecotropen Rezeptor überhaupt nicht möglich war. Dagegen verlief die ASGP-R vermittelte Transduktion von M12-Zellen erfolgreich, allerdings mit geringerer Effizienz als bei 37 °C (22×10^2 cfu/ml bei 4 °C im Vergleich zu 73×10^2 cfu/ml bei 37 °C). Die Anwe-

[10]Polyklonales ASGP-R Antiserum wurde freundlicherweise von G. Ashwell zur Verfügung gestellt.

[11]Diese Konzentration bezieht sich auf die Gesamtproteinmenge im Antiserum, nicht auf den Antikörper selbst.

Tabelle 3.5: Hemmung der MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Transduktionen mit Hilfe eines ASGP-R-Antikörpers

ASGP-R Antikörper	Virus-Titer (10^2 cfu/ml) auf Zellen[a]	
	NIH 3T3 (A–/E+)	M12 (A+/E–)
–	0	22
+	0	4

[a]A+: ASGP-R positiv, A–: ASGP-R negativ, E+: Rec-1 positiv, E–: Rec-1 negativ, (Rec-1: ecotroper Rezeptor)

senheit des Antikörpers führte zu einer Hemmung der Transduktion von M12-Zellen, wobei das Ausmaß der Hemmung mehr als 80 % betrug (4×10^2 cfu/ml mit Antikörper im Vergleich zu 22×10^2 cfu/ml ohne Antikörper). Die spezifische Hemmung des ASGP-R führt also zu einer spezifischen Hemmung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Transduktionen, was als zusätzlicher Nachweis der in vorangegangenen funktionellen Nachweisen beobachteten ASGP-R Spezifität zu werten ist.

3.3 Nachweis der SeV-F Expression in retroviralen Verpackungs- und Produzentenzellen

Zusätzlich zu den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen funktionellen Nachweisen der Bildung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen wurde die Verpackungszellinie FE21 sowie die Produzentenzellinie FELP6 bezüglich der Expression von SeV-F charakterisiert. Hierbei wurde sowohl die Transkriptionsebene (mittels RT-PCR) als auch die Proteinebene (mittels Western-Blotting) in die Charakterisierung einbezogen.

3.3.1 Nachweis von SeV-F auf Transkriptionsebene: RT-PCR

Zunächst erfolgte nach der unter 2.2.12 beschriebenen Methode die Isolierung der Gesamt-RNA. Nach der spektrometrischen Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.13) wurden die Proben auf die gleiche Konzentration eingestellt. Danach erfolgte unter Verwendung von je 2 µg Gesamt-RNA pro Ansatz die reverse Transkription (siehe

2.2.14.2). Je 9 µl der RT-Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl je Ansatz unter Verwendung von 1,5 mM $MgCl_2$ und Lösung Q (Qiagen) als Spezifitätsverstärker zur Amplifikation der erzeugten cDNA eingesetzt (siehe 2.2.14.3). Als Primer für die Amplifikation eines 619 bp großen SeV-F cDNA-Fragments wurden unter Verwendung der publizierten Sequenz für SeV-F (Sequenz ID PAMSNDFP, Datenbank der European Molecular Biology Laboratories, EMBL, Heidelberg) mit Hilfe des HUSAR-Programmes PRIMER (siehe 2.2.14.1) folgende Primer[12] ausgewählt:
„forward“ Primer:
`5′ TTGTGTTGAGTCCAGATTGACC 3′`
„reverse“ Primer:
`5′ ATATGTGTCCCTCGGTATACGG 3′`
In Kontrollansätzen wurde ein 215 bp großes Fragment der Maus-Histon 3.3a cDNA (Sequenz ID MMZ857050, Datenbank der European Molecular Biology Laboratories, EMBL, Heidelberg) amplifiziert, wobei folgende Primer verwendet wurden:
„forward“ Primer:
`5′ CCACTGAACTTCTGATCCGC 3′`
„reverse“ Primer:
`5′ GCGTGCTAGCTGGATATCTT 3′`
Histon 3.3a zur Kontrollamplifikation wurde gewählt, da es eine starke und sehr konstante Expression aufweist. Die Amplifikation des SeV-F cDNA-Fragments erfolgte in 44 Zyklen, die des Maus-Histon 3.3a cDNA-Fragments in 26 Zyklen mit den unter 2.2.14.3 angegebenen Parametern. Aliquots der Amplifikationsansätze wurden im 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Weiterhin wurden die SeV-F cDNA Amplifikationsprodukte einer Restriktionsanalyse unterzogen und die so erzeugten Fragmente im 3,5 % Agarosegel (New Sieve, FMC BioProducts) aufgetrennt. Für den Verdau mit *Hae*III wurden bei vorangegangener spezifischer Amplifikation zwei Fragmente der Größe 418 bp und 201 bp erwartet, bei Verdau mit *Mun*I sollten zwei Fragmente der Größe 354 bp und 265 bp entstehen. Abbildung 3.17 zeigt die erhaltenen Ergebnisse. Die Amplifikation mit den SeV-F spezifischen Primern ergab das erwartete 619 bp große Amplifikationsprodukt, das in den durchgeführten Restriktionsverdau-Ansätzen die erwarteten Fragmente ergab. Da in den Amplifikationen ohne vorangegangene reverse Transkription kein Signal auftrat (d. h. die eingesetzte Gesamt-RNA frei von DNA-Kontaminationen war), konnte somit die SeV-F Expression auf RNA-Ebene eindeu-

[12]Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Life Technologies.

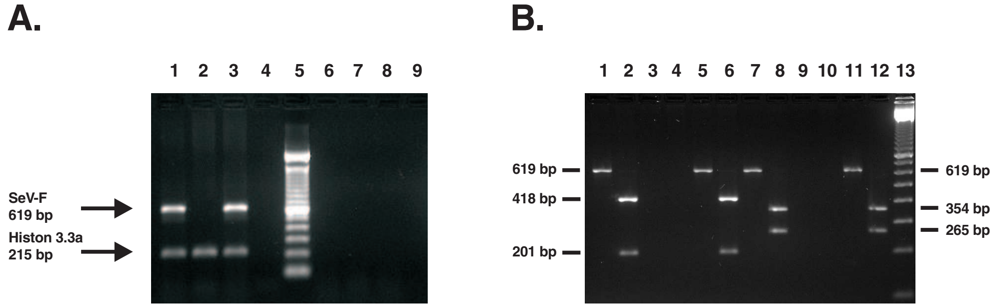

Abbildung 3.17: Nachweis der SeV-F Expression in FE21- und FELP6-Zellen mittels RT-PCR. **A.** Spuren 1–3: Reverse Transkription und Amplifikation der SeV-F cDNA ausgehend von Gesamt-RNA. 1, FE21; 2, PE501; 3 FELP6; 4, Leerspur; 5, 100 bp DNA-Leiter; 6, Leerspur; Spuren 7–9: Amplifikation ohne vorangegangene reverse Transkription: 7, FE21; 8, PE501; 9, FELP6. Die Amplifikationen ohne vorangegangene reverse Transkription wurden durchgeführt, um die Gesamt-RNA auf eventuelle Verunreinigungen mit DNA zu überprüfen. Die in allen Spuren gleichzeitig aufgetragenen (aber separat amplifizierten) Histon 3.3a-Ansätze dienten zum einen als Ladekontrolle, zum anderen lieferten sie einen Anhaltspunkt für die Stärke der SeV-F Expression. **B.** Restriktionsverdau-Ansätze zur Charakterisierung des amplifizierten SeV-F cDNA-Fragments. 1, FE21 unverdaut; 2, FE21 *Hae*III-verdaut; 3, PE501 unverdaut; 4, PE501 *Hae*III-verdaut; 5, FELP6 unverdaut; 6, FELP6 *Hae*III-verdaut; 7, FE21 unverdaut; 8, FE21 *Mun*I-verdaut; 9, PE501 unverdaut; 10, PE501 *Mun*I-verdaut; 11, FELP6 unverdaut; 12, FELP6 *Mun*I-verdaut; 13, 100 bp DNA-Leiter.

tig nachgewiesen werden. Interessant bezüglich der Expressionsstärke ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich mit den Histon 3.3a-Amplifikationsansätzen. Bei dem in Abbildung 3.17A gezeigten Gel waren die Auftragsmengen so gewählt worden, daß sich ungefähr gleiche Mengen des SeV-F cDNA-Fragments und des Histon 3.3a cDNA-Fragments in den entsprechenden Spuren befinden (die schwächere Färbung des kürzeren Histon 3.3a Amplifikationsprodukts ist auf die Größenabhängigkeit der Ethidiumbromid-Färbung zurückzuführen). Die Tatsache, daß im Falle des SeV-F Amplifikationsprodukts 44 Zyklen, im Falle des Histon 3.3a Amplifikationsprodukts aber lediglich 26 Zyklen benötigt wurden, um äquivalente Signale zu erhalten, zeigt, daß SeV-F im Vergleich zu Histon 3.3a in den untersuchten Zellinien FE21 und FELP6 sehr viel schwächer exprimiert wird.

3.3.2 Nachweis von SeV-F auf Proteinebene: Western Blotting

Der Nachweis des SeV-F Proteins gestaltete sich unerwartet schwierig, wobei sich im Laufe der Experimente mehrere Faktoren als problematisch erwiesen:

- Die geringen SeV-F Proteinmengen, die sich bereits im mittels RT-PCR nachgewiesenen niedrigen SeV-F Expressionsniveau angedeutet hatten (siehe 3.3.1).
- Der zur Detektion des SeV-F Proteins zur Verfügung stehende Antikörper mAk 48-F erwies sich als relativ unempfindlich.
- Auch der Einsatz großer Proteinmengen (bis zu 150 µg pro Spur) reichte für eine konventionelle Detektion nicht aus.

3.3.2.1 Konventioneller Western Blot

Zunächst wurde mittels konventionellem Western Blotting (wie in den Abschnitten 2.5.5 bis 2.5.6.2 beschrieben) versucht, das SeV-F Protein in SeV-F exprimierenden Zellen zu detektieren. Dabei wurden zum einen Proteinproben, die nach verschiedenen Verfahren gewonnen wurden (siehe 2.5.1), zum anderen unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt (10–150 µg Protein je Spur). Es konnte jedoch unabhängig von Aufarbeitungsmethode und eingesetzter Proteinmenge nur bei Proben, die aus SeV-Wildtypvirus infizierten Zellen gewonnen worden waren (bei denen also eine starke SeV-F Expression vorlag), das SeV-F Protein detektiert werden. Auch die Variation der eingesetzten Mengen an primärem und sekundärem Antikörper sowie der Inkubationszeiten ergaben keine entscheidende Verbesserung der Empfindlichkeit.

3.3.2.2 Erhöhung der Empfindlichkeit durch vorgeschaltete Immunpräzipitation und Deglycosylierung

Da im konventionellen Western Blot eine eindeutige Detektion des SeV-F Proteins nicht möglich war, wurde versucht, die Empfindlichkeit durch Immunpräzipitation und Deglycosylierung zu erhöhen. Während die Immunpräzipitation der Aufkonzentrierung des zu detektierenden Proteins dient, werden durch die Deglycosilierung alle Varianten eines Glycoproteines durch Abbau der Zuckerseitenketten auf die nicht-glycosylierte Form zurückgesetzt (Vereinheitlichung des zu detektierenden Signals). Hierzu wurde mit Zellaufschlüssen der Zellinien FE21 und PE501 (als Negativkontrolle) sowie SeV-infizierten PE501-Zellen (als Positivkontrolle) wie unter 2.5.3 beschrieben eine Immunpräzipitation unter Verwendung des Antikörpers mAk 48-F durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Deglycosylierung der Ansätze mit PNGase F (siehe

2.5.4). Nach der elektrophoretischen Auftrennung (siehe 2.5.5) der Proben und dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membran (siehe 2.5.6.1) erfolgte die eigentliche Detektion wie unter 2.5.6.2 beschrieben. Als primärer Antikörper wurde hierbei mAk 48-F in einer 1 : 20 Verdünnung eingesetzt, als sekundärer Antikörper diente ein mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter anti-Maus Antikörper (Amersham) in einer 1 : 4000 Verdünnung. Abbildung 3.18 zeigt das erhaltene Ergebnis. Im Vergleich zu SeV-infi-

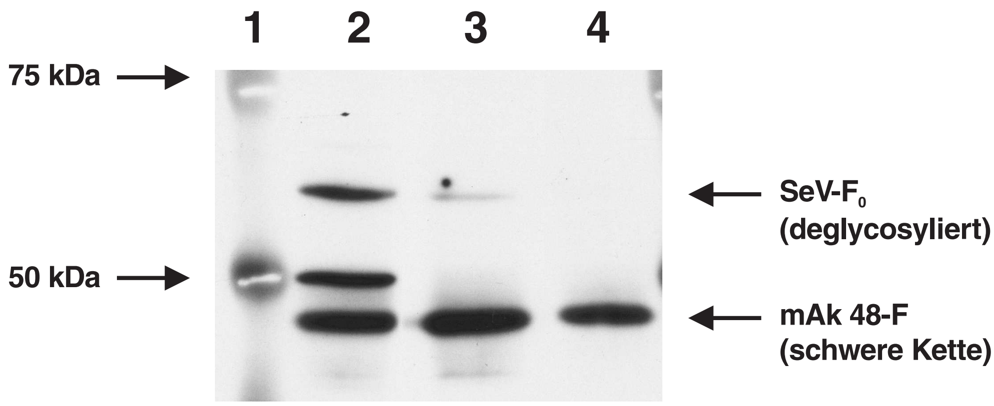

Abbildung 3.18: Nachweis der SeV-F Expression mittels Western Blotting. Spur 1: Protein-Molekulargewichtsstandard (Rainbow-Marker, Amersham); Spur 2: PE501, infiziert mit SeV (Positivkontrolle); Spur 3: FE21; Spur 4: PE501 (Negativkontrolle). Da sowohl bei der Immunpräzipitation als auch beim Western Blotting derselbe Antikörper verwendet wurde (mAk 48-F), wird in allen Spuren die schwere Kette dieses Antikörpers detektiert.

zierten Zellen (Spur 2) war das SeV-F_0 Signal, das man für die stabil mit pcDNA3-F transfizierten FE21-Zellen erhielt, sehr viel schwächer jedoch eindeutig vorhanden, während bei der Ausgangszellinie kein Signal auftrat. Damit war der Nachweis von SeV-F auch auf der Proteinebene gelungen. Dieses Ergebnis korrespondiert mit dem der RT-PCR (siehe 3.3.1); hier konnte ebenfalls eine – wenn auch niedrige – SeV-F Expression detektiert werden.

3.4 Optimierung der SeV-F/ASGP-R vermittelten Transduktion

Bei der Optimierung wurde zum einen versucht, die Expression des SeV-F Proteins in retroviralen Verpackungszellen zu erhöhen, zum anderen wurde der Versuch unternommen, die Ansteuerung des ASGP-R als Zielzellrezeptor zu verbessern.

3.4.1 Generierung einer stabilen ecotropen Retrovirus-Produzentenzellinie

Um bei der Optimierung der SeV-F Expression auf ein System mit konstanter und verläßlicher Retrovirus-Produktion zurückgreifen zu können, wurde zunächst eine stabile Retrovirus-Produzentenzellinie etabliert. Dies erfolgte nach dem unter 2.4.4.6 beschriebenen Verfahren. Zunächst wurde durch Transfektion der amphotropen Verpackungszellinie PA317 mit dem retroviralen Vektor pLZ12 ein transienter Retrovirus-Produzent erzeugt, mit dessen Überstand ecotrope PE501-Verpackungszellen transduziert wurden. Die nach der Transduktion mittels G418-Selektion erhaltenen Klone wurden expandiert und zunächst auf ihre Fähigkeit zur Expression der β-Galactosidase überprüft. Mit den Überständen einiger exemplarisch ausgewählter Klone wurden zusätzlich NIH 3T3-Zellen transduziert. Hierbei ergab sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression der β-Galactosidase in den Produzenten-Zellklonen und den auf den Rezipientenzellen erreichten Titern. Daraufhin wurde der Zellklon mit der stärksten β-Galactosidase Expression[13] nochmals einer G418-Selektion unterworfen und die erhaltenen Subklone erneut auf ihre Fähigkeit zur Expression der β-Galactosidase überprüft. Mit Überständen des Klons mit der stärksten Expression (im folgenden als PELZ16/5 bezeichnet) wurden auf NIH 3T3-Zellen Titer im Bereich von $1–5 \times 10^5$ ffu/ml erreicht. Hierbei blieb die Fähigkeit zur Retrovirus-Produktion über mehr als 25 Zellpassagen uneingeschränkt erhalten. Die generierte Zellinie PELZ16/5 stellte somit den gewünschten stabilen Retrovirus-Produzenten dar.

3.4.2 Versuche zur Erhöhung der Pseudotyp-Titer durch Steigerung der SeV-F Expression

3.4.2.1 Expression des SeV-F Proteins mit Wildtyp-Signalsequenz

Wie bereits in Abschnitt 3.1.2.4 dargestellt, wies die zur Verfügung stehende SeV-F cDNA (abgeleitet vom SeV-F Gen des SeV-Stammes *Fushimi*) im Bereich der Signalsequenz eine – sich auch auf Proteinebene auswirkende – Punktmutation auf. Da nicht

[13] Mit starker Expression ist in diesem Zusammenhang in erster Linie gemeint, daß möglichst *viele* Zellen einer G418-resistenten, klonalen Population beim histochemischen Nachweis der β-Galctosidase eine positive Reaktion zeigen.

ausgeschlossen werden konnte, daß sich die Veränderung im Signalpeptid negativ auf die Expression und/oder auf den Transport des F-Proteins zur Zelloberfläche auswirkt, wurde diese Punktmutation wieder rückgängig gemacht (siehe 3.1.2.4). Das auf diese Weise erhaltene SeV-F Expressionsplasmid pcF$_{WT}$PUR wurde sowohl für transiente als auch stabile Transfektionen der Retrovirus-Produzentenzellinie PELZ16/5 eingesetzt. Allerdings gelang es mit diesen Ansätzen nicht, funktionelle MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen zu generieren, d. h. es konnte kein retroviraler Überstand erzeugt werden, mit dem eine Transduktion ASGP-R positiver Zellinien möglich war. Da jedoch eine Transduktion Rec-1-positiver NIH 3T3-Zellen möglich war, konnte ein Verlust der Fähigkeit zur Bildung von Retroviren nach Transfektion des Expressionsplasmids ausgeschlossen werden.

3.4.2.2 Steigerung der SeV-F Expression durch Erhöhung der Transkriptmenge und Stabilisierung des gebildeten Transkripts

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, die SeV-F Expression durch Erhöhung der Transkriptmenge und durch Stabilisierung des gebildeten Transkripts zu steigern. Als SeV-F Expressionskonstrukte wurden hierbei die Expressionsplasmide pI.18-F und pUC29-IF-Zeo (Fischer, 1998) eingesetzt. Diese Vektoren enthalten das Intron A des hCMV (Stamm *Towne*), das Enhancer-Bindungstellen enthält und die gebildete mRNA stabilisieren soll (Chapman et al., 1991). In Abbildung 3.4.2.2 sind die verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt.

Die transiente Transfektion von PELZ16/5 Retrovirus-Produzentenzellen mit pI.18-F führte jedoch nicht zur Bildung funktioneller MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen. Um mangelnde Transfektionseffizienz als Ursache auszuschließen, wurden zusätzlich Phoenix-Eco Verpackungszellen (die von der sehr gut transfizierbaren humanen Zellinie 293 abgeleitet sind, siehe Abschnitt 2.4.4.4) mit dem retroviralen Vektor pLXSN bzw. pLZ12 und dem SeV-F Expressionsplasmid pI.18-F cotransfiziert und der so erzeugte retrovirale Überstand zur Transduktion Rec-1-negativer, ASGP-R exprimierender Zellen (HepG2 bzw.M12) verwendet. Auch in diesem Fall war eine Transduktion nicht möglich, so daß mangelnde Transfektionseffizienz als Ursache für die fehlende MoMLV(SeV-F)-Pseudotypbildung ausgeschlossen werden konnte. Parallel zu den transienten Transfektionsexperimenten wurden PELZ16/5 und Phoenix-Eco stabil mit

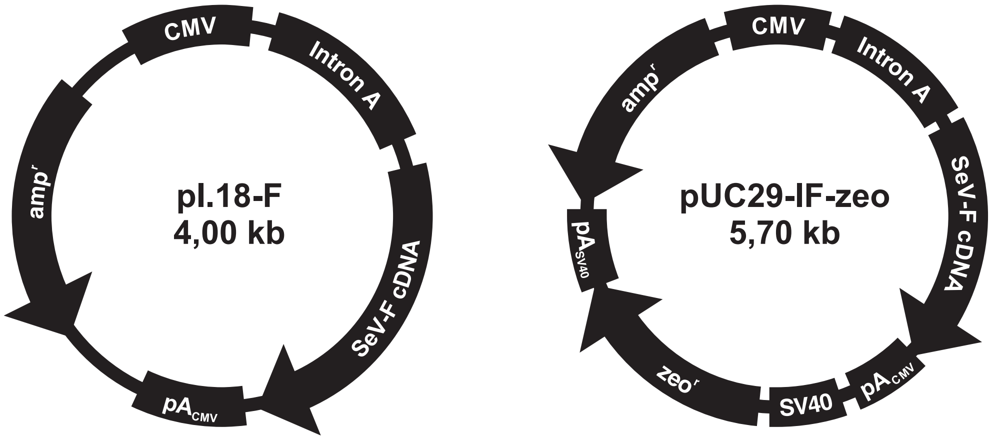

Abbildung 3.19: Aufbau der Plasmide pI.18-F und pUC29-IF-zeo. Beide Plasmide enthalten zur Steigerung der SeV-F Expression das Intron A. pUC29-IF-zeo enthält zusätzlich noch eine Zeocin-Resistenz Expressionskassette, die eine Etablierung stabiler Klone nach Transfektion des Plasmids mittels Zeocin-Selektion erlaubt.

pUC29-IF-zeo transfiziert.[14] Auf diese Weise konnten Klone von beiden Zellinien gewonnen werden, bei denen mittels RT-PCR (analog der in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Vorgehensweise) ein Nachweis der SeV-F mRNA möglich war. Allerdings verlief auch bei diesen Zellen der funktionelle Nachweis durch Transduktion ASGP-R exprimierender Zellinien negativ. Um auszuschließen, daß im Falle der von Phoenix-Zellen abgeleiteten Klone im funktionellen Nachweis eine mögliche terminale Glycosylierung des SeV-F Proteins mit Sialinsäure die Erkennung durch den ASGP-R verhindert, wurden Virusüberstände, die nach Transfektion der Klone mit pLXSN oder pLZ12 gewonnen wurden, vor der Transduktion der Zielzellen mit *Vibrio cholerae* Neuraminidase behandelt. Hierbei wurden die Virusüberstände mit Enzymaktivitäten von 1–20 mU für 30–60 min bei 37 °C vor der Transduktion inkubiert. Allerdings scheiterte auch mit diesen vorbehandelten Virusüberständen der Versuch, ASGP-R exprimierende Zellen zu transduzieren.

3.4.2.3 Verwendung eines Tetracyclin-regulierbaren SeV-F Expressionssystems

Da aufgrund der bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse die Wahrscheinlichkeit bestand, daß eine starke, konstitutive SeV-F Expression cytotoxisch ist, wurde

[14]Zur Selektion nach Transfektion wurden 200 µg/ml Zeocin (Invitrogen) eingesetzt

ein System etabliert, bei der die SeV-F Expression reguliert werden kann. Zu diesem Zweck wurden zunächst – wie in Abschnitt 3.1.2.5 beschrieben – die notwendigen Plasmidkonstrukte generiert. Der nächste Schritt bestand nun in der Etablierung retroviraler Produzentenzellinien, die stabil tTA oder rtTa exprimieren und das gewünschte Regulationsverhalten zeigen. Zu diesem Zweck wurden PELZ16/5-Zellen mit pTet-Off/P bzw. mit pTet-On/P stabil transfiziert. Die erhaltenen Klone wurden expandiert und sowohl in An- als auch Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert, mit ptetO-SEAP bzw. ptI-SEAP transfiziert (mit Hilfe von Lipofectamine, siehe 2.3.3.2) und auf ihre Fähigkeit zur SEAP-Expression überprüft (siehe 2.3.4).[15] Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden Überstände pCMV-SEAP- bzw. p0-SEAP-transfizierter PELZ16/5--Zellen im SEAP-Nachweis eingesetzt. Tabelle 3.6 gibt eine exemplarische Aufstellung der erhaltenen Ergebnisse wieder. An den gezeigten Beispielen wird deutlich, daß

Tabelle 3.6: SEAP-Expression in Tetracyclin-regulierbaren PELZ16/5-Klonen.

Klon	SEAP-Expression (rlu)[a]		Induktion
	Doxycyclin (–)	Doxycyclin (+)[b]	
On 26	0,468	43,116	92,1×
On 28	0,152	1,559	10,3×
On 39	0,158	0,227	1,4×
Off 19	3,808	0,462	8,2×
Off 21	57,452	1,101	52,2×
Off 38	40,412	0,120	336,8×
PELZ16/5 × pCMV-SEAP	26,990	–[c]	–
PELZ16/5 × p0-SEAP	0,003	–	–

[a] verwendetes Expressionsplasmid: ptetO-SEAP

[b] eingesetzte Doxycyclin-Konzentration: 1 µg/ml

[c] Vorversuche hatten ergeben, daß Doxycyclin die konstitutive SEAP-Expression nicht beeinflußt

mit Hilfe der Tetracyclin-induzierten Expression die Expressionsstärke im Vergleich zur konstitutiven Expression unter Kontrolle des CMV-Promotors verdoppelt werden kann (Klon Off 21). Allerdings weist dieser Klon auch im abgeschalteten Zustand eine deutliche SEAP-Expression auf. Dagegen zeigt Klon Off 38 ein erheblich besseres

[15] Die Inkubation mit 1 µg/l Doxycylin wurde 48 h vor Transfektion begonnen. Die Transfektion selbst erfolgte in Abwesenheit von Doxycyclin; die Inkubation mit Doxycylin wurde mit dem ersten Mediumwechsel nach Transfektion wieder aufgenommen.

Regulationsverhalten. Im abgeschalteten Zustand weist dieser Klon eine fast zehnfach geringere Expression als Klon Off 21 auf, während im aktivierten Zustand die Expressionsstärke von pCMV-SEAP um fast 50 % übertroffen wird. Der Vergleich von On- und Off-Klonen zeigt, daß im vorliegenden Fall das Tet-Off System sowohl bezüglich Expressionsstärke als auch Regulierbarkeit dem Tet-On System überlegen ist. Die Klone mit dem besten Regulationsverhalten wurden im nächsten Schritt mit ptetO-IF und dem Selektionsplasmid pTK-Hyg cotransfiziert, wobei ein Verhältnis von Expressions- zu Selektonsplasmid von 1 : 20 gewählt wurde. Nach Selektion auf Hygromycin-Resistenz (mit 200 µg/ml Hygromycin) und Expansion der Klone wurden diese nach Gewinnung genomischer DNA zunächst mittels PCR auf die Anwesenheit der SeV-F cDNA überprüft. Positive Klone wurden dann durch An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin zur SeV-F Expression stimuliert, dann wurde eine RNA-Isolierung durchgeführt und mittels RT-PCR die SeV-F Expression untersucht. Hierbei zeigte sich, daß bei allen Klonen, bei denen mittels PCR die SeV-F cDNA nachgewiesen werden konnte, nach Stimulation auch ein SeV-F Transkript mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Allerdings war keiner der erhaltenen Klone in der Lage, viralen Überstand zu generieren, der funktionelle MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen enthielt. Funktionelle Nachweise diesbezüglich verliefen negativ. Ebenso konnte mittels Western-Blotting kein Nachweis von SeV-F auf Proteinebene geführt werden.

3.4.2.4 Expression von SeV-F mit Hilfe rekombinanter Vaccinia Viren

Bei den Versuchen ein hohes SeV-F Exprssionsniveau in Retrovirus-Produzentenzellen zu erreichen, wurde auch auf das Vaccinia Expressionssystem (siehe Abschnitt 2.4.3.1) zurückgegriffen. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Ansätzen handelt es sich hierbei um ein virales Expressionssystem. Da mit *replikationskompetentem* rekombinantem Virus geabeitet wird, sollte prinzipiell eine starke Expression des interessierenden Gens möglich sein.

3.4.2.4.1 SeV-F Expression mit Hilfe von vTF7-3 und pTM1-F

Die Infektion mit vTF7-3 und die anschließende Transfektion mit pTM1-F erfolgte wie unter Abschnitt 2.4.3.1 beschrieben. 18 h nach Transfektion wurde der Virusüberstand zur Transduktion der entsprechenden Zielzellen eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt war in den PELZ16/5-Kulturen bereits eine deutliche Schädigung der Zellen sichtbar. Die Transduktion von NIH 3T3-Zellen ergab darüberhinaus einen stark reduzierten Titer im Vergleich zu Überständen nicht-infizierter PELZ16/5-Zellen, eine Transduktion ASGP-R exprimierender Zellinien war nicht möglich. Aufgrund der stark reduzierten Retrovirus-Titer wurde dieser Ansatz daher nicht weiter verolgt.

3.4.2.4.2 SeV-F Expression mit Hilfe von rVV-F

Da sich die Verwendung des Vaccinia Systems vTF7-3/pTM1-F als ungünstig für die Retrovirus-Bildung erwiesen hatte, wurde in einem alternativen Ansatz ein rekombinantes Vaccinia Virus eingesetzt, das die SeV-F cDNA in exprimierbarer Form direkt im rekombinanten Virus-Genom enthält. In diesem Falle ist also nach der VV-Infektion der Zielzellen eine zusätzliche Transfektion mit einem Expressionsplasmid nicht mehr notwendig, was für die Zielzellen ein schonenderes Verfahren darstellt. PELZ16/5 Retrovirus-Produzentenzellen wurden in der in Abschnitt 2.4.3.1 beschriebenen Weise mit rVV-F infiziert, wobei eine moi von 5 eingesetzt wurde. 18 h nach Infektion mit rVV-F wurde der Zellkulturüberstand zur Transduktion der entsprechenden Zellinie eingesetzt. Die Transduktion von NIH 3T3-Zellen ergab, daß die Infektion mit rVV-F weniger beeinträchtigend war als die Verwendung des Systems vTF7-3/pTM1-F. Eine Transduktion von ASGP-R positiven HepG2- und HuH7-Zellen war jedoch nicht möglich. Zusätzlich wurden Lysate rVV-F infizierter PELZ16/5-Zellen hergestellt und mittels Western Blotting auf SeV-F Expression untersucht. Es konnte jedoch keine SeV-F Expression nachgewiesen werden, was wiederum mit den Ergebnissen der Transduktionsexperimente übereinstimmte.

3.4.3 Aktivierung des SeV-F Proteins durch Acetyl-Trypsin vermittelte Spaltung

Ausgehend von der Annahme, daß bei den generierten MoMLV(SeV-F)-Pseudotyppartikeln das SeV-F Protein sowohl für die Bindung an den ASGP-R als auch für die Fusion von viraler und zellulärer Membran benötigt wird, wurden erzeugte Virusüberstände gewöhnlich mit acetyliertem Trypsin (siehe 2.4.1.2) behandelt, um fusionsaktives SeV-F Protein zu erhalten. Es stellte sich jedoch heraus, daß solch eine Aktivierung für eine erfolgreiche MoMLV(SeV-F)-Pseudotyptransduktion nicht notwendig ist. Im

Vergleich von Trypsin-behandeltem zu unbehandeltem Virusüberstand ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Transduktionseffizienz, so daß auf eine Aktivierung mittels acetyliertem Trypsin im weiteren Verlauf der Experimente verzichtet werden konnte (siehe auch S. 148 im Kapitel Diskussion).

3.4.4 Verbesserte Ansteuerung des ASGP-R

Neben der ausreichenden Expression des SeV-F Proteins stellt die Zugänglichkeit des ASGP-R als angesteuerter Rezeptor den zweiten wichtigen Faktor hinsichtlich der erreichbaren Titer dar. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, daß der ASGP-R überwiegend im basolateralen Teil der Zellmembran lokalisiert ist (Bartles et al., 1987; Wessels et al., 1989). Bei einer konventionellen Transduktion, bei der die zu transduzierenden Zellen mit dem Virusmedium überschichtet werden, ist daher – im Falle des ASGP-R als angesteuertem Rezeptor – ein Großteil der Rezeptormoleküle für eine Transduktion nicht zugänglich. Daher wurde mittels sogenannter Durchflußtransduktionen (Chuck & Palsson, 1996; siehe Abbildung 3.20) versucht, eine verbesserte Ansteuerung des ASGP-R zu erreichen und damit höhere Titer zu erzielen. Hierzu wurden HepG2-Zellen auf Kollagen-beschichteten Membranen mit 0,4 µm Porenweite (Transwell-Col, Costar) ausgesät und 48 h später mit (nach Transfektion der Verpackungszellinie FE21 mit dem retroviralen Vektor pLZ12 gewonnenem) Virusüberstand in der in Abbildung 3.20 dargestellten Weise transduziert. Parallel erfolgte mit demselben Virusüberstand eine konventionelle Transduktion von HepG2-Zellen. Da eine Durchflußtransduktion bereits unabhängig von der Lokalisation der Rezeptormoleküle zu einem Anstieg des Titers führt, wurden zum Vergleich NIH 3T3-Zellen transduziert, bei denen die Transduktion über den gleichmäßig in der Zellmembran verteilten ecotropen Rezeptor (Rec-1) erfolgt. Ob und inwieweit eine Durchflußtransduktion zu unspezifischen Transduktionsereignissen führt, wurde anhand der Transduktion von BHK-21-Zellen überprüft. Tabelle 3.7 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Bei NIH 3T3-Zellen führte die Durchflußtransduktion zu einem knapp vierfachen Anstieg des Titers im Vergleich zur konventionellen Transduktion ($12{,}8 \times 10^2$ ffu/ml zu $3{,}3 \times 10^2$ ffu/ml). Dagegen ergaben Durchflußtransduktionen von HepG2-Zellen einen fast neunfachen Anstieg des Titers gegenüber der konventionellen Transduktion ($17{,}8 \times 10^2$ ffu/ml zu $2{,}0 \times 10^2$ ffu/ml). Der stärkere Anstieg im Vergleich zu den NIH 3T3-Transduktionen läßt somit auf eine verbesserte Zugänglichkeit

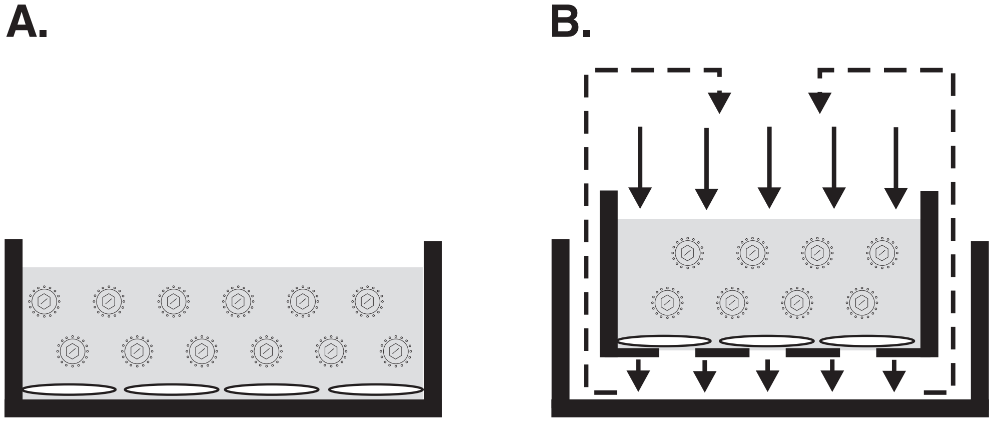

Abbildung 3.20: Schematischer Vergleich von konventioneller (statischer) Transduktion und Durchflußtransduktion. **A.** Konventionelle Transduktion: Die zu transduzierenden Zellen sind mit dem virushaltigen Medium überschichtet. Nur Viruspartikel, die infolge der Brown'schen Molekularbewegung die Oberfläche der Zellen erreichen, können diese auch transduzieren. Ein größeres Volumen an Virusmedium führt daher nicht zu einer entsprechend größeren Zahl an transduzierten Zellen, sondern nur zu einem gerinfügigen Anstieg des Titers. **B.** Durchflußtransduktion: Die zu transduzierenden Zellen wachsen auf einer durchlässigen Kollagen-beschichteten Membran. Nach Überschichtung mit dem Virusmedium fließt dieses solange durch die Poren der Membran, bis der Flüssigkeitsspiegel im inneren und äußeren Gefäß die gleiche Höhe erreicht. Durch Umpipettieren der Flüssigkeit aus dem äußeren in das innere Gefäß wird der Durchfluß des Virusmediums erneut in Gang gesetzt. Auf diese Weise erreichen praktisch alle im Medium enthaltenen Viruspartikel die gesamte Oberfläche der Zellen. Abbildung nach Chuck & Palsson (1996).

Tabelle 3.7: Durchflußtransduktionen zur verbesserten Ansteuerung des ASGP-R.

Transduktion	Virus-Titer (10^2 ffu/ml) auf Zellen[a]		
	NIH 3T3 (A–/E+)	BHK-21 (A–/E–)	HepG2 (A+/E–)
statisch	3,3	0,0	2,0
Durchfluß	12,8	0,0	17,5

[a] A+: ASGP-R positiv, A–: ASGP-R negativ, E+: Rec-1 positiv, E–: Rec-1 negativ (Rec-1: ecotroper Rezeptor)

des basolateral lokalisierten ASGP-R schließen. Die fehlende Transduktion von BHK-21 – unabhängig von der gewählten Methode – ergab, daß eine Rezeptor-unabhängige Transduktion als Ursache für einen beobachteten Titeranstieg ausgeschlossen werden kann.

Kapitel 4

Diskussion

Mit dem Einsatz molekularbiologischer Techniken eröffnen sich vielfältige Möglichkeiten zur gezielten Veränderung des Tropismus viraler Gentransfer-Systeme. In diesem Zusammenhang ist das – in der Natur vorkommende – Phänomen des Einbaus heterologer Virushüllproteine in die Hülle verwandter und nicht-verwandter Viren von großem Interesse. Bis vor kurzem lagen keine Daten vor, ob und inwieweit eine Pseudotypisierung von MoMLV mit Hüllproteinen der Paramyxoviren möglich ist. Allerdings ergaben sich aus früheren Beobachtungen indirekte Hinweise für diese Möglichkeit: So ist einerseits die Pseudotypbildung ausgehend von VSV und den Parainfluenzaviren SeV bzw. SV5 nachgewiesen (Choppin & Compans, 1970; Kimura, 1973), andererseits wurde die Bildung von Pseudotypen in MoMLV produzierenden Zellen beobachtet, die zusätzlich mit VSV infiziert worden waren (Witte & Baltimore, 1977; Zavada, 1982).

Diese Beobachtungen dienten als Ausgangspunkt für den Ansatz, MoMLV(SeV)-Pseudotypen zu generieren. Zunächst wurde der Versuch unternommen, durch Infektion von MoMLV-Produzenten-Zellen mit SeV eine Expression der SeV-Hüllproteine in den infizierten Zellen in Gang zu setzen und so die Bildung pseudotypisierter Retroviruspartikel auszulösen (Spiegel, 1995; Spiegel et al., 1998). Ergebnis dieser Infektionsexperimente war die erfolgreiche Transduktion von BHK-21-Zellen (in Form der Übertragung von *neo*^{r} als Markergen), die *per se* einer Infektion/Transduktion mit ecotropen Retroviren nicht zugänglich sind. Diese Beobachtung stellte einen eindeutigen Hinweis auf die Bildung von MoMLV(SeV)-Pseudotypen dar, die ein erweitertes Wirtsspektrum im Vergleich zu ecotropen MoMLV-Partikeln – aufgrund der inkorporierten SeV-Hüllproteine – besitzen. Hierbei wird der Tropismus der gebildeteten MoMLV(SeV-HN+F) mutmaßlich in erster Linie durch SeV-HN bestimmt, dessen Rezeptoren ubiquitär vorkommende Sialinsäure-haltige Ganglioside darstellen.

In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, daß für SeV ein alternativer, HN-unabhängiger Weg der Infektion beschrieben und charakterisiert wurde, der auf der spezifischen Interaktion von SeV-F und dem Hepatocyten-spezifischen ASGP-R beruht (Bitzer et al., 1997; Markwell et al., 1985). Daraus leitete sich die Frage ab, ob und inwieweit der Einbau von SeV-F in die Hülle ecotroper MoMLV-Partikel (also die mögliche Bildung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen) zu einer spezifischen Ansteuerung des ASGP-R als Zielzellrezeptor führt. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Transfektionsexperimenten durchgeführt, mit denen ein System etabliert werden sollte, das sowohl das rekombinante retrovirale Genom als auch das SeV-F Glycoprotein in retroviralen Verpackungszellen in ausreichender Menge bereitstellt. Die Tauglichkeit der gewählten Ansätze wurde dahingehend überprüft, daß in analogen Experimenten die Generierung von MoMLV(VSV-G)-Pseudotypen erfolgte, bei denen der Einbau von VSV-G in die retrovirale Hülle bekanntermaßen mit großer Effizienz erfolgt (Burns et al., 1993; Friedmann & Yee, 1995). Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, daß es tatsächlich möglich ist, sowohl VSV-G als auch SeV-F Pseudotypen mit Hilfe retroviraler Verpackungszellen zu generieren, die zusätzlich mit Expressionsplasmiden für VSV-G und SeV-F transfiziert wurden. Die generierten rekombinanten MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen sind in der Lage, ASGP-R exprimierende Zellen spezifisch zu transduzieren. Dies wurde mit Hilfe der humanen Hepatom-Zellinien HepG2 und HuH7 sowie mit stabil mit dem ASGP-R transfizierten MDCK-Zellen (Zellinie M12) gezeigt. Ausgehend von einem System, in dem sowohl die SeV-F Expression als auch die Bereitstellung des rekombinanten retroviralen Genoms transient erfolgte, wurde eine stabil SeV-F exprimierende Verpackungszellinie (FE21) und schließlich eine stabile MoMLV(SeV-F)-Produzentenzellinie (FELP6) etabliert.

Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten zur Generierung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen wurden retrovirale Verpackungszellen eingesetzt, die sowohl die ursprünglichen ecotropen Hüllproteine (SU und TM) als auch das SeV-F Hüllprotein produzieren und somit beide auch auf ihrer Zelloberfläche tragen. Dieser Ansatz war gewählt worden, da die Anwesenheit der autologen Hüllproteine Pseudotyppartikel stabilisieren kann (Schnierle & Groner, 1996). Die generierten MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen enthielten also sowohl die autologen Hüllproteine als auch das heterologe Glycoprotein in der viralen Hülle. Da MoMLV(SeV-F) Viruspartikel ASGP-R positive Zellen (HepG2, HuH7 und M12) mit der gleichen Effizienz transduzieren wie Rec-1 positive (also den ecotropen Rezeptor exprimierende) Zellen (NIH 3T3), scheint die gleichzeitige Anwesenheit von SeV-F und SU/TM die Funktionalität der beiden Hüllproteine nicht zu beeinträchtigen. Wenn man allerdings die Transduktionseffizienzen von rekombinanten ecotropen Retroviren bezüglich NIH 3T3-Zellen mit denen von MoMLV(SeV-F)Pseudotypen vergleicht, so erreicht man mit ersteren signifikant höhere Titer ($3{,}8 \times 10^3$ cfu/ml im Vergleich zu $2{,}4 \times 10^2$ cfu/ml, siehe Tabelle 3.1). Dies könnte auf eine direkte Inhibition der Bindung von SU an Rec-1 (den ecotropen Rezeptor) und/oder der TM-vermittelten Fusion von viraler und zellulärer Membran durch SeV-F zurückzuführen sein. Denkbar wäre auch, daß der Einbau von SeV-F in die retrovirale Hülle die Effizienz für die Inkorporation der retroviralen Hüllproteine so stark herabsetzt, daß dies zum begrenzenden Faktor für die Bindung der Viruspartikel an Rec-1 positive Zielzellen wird.

Eine entscheidende Frage ist in diesem Zusammenhang, inwieweit eine Anwesenheit der retroviralen Hüllproteine in der Hülle von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen für eine effiziente Transduktion von ASGP-R positiven Zielzellen zwingend notwendig ist. Rekonstituierte SeV-Hüllpartikel, die nur fusionsaktives SeV-F Glycoprotein auf ihrer Oberfläche tragen (sogenannte F-Virosomen), sind nicht nur in der Lage, an ASGP-R positive Zielzellen zu binden, sondern fusionieren anschließend auch mit der Zielzellmembran, wobei der Inhalt der Virosomen ins Cytoplasma aufgenommen wird (Bagai & Sarkar, 1993; Bagai & Sarkar, 1994). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß ASGP-R positive Zielzellen, bei denen der konventionelle SeV-Rezeptor (Sialinsäurehaltige Ganglioside) enzymatisch zerstört wurde, SeV-F/ASGP-R vermittelt mit SeV-F infiziert werden können (Bitzer et al., 1997). Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion war in diesem Fall aber, daß SeV-F in der fusionsaktiven Form (also in Form der Spaltprodukte F1 und F2) vorliegt. Aus diesen Daten läßt sich schließen, daß das SeV-F Protein alleine sowohl für die Bindung an die Membran als auch für die Fusion von viraler und zellulärer Membran ausreichen sollte und daher als einziges Hüllprotein in der Virushülle von MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen fungieren könnte. Auf der anderen Seite könnte die Anwesenheit der Retrovirus-Hüllproteine über eine mögliche Stabilisierung der Pseudotyp-Hülle hinaus von Vorteil sein. Die Beobachtung, daß für die ASGP-R vermittelte Transduktion mit gemischten MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen eine

Aktivierung (d. h. Spaltung mit acetyliertem Trypsin) des SeV-F Proteins überflüssig ist, legt die Vermutung nahe, daß die Bindung an den ASGP-R durch SeV-F_0 vermittelt wird, während das retrovirale TM-Protein für die Fusion von viraler und zellulärer Membran verantwortlich ist. Indirekt gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß bei mutierten retroviralen Hüllproteinen sowohl die Bindungs- als auch die Fusionsaktivität *in trans* wiederhergestellt werden kann (Zhao et al., 1997). Solange retrovirale *env*-Proteine in den Verpackungszellen coexprimiert werden, können daher die Serum-freien Bedingungen bei der Generierung von MoMLV(SeV-F)-Pseudotyppartikeln, die für die spätere Aktivierung des SeV-F Proteins mit acetyliertem Trypsin notwendig sind, entfallen.

Bezüglich der MoMLV-Pseudotyp Transduktionseffizienzen ist der effiziente Einbau des heterologen Membranproteins von entscheidender Bedeutung. Grundvoraussetzung hierfür ist eine effiziente Expression und Lokalisation dieses Proteins an den Stellen der Zelloberfläche, an denen es zur Sezernierung der Viruspartikel kommt (Suomalainen & Garoff, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst sowohl für die transiente als auch die stabile SeV-F Expression ein Standard Expressionsplasmid mit hCMV-IE-Promotor (pcDNA3) eingesetzt. Sowohl mittels RT-PCR als auch mittels Western Blotting (nach vorangegangener Immunpräzipitation) konnte nachgewiesen werden, daß die generierten MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp Verpackungs- und Produzentenzellen nur eine schwache SeV-F Expression aufwiesen, insbesondere im Vergleich zu SeV-infizierten Verpackungszellen. Im Gegensatz hierzu konnten mit einem pcDNA3-analogen Konstrukt bei der Expression des SEAP-Reportergens hohe Expressionsniveaus erreicht werden. Daher war ein cytotoxischer Effekt im Falle einer starken und konstitutiven SeV-F Expression nicht auszuschließen. Für verschiedene Virushüllproteine ist ein solcher Effekt beschrieben. So wurde bei der Expression des Masernvirus-Fusionsproteins (MV-F, bei dem eine Verwandtschaft mit SeV-F besteht) mit Hilfe eines rekombinanten VSV/MV-F Systems der vollständige Verlust der MV-F Expression innerhalb von drei Passagen beobachtet (Schnell et al., 1996), was auf einen starken Selektionsdruck zur Eliminierung der MV-F Expression hinweist. Daher wurde der Versuch unternommen, ein Tetracyclin-induzierbares System für die SeV-F Expression zu etablieren. Hierbei konnten Produzentenzellklone erhalten werden (auf Basis von PELZ16/5, also von Mäusefibroblasten abgeleitet), in denen nach entsprechender Stimulation mit Doxycyclin SeV-F Transkript mittels RT-PCR nachweisbar war. Keine dieser Zellinien war jedoch in der Lage, funktionelle MoMLV(SeV-F)-

Pseudotypen zu bilden, ebenso konnte in Western Blotting Experimenten das SeV-F Protein nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, daß es einerseits durchaus möglich war, funktionelle MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Verpackungs- bzw. Produzentenzellinien zu generieren (Zellinien FE21 und FELP6) andererseits sich die Tetracyclin-Regulation im SEAP-Test als funktionell erwies, muß die Bildung bzw. korrekte Prozessierung des SeV-F Proteins auf Ebene der Translation und/oder der posttranslationalen Modifikation blockiert sein. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwieweit eine adäquate Expression der SeV-Hüllproteine abhängig von der gewählten Zellinie ist. Daß dies von entscheidender Bedeutung sein kann, zeigen die Ergebnisse, die mit dem Expressionskonstrukt pUC29-IF-zeo erhalten wurden. Während, ausgehend von diesem Plasmid, eine SeV-F-Expression weder in PELZ16/5 noch in Phoenix-Eco möglich war, konnte – wie durch Fischer (1998) gezeigt – mit demselben Konstrukt eine stabile Expression von SeV-F in CHO- und HeLa-Zellen erhalten werden, wobei das Niveau der SeV-F Proteinmenge dem von SeV-F infizierten Zellen entsprach. Dagegen war es auch in dieser Arbeit (Fischer, 1998) nicht möglich, das SeV-F Protein in 293-Zellen zur Expression zu bringen, was in Einklang mit der fehlenden SeV-F Expression in von Phoenix-Eco abgeleiteten Zellklonen steht. Für die zukünftige Herstellung optimierter MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Verpackungszellinien sollte daher die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, von einer der nun zur Verfügung stehenden Zellinien, die das SeV-F Protein stabil exprimieren, auszugehen und diese zusätzlich mit den für die Verpackung retroviraler Genome notwendigen Konstrukten auszustatten.

Neben der optimierten SeV-F Expression erwies sich eine optimale Ansteuerung des ASGP-R als ein entscheidender Faktor für die Effizienz der MoMLV(SeV-F)-vermittelten Transduktion. Mit Hilfe von Durchfluß-Transduktionen (Chuck & Palsson, 1996) konnte gezeigt werden, daß die Verteilung und Zugänglichkeit des ASGP-R für die erreichbaren Pseudotyp-Titer von Bedeutung sind. Ausgangspunkt war die Überlegung, daß die basolaterale Lokalisation des ASGP-R (Wessels & Spiess, 1988; Geffen et al., 1993) dazu führen kann, daß die überwiegende Anzahl der Rezeptormoleküle in einer konventionellen Transduktion für die eingesetzten Pseudotyppartikel nicht zugänglich sind. Daher wurden ASGP-R positive HepG2-Zellen auf Kollagenbeschichteten Transwell-COL Membranen kultiviert, die eine geeignete Matrix für die Anheftung der Zellen bei gleichzeitiger Durchlässigkeit der Membran bereitstellen. Dieses System erlaubt den Durchfluß von Virusüberständen und ermöglicht den Zu-gang zum basolateralen Teil der Zellmembranen. Auf diese Weise wurde die Zahl der zugänglichen ASGP-R Moleküle stark erhöht und damit auch die mögliche Zahl der Rezeptor/Ligand Interaktionsereignisse. Dies führte – im Vergleich zu Transduktionen, bei denen Rec-1 als Rezeptor angesteuert wurde – zu einer signifikanten Steigerung der erreichbaren MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Titer.

Ein weiterer Nachweis der Spezifität der SeV-F/ASGP-R Interaktion im Rahmen einer MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Transduktion konnte anhand von Inhibitionsversuchen mit einem gegen den humanen ASGP-R gerichteten Antiserum geführt werden. In Anwesenheit des Antikörpers war die MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-vermittelte Transduktion von M12-Zellen zu mehr als 80 % inhibiert. Da höhere Antikörper-Konzentrationen nicht zu einer stärkeren Inhibition führten, repräsentiert die verbleibende Transduktionsrate möglicherweise den Anteil freier (und damit für eine SeV-F vermittelte Transduktion zugängliche) ASGP-R Moleküle, die durch die Internalisierung und den anschließenden Rücktransport von Rezeptormolekülen an die Zelloberfläche entstehen (wobei dieser Kreislauf unter den gewählten Bedingungen bei 4 °C stark verlangsamt sein sollte, Schwartz et al., 1982).

Die auf Hepatocyten beschränkte Expression des ASGP-R macht diesen zu einem außerordentlich interessanten Ansatzpunkt für den gezielten Transfer von therapeutischen Substanzen oder Genen in die Leber. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen erstmals, daß der ASGP-R für den retroviral vermittelten Lebergentransfer mittels MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen genutzt werden kann. Damit wird eine Kombination der Vorteile des retroviralen Gentransfers (wie z. B. die dauerhafte Expression übertragener Gene) mit einer Beschränkung des therapeutischen Gentransfers auf die Leber erreicht und somit eine wichtige Voraussetzung für zukünftige Organ-spezifische *in vivo* Transduktionen erfüllt.

4.1 Ausblick

Für den Einsatz im *in vivo* Lebergentransfer ist die Verfügbarkeit hochkonzentrierter MoMLV(SeV-F)-Pseudotypvirus-Lösungen unabdingbar. Daher sollen – über die hier dargestellten Arbeiten hinaus – ausgehend von stabil SeV-F exprimierenden HeLa- bzw. CHO-Zellen (Fischer, 1998) MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Verpackungszellen generiert werden, die sowohl SeV-F als auch die retroviralen Strukturproteine in adäquaten Mengen bilden und somit für eine effiziente Virusproduktion genutzt werden können. Hierbei sollen auch Verpackungszellen erzeugt werden, die als Hüllprotein nur noch SeV-F und nicht mehr – wie in den hier dargestellten Versuchen – die retroviralen Hüllproteine bereitstellen. Solche Verpackungszellen können dann als Ausgangspunkt für die Generierung „reiner“ MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen dienen. Diese *env*-freien Pseudotyppartikel wären im Hinblick auf *in vivo* Experimente im Maus- oder Rattenmodell bezüglich der ASGP-R Spezifität und der Effizienz des MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-vermittelten Gentransfers von großem Interesse. Unabhängig hiervon stehen bereits zum jetzigen Zeitpunkt mit hochgradig immundefizienten Mausmodellen (z. B. der NOD-SCID Maus; Shultz et al., 1995) Tiermodelle zur Verfügung, die einen Einsatz „gemischter“ MoMLV(SeV-F)-Pseudotypen erlauben. Hierbei ist geplant, ausgehend von ASGP-R positiven humanen Hepatomzellen (z. B. auf Grundlage der humanen Hepatomzellinie HepG2), Lebertumore zu erzeugen und diese durch direkte Injektion von (eventuell zuvor zusätzlich aufkonzentrierten) Überständen der MoMLV(SeV-F)-Pseudotyp-Produzentenzellinie FELP6 zu transduzieren. In Weiterführung der bisherigen Arbeiten soll das Konzept der Pseudotypisierung mit SeV-F zusätzlich auf ein lentivirales System übertragen werden. Da Lentiviren im Gegensatz zu anderen Retroviren auch ruhende Zellen effizient transduzieren (Naldini et al., 1996), stünde mit lentiviralen SeV-F Pseudotypen ein effizientes System zur Transduktion ruhender Hepatocyten zur Verfügung. Entsprechende Experimente zur Pseudotypisierung nicht-humanpathogener, rekombinanter Feline Immunodeficiency Viren (Poeschla et al., 1998) wurden bereits begonnen. Diese FIV(SeV-F)-Pseudotypen sollen dann im – bereits zur Verfügung stehenden – *in vivo* Modell der Faktor IX defizienten (Hämophilie B) knock-out Maus auf ihre Fähigkeit zur spezifischen Transduktion ruhenden Lebergewebes untersucht werden.

Literaturverzeichnis

Achacoso, P. L.; Chanda, S.; Rigg, R.; Jaeger, G. & Nolan, G. P. (1996). Phoenix: Human based amphotropic, ecotropic and pseudotypable retroviral packaging cell lines with direct cell monitoring of the Moloney gag, pol and envelope proteins, **URL:** *http://www.stanford.edu/group/nolan/NL-phoenix.html*.

Albritton, L. M.; Tseng, L.; Scadden, D. & Cunningham, J. M. (1989). A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection, *Cell* **57**: 659–666.

Anderson, W. F. (1984). Prospects for human gene therapy, *Science* **226**: 401–409.

Anderson, W. F. (1998). Human gene therapy, *Nature* **392 Supp**: 25–30.

Ausubel, F. M. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.

Bagai, S. & Sarkar, D. P. (1993). Reconstituted Sendai virus envelopes as biological carriers: Dual role of F protein binding and fusion with liver cells, *Biochim. Biophys. Acta* **1152**: 15–25.

Bagai, S. & Sarkar, D. P. (1994). Fusion-mediated microinjection of lysozyme into Hepg2 cells through hemagglutinin neuraminidase depleted Sendai virus envelopes, *J. Biol. Chem.* **269**: 1966–1972.

Balaji, P. V.; Qasba, P. K. & Rao, V. S. R. (1993). Molecular dynamics simulations of asialoglycoprotein receptor ligands, *Biochemistry* **32**: 12599–12611.

Bartles, J. R.; Feracci, H. M.; Stieger, B. & Hubbard, A. L. (1987). Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: Comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation, *J. Cell. Biol.* **105**: 1241–1251.

Becker, S.; Spiess, M. & Klenk, H. D. (1995). The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus, *J. Gen. Virol.* **76**: 393–399.

Birnboim, H. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA, *Method. Enzymol.* **100**: 243–255.

Bischoff, J.; S.Libresco; Shia, M. A. & Lodish, H. F. (1988). The H1 and H2 polypeptides associate to form the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells, *J. Cell. Biol.* **106**: 1067–1074.

Bitzer, M.; Lauer, U.; Baumann, C.; Spiegel, M.; Gregor, M. & Neubert, W. J. (1997). Sendai virus efficiently infects cells via the asialoglycoprotein receptor and requires presence of cleaved F_0-precursor proteins for this alternative route of cell entry, *J. Virol.* **71**: 5481–5486.

Bloch, W. (1991). A biochemical perspective of the polymerase chain reaction, *Biochemistry* **30**: 2735–2747.

Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B. & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7297–7301.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein using the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.

Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein, *Anal. Biochem.* **112**: 195–203.

Burns, J.; Friedmann, T.; Driever, W.; Burrascano, M. & Yee, J.-K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8033–8037.

Chapman, B. S.; Thayer, R. M.; Vincent, K. A. & Haigwood, N. L. (1991). Effect of intron A from human Cytomegalovirus (towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* **19**: 3979–3986.

Chattopadhyay, S. K.; Oliff, A. I.; Linemeyer, D. L.; Lander, M. R. & Lowy, D. R. (1981). Genomes of murine leukemia viruses isolated from wild mice, *J. Virol.* **39**: 777–791.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* **162**: 156–159.

Choppin, P. W. & Compans, R. W. (1970). Phenotypic mixing of envelope proteins of the parainfluenza virus SV5 and vesicular stomatitis virus, *J. Virol.* **5**: 609–616.

Chuck, A. S. & Palsson, B. O. (1996). Consistent and high rates of gene transfer can be obtained using flow-through transduction over a wide range of retroviral titers, *Hum. Gene Ther.* **7**: 743–750.

Coffin, J. M. (1990). Retroviridae and their replication, *in* B. N. Fields & D. M. Knipe (eds), *Virology, Second Edition*, Raven Press, New York, pp. 1437–1499.

Collins, J. C.; Paietta, E.; Green, R.; Morell, A. G. & Stockert, R. J. (1988). Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2, *J. Biol. Chem.* **263**: 11280–11283.

Cone, R. D. & Mulligan, R. C. (1984). High-efficiency gene transfer into mammalian cells: Generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6349–6353.

Demine, C. A. & Emerman, M. (1993). Incorporation of human immunodeficiency virus type 1 gag proteins into murine leukemia virus, *J. Virol.* **67**: 6499–6506.

Deng, W. P. & Nickoloff, J. A. (1992). Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site, *Anal. Biochem.* **200**: 81–88.

Earl, P. L.; Cooper, N. & Moss, B. (1993). Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks, *in* F. M. Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, pp. 16.16.1–16.16.7.

Elroy-Stein, O. & Moss, B. (1993). Gene expression using the vaccinia virus/T7 RNA polymerase system, *in* F. M. Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, chapter Protein Expression, pp. 16.19.1–16.19.9.

Emi, N.; Friedmann, T. & Yee, J.-K. (1991). Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus, *J. Virol.* **65**: 1202–1207.

Felgner, J. H.; Kumar, R.; Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Tsai, Y. J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M. & Felgner, P. L. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations, *J. Biol. Chem.* **269**: 2550–2561.

Fischer, S. (1998). *Herstellung von Verpackungszellinien zur Trans-Komplementation der drei viralen Hüllproteine bei der Erzeugung rekombinanter replikationsdefizienter Sendai-Viren*, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Florkiewicz, R. Z. & Rose, J. K. (1984). A cell line expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fuses at low pH, *Science* **225**: 721–723.

Foecking, M. K. & Hofstetter, H. (1986). Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors, *Gene* **45**: 101–105.

Friedmann, T. & Yee, J.-K. (1995). Pseudotyped retroviral vectors for studies of human gene therapy, *Nature Medicine* **1**: 275–277.

Fuhrer, C.; Geffen, I.; Huggel, K. & Spiess, M. (1993). The two subunits of the asialoglycoprotein receptor contain different sorting information, *J. Biol. Chem.* **269**: 3277–3282.

Gallay, P.; Hope, T.; Chin, D. & Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyophylic pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9825–9830.

Gallay, P.; Swingler, S.; Song, J.; Bushman, F. & Trono, D. (1995). HIV nuclear import is governed by the phophotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase, *Cell* **83**: 569–576.

Gallileo, D. S.; Gray, G. E.; Owens, G. C.; Majors, J. & Sanes, J. R. (1990). Neurons and glia arise from a common progenitor in chicken optic tectum: Demonstration with two retroviruses and cell type-specific antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 458–462.

Gaush, C. R.; Hard, W. L. & Smith, T. F. (1966). Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**: 931–935.

Gazdar, A. F.; Oie, H.; Lalley, P.; Moss, W. W. & Minna, J. D. (1977). Identification of mouse chromosomes required for murine leukemia virus replication, *Cell* **11**: 949–956.

Geffen, I.; Fuhrer, C.; Leitinger, B.; Weiss, M.; Huggel, K.; Griffiths, G. & Spiess, M. (1993). Related signals for endocytosis and basolateral sorting of the asialoglycoprotein receptor, *J. Biol. Chem.* **268**: 20772–20777.

Gerner, F. (1995). *Stabile Synthese von rekombinanten Sendai Virus Oberflächenproteinen F und HN in eukaryontischen Zellen*, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Geyer, H.; Will, C.; Feldmann, H.; Klenk, H. D. & Geyer, R. (1992). Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein, *Glycobiology* **2**: 299–312.

Gossen, M. & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promotors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5547–5551.

Gossen, M.; Freundlieb, S.; Bender, G.; Müller, G.; Hillen, W. & Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells, *Science* **268**: 1766–1769.

Graham, F. L. & van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology* **52**: 456–467.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.

Horvath, C. M.; Paterson, R. G.; Shaughnessy, M. A.; Wood, R. & Lamb, R. A. (1992). Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: Factors influencing formation of syncytia, *J. Virol.* **66**: 4564–4569.

Jainchill, J. L.; Aaronson, S. A. & Todaro, G. J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: Assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells, *J. Virol.* **4**: 549–553.

Jensen, F. C.; Girardi, A. J.; Gilden, R. V. & Koprowski, H. (1964). Infection of human and simian tissue cultures with Rous sarcoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**: 53–59.

Kawai, S. & Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide, *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1172–1174.

Kim, J. W.; Closs, E. I.; Albritton, L. M. & Cunningham, J. M. (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor, *Nature* **325**: 725–728.

Kimura, Y. (1973). Phenotypic mixing of vesicular stomatitis virus with HVJ (Sendai virus), *Japan. J. Microbiol.* **17**: 373–381.

Kirchhoff, S.; Köster, M.; Werth, M.; Schaper, F.; Gossen, M.; Bujard, H. & Hauser, H. (1995). Identification of mammalian cell clones exhibiting highly regulated expression from inducible promoters, *Trends Genet.* **11**: 218–219.

Knowles, B. B.; Howe, C. C. & Aden, D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, *Science* **209**: 497–498.

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

Lamb, R. (1993). Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes, *Virology* **197**: 1–11.

Leyrer, S.; Bitzer, M.; Lauer, U.; Kramer, J.; Neubert, W. J. & Sedlmeier, R. (1998). Sendai virus-like particles devoid of haemagglutinin-neuraminidase protein infect cells via the asialoglycoprotein receptor, *J. Gen. Virol.* **79**: 683–687.

de la Luna, S.; Soria, I.; Pulido, D.; Ortin, J. & Jiménez, A. (1988). Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker, *Gene* **62**: 121–126.

Macpherson, I. A. & Stoker, M. G. P. (1964). Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives, *Nature* **64**: 1355–1357.

Mann, R.; Mulligan, R. C. & Baltimore, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free replication defective retrovirus, *Cell* **33**: 153–159.

Markowitz, D.; Goff, S. & Bank, A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: Separating viral genes on two different plasmids, *J. Virol.* **62**: 1120–1124.

Markwell, M. A. K.; Portner, A. & Schwartz, A. L. (1985). An alternative route of infection for viruses: Entry by means of the asialoglycoprotein receptor of a Sendai virus mutant lacking its attachment protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 978–982.

Markwell, M. A. K.; Svennerholm, L. & Paulson, J. C. (1981). Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 5406–5410.

Mayr, A.; Bachnamm, P.; Bibrack, P. & Wittmann, G. (1974). *Virologische Arbeitsmethoden*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, pp. 363–495.

McCutchan, J. H. & Pagano, J. S. (1968). Enhancement of infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran, *J. Natl. Cancer Inst.* **41**: 351–357.

Miller, A. D. (1996). Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11407–11413.

Miller, A. D. & Buttimore, C. (1986). Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production, *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2895–2902.

Miller, A. D.; Law, M. F. & Verma, I. M. (1985). Generation of helper-free amphotropic retroviruses that transduce a dominant-acting, methotrexate-resistant dihydrofolate reductase gene, *Mol. Cell. Biol.* **5**: 431–437.

Miller, A. D.; Miller, D. G.; Garcia, J. V. & Lynch, C. L. (1993). Use of retroviral vectors for gene transfer and expression, *Method. Enzymol.* **217**: 581–599.

Miller, A. D. & Rosman, G. J. (1989). Improved retroviral vectors for gene transfer and expression, *Biotechniques* **7**: 980–990.

Miller, D. G.; Adam, M. A. & Miller, A. D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection, *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4239–4242.

Moss, B. (1992). Poxvirus expression vectors, *Curr. Top. Microbiol.* **158**: 25–38.

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

Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T. & Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium, *Cancer Res.* **42**: 3858–3863.

Naldini, L.; Blömer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H.; Verma, I. M. & Trono, D. (1996). *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector, *Science* **272**: 263–267.

Neda, H.; Wu, C. H. & Wu, G. Y. (1991). Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity, *J. Biol. Chem.* **266**: 14143–14146.

Neumann, E.; Ridder-Schaefer, M.; Wang, Y. & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields, *EMBO J.* **1**: 841–845.

Office of Recombinant DNA Activities, NIH, Bethesda, MD (1998). *ORDA Report: Human Gene Therapy Protocols*.

Poeschla, E. M.; Wong-Staal, F. & Looney, D. J. (1998). Efficient transduction of non-dividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors, *Nature Medicine* **4**: 354–357.

Pringle, C. & Heath, R. (1990). Paramyxoviridae, *in* L. Collier & M. Timbury (eds), *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunology*, Vol. 4 Virology, Edward Arnold, London, pp. 274–290.

Qiagen GmbH, Hilden (1995). *Qiagen Plasmid Handbook*.

Rose, J. K. & Bergmann, J. E. (1982). Expression from cloned cDNA of cell-surface secreted forms of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus in eucaryotic cells, *Cell* **30**: 753–762.

Roux, L. & Waldvogel, F. A. (1982). Instability of the viral M protein in BHK-21 cells persistently infected with Sendai virus, *Cell* **28**: 293–302.

Sakaguchi, T.; Takao, S.-I.; Kiyotani, K.; Fujii, Y.; Nakayama, T. & Yoshida, T. (1993). Expression of the HN, F, NP and M proteins of Sendai virus by recombinant vaccinia virus and their contribution to protective immunity agianst Sendai virus infections in mice, *J. Gen. Virol.* **74**: 479–484.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanderson, C. M.; Wu, H. H. & Nayak, D. P. (1994). Sendai virus M protein binds independently to either the F or the HN glycoprotein in vivo, *J. Virol.* **68**: 69–76.

Sanger, F. & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *J. Mol. Biol.* **94**: 441–448.

Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463–5467.

Schnell, M. J.; Buonocore, L.; Kretzschmar, E.; Johnson, E. & Rose, J. K. (1996). Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis virus are incorporated efficiently into virus particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11359–11365.

Schnierle, B. S. & Groner, B. (1996). Retroviral targeted delivery, *Gene Therapy* **3**: 1069–1073.

Schnierle, B. S.; Stitz, J.; Bosch, V.; Nocken, F.; Merget-Millitzer, H.; Engelstädter, M.; Kurth, R.; Groner, B. & Cichutek, K. (1997). Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection of CD4-expressing cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8640–8645.

Schwartz, A. L.; Fridovich, S. E.; Knowles, B. B. & Lodish, H. F. (1981). Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line, *J. Biol. Chem.* **256**: 8878–8881.

Schwartz, A. L.; Fridovich, S. E. & Lodish, H. F. (1982). Kinetics of internalization and recycling of the asialoglycoprotein receptor in a hepatoma cell line, *J. Biol. Chem.* **257**: 4230–4237.

Shinnick, T. M.; Lerner, R. A. & Sutcliffe, J. G. (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus, *Nature* **293**: 543–548.

Shultz, L. D.; Schweitzer, P. A.; Christianson, S. W.; Gott, B.; Schweitzer, I. B.; Tennent, B.; McKenna, S.; Mobraaten, L.; Rajan, T. V. & Greiner, D. L. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice, *J. Immunol.* **154**: 180–191.

Simons, K. & Garoff, H. (1980). The budding mechanisms of enveloped animal viruses, *J. Gen. Virol.* **50**: 1–21.

Somia, N.; Zoppé, M. & Verma, I. M. (1995). Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: An approach to *in vivo* gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7570–7574.

Spiegel, M. (1995). *Versuche zur Veränderung des Tropismus rekombinanter Retroviren für den gewebespezifischen Gentransfer*, Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Spiegel, M.; Bitzer, M.; Schenk, A.; Rossmann, H.; Neubert, W. J.; Seidler, U.; Gregor, M. & Lauer, U. (1998). Pseudotype formation of Moloney murine leukemia virus with Sendai virus glycoprotein F, *J. Virol.* **72**: 5296–5302.

Spiess, M. (1990). The asialoglycoprotein receptor: A model for endocytic transport, *Biochemistry* **29**: 10009–10018.

Stratagene Cloning Systems (1997). *Chameleon Double-Stranded, Site-Directed Mutagenesis Kit*.

Suomalainen, M. & Garoff, H. (1994). Incorporation of homologous and heterologous proteins into the envelope of Moloney murine leukemia virus, *J. Virol.* **68**: 4879–4889.

Tang, M. X.; Redemann, C. T. & Szoka jr., F. C. (1996). *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers, *Bioconjug. Chem.* **7**: 703–714.

Tashiro, M.; Yokogoshi, Y.; Tobita, K.; Seto, J. T.; Rott, R. & Kido, H. (1992). Tryptase Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity, *J. Virol.* **66**: 7211–7216.

Temin, H. M. (1985). Reverse transcription in the eukaryotic genome: Retroviruses, pararetroviruses, retrotransposons and retrotranscripts, *Mol. Biol. Evol.* **6**: 455–468.

Towbin, H. & Gordon, J. (1984). Immunoblotting and dot immunoblotting, *J. Immunol. Methods* **72**: 313–340.

Treichel, U. K.; Meyer zum Büschenfelde, K. H.; Stockert, R. J.; Poralla, T. & Gerken, G. (1994). The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatits B virus particles from viraemic carriers, *J. Gen. Virol.* **75**: 3021–3029.

USB/Amersham Life Science (1995). *Shrimp Alkaline Phosphatase*.

Vaheri, A. & Pagano, J. S. (1965). Infectious poliovirus RNA: A sensitive method of assay, *Virology* **27**: 434–436.

Valerio, D. (1992). Retrovirus vectors for gene therapy, *in* F. Grosveld & G. Kollias (eds), *Transgenic Animals*, Academic Press, London, pp. 213–246.

Valesia-Wittmann, S.; Morling, F. J.; Nilson, B. H. K.; Takeuchi, Y.; Russell, S. J. & Cosset, F.-L. (1996). Improvement of retroviral retargeting by using amino acid spacers between an additional binding domain and the N terminus of Moloney murine leukemia virus SU, *J. Virol.* **70**: 2059–2064.

Verma, I. M. & Somia, N. (1997). Gene therapy - promises, problems and prospects, *Nature* **389**: 239–242.

Wang, H.; Kavanaugh, M. P.; North, R. A. & Kabat, D. (1991). Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter, *Nature* **352**: 729–731.

Warden, D. & Thorne, H. V. (1968). The infectivity of polyoma virus DNA for mouse embryo cells in the presence of diethylaminoethyl-dextran, *J. Gen. Virol.* **3**: 371–377.

Weiss, P.; Ashwell, G.; Morell, A. G. & Stockert, R. J. (1994). Modulation by the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells: Effect of glucose, *Hepatology* **19**: 432–439.

Wessels, H. P.; Geffen, I. & Spiess, M. (1989). A hepatocyte-specific basolateral membrane protein is targeted to the same domain when expressed in Madin-Darby canine kidney cells, *J. Biol. Chem.* **264**: 17–20.

Wessels, H. P. & Spiess, M. (1988). Insertion of a multispanning membrane protein occurs sequentially and requires only one signal sequence, *Cell* **55**: 61–70.

Wigler, M.; Pellicer, A.; Silverstein, S.; Axel, R.; Urlaub, G. & Chasin, L. (1979). DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1373–1376.

Wirth, M.; Granemann, R.; Klehr, D. & Hauser, H. (1994). Screening retroviral packaging cells for highly efficient virus production by using a combined selection procedure, *J. Virol.* **68**: 566–569.

Witte, O. N. & Baltimore, D. (1977). Mechanism of formation of pseudotypes between vesicular stomatitis virus and murine leukemia virus, *Cell* **11**: 505–511.

Yoshima, H.; Nakanishi, M.; Okada, Y. & Kobata, A. (1981). Carbohydrate structures of HVJ (Sendai virus) glycoproteins, *J. Biol. Chem.* **256**: 5355–5361.

Zavada, J. (1982). The pseudotypic paradox, *J. Gen. Virol.* **63**: 15–24.

Zhang, L. & Ghosh, H. P. (1994). Characterization of the putative fusogenic domain in vesicular stomatitis virus glycoprotein G, *J. Virol.* **68**: 2186–2193.

Zhao, Y.; Lee, S. & Anderson, W. F. (1997). Functional interactions between monomers of the retroviral envelope protein complex, *J. Virol.* **71**: 6967–6972.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASGP-R	Asialoglycoprotein-Rezeptor
ATCC	American Type Culture Collection
BGH	Rinderwachstumshormon
BSA	Rinderserumalbumin
cfu	colony forming units
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CMV	Cytomegalie Virus
CPE	Cytopathischer Effekt
DEAE	Diethylaminoehtyl
DI-Partikel	Defektive interferierende Partikel
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECACC	European Collection Of Animal Cell Cultures
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
F-Protein	Fusionsprotein des SeV
G-Protein	Hüllprotein des VSV
G418	Geneticin

HA	Hämagglutination
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidase Protein des SeV
HAD	Hämadsorption
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
KID_{50}	Kulturinfektionsdosis
K-MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Kaliumsalz
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LHBs	Large hepatitis B surface protein
LTR	Long terminal repeat
M199	Medium 199
MEM	Minimal essential medium
moi	Multiplicity of infection
MoMLV	Moloney murine leukemia virus
MoMSV	Moloney murine sarcoma virus
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
MV	Masernvirus
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pfu	Plaque forming units
PNGase F	Peptidase:N-Glycosidase F
Rec-1	Rezeptor des ecotropen MoMLV
rlu	Relative light units
RT	Reverse Transkription
rVV	Rekombinantes Vaccinia Virus
SAP	Alkalische Phosphatase aus Tiefseegarnelen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	Sezernierte alkalische Phosphatase
SeV	Sendai Virus
SU-Protein	Oberflächenprotein des MoMLV
SV5	Simian Virus 5

SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TB-Medium	Terrific-broth-Medium
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranprotein des MoMLV
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl-β-D-galactopyranosid

Firmenverzeichnis

Air Liquide-D.M.C., Marne-la-Vallée, Frankreich

Amersham Buchler, Braunschweig, BR Deutschland

Appligene Oncor, Heidelberg, BR Deutschland

Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, BR Deutschland

Beckman Instruments GmbH, München, BR Deutschland

Becton Dickinson and Company, Oxnard CA, USA

Bio 101 Inc., Vista CA, USA

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BR Deutschland

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BR Deutschland

B. Braun AG, Melsungen, BR Deutschland

Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, BR Deutschland

Clean Air, Woerden, Niederlande

Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, BR Deutschland

Costar GmbH, Bodenheim, BR Deutschland

Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf, BR Deutschland

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BR Deutschland

Fedegari Autoclavi SPA, Albuzzano PV, Italien

Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm, BR Deutschland

FMC BioProducts, Rockland ME, USA

Forma Scientific, Division of Mallinckrodt Inc., Marietta OH, USA

Fresenius AG, Bad Homburg, BR Deutschland

Greiner Kunststoffwerke GmbH, Nürtingen, BR Deutschland

Heraeus GmbH, Hanau, BR Deutschland

Invitrogen, Groningen, Niederlande

Life Technologies, Eggenstein, BR Deutschland

E. Merck, Darmstadt, BR Deutschland

Millipore GmbH, Eschborn, BR Deutschland

New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA

New England Biolabs, Schwalbach/Taunus, BR Deutschland

Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

Olympus Optical Co. (Europa) GmbH, Hamburg, BR Deutschland

Owl Scientific Inc., Woburn MA, USA

Pharmacia Biotech, Freiburg, BR Deutschland
Polaroid Corporation, Cambridge MA, USA
Qiagen GmbH, Hilden, BR Deutschland
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BR Deutschland
Sarstedt, Nümbrecht, BR Deutschland
Schleicher & Schüll GmbH, Dassel, BR Deutschland
Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, BR Deutschland
Stratagene, La Jolla CA, USA
Tropix Inc., Bedford MA, USA
USB, Cleveland OH, USA

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren und Dozenten:

Anatomie:	Reutter
Anorganische Biochemie:	Weser
Anorganische Chemie:	Gelinek, Lindner, Strähle
Biochemie:	Bohley, Eisele, Hamprecht, Mecke, Probst, Weber, Weser, Wiesinger
Botanik:	Mayer, Metzner, Wegmann
Enzymologie:	Bisswanger, Fröhlich, Gebhardt
Immunologie:	Anderer, Hartter, Rammensee
Mathematik:	Pommer
Mikrobiologie:	Braun, Götz, Hantke, Poralla, Schink, Zähner
Organische Chemie:	Bayer, Hagenmaier, Hanack, Jung
Pharmakologie und Toxikologie:	Bock, Breyer-Pfaff, Pfaff, Werringloer
Physik:	Nakel, Staudt
Physikalische Biochemie:	Voelter
Physikalische Chemie:	Christen, Hoffmann, Gauglitz, Oberhammer
Zoologie:	Günzl, Pfeiffer

Lebenslauf

Name:	Martin Spiegel
Geburtsdatum:	25.10.1965
Geburtsort:	Clausthal-Zellerfeld
Familienstand:	ledig
Schulausbildung:	
1972–1976	Grundschule Mittelrain (Heidenheim) und Ulrich-von-Dürrmenz Grundschule (Mühlacker)
1976–1985	Theodor-Heuss-Gymnasium Mühlacker
Zivildienst:	
1985–1987	Kreiskrankenhaus Mühlacker
Akademische Ausbildung:	
04/87–02/94	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
04/89	Diplom-Vorprüfungen 1. Teil
06/91	Diplom-Vorprüfungen 2. Teil
04/94	Diplom-Hauptprüfung
10/91–10/92	Einjähriges Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München
04/94–02/95	Diplomarbeit an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Dr. med. Ulrich Lauer mit dem Thema „Versuche zur Veränderung des Tropismus rekombinanter Retroviren für den gewebespezifischen Gentransfer“, wissenschaftliche Mitbetreuung durch Prof. Dr. D. Mecke, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen
03/95–08/99	Dissertation an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Dr. med. Ulrich Lauer mit dem Thema „Etablierung und Charakterisierung eines pseudotypisierten retroviralen Gentransfer-Systems mit Selektivität für den Hepatocyten-spezifisch exprimierten Asialoglycoprotein-Rezeptor“, wissenschaftliche Mitbetreuung durch Prof. Dr. R. Gebhardt, Biochemisches Institut der Universität Leipzig