

Aus den Kliniken für Neonatologie (CCM) und Pädiatrie mit Schwerpunkt  
Pneumologie und Immunologie (CVK)  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Reverse Genetik und rekombinante Viren in der  
Impfstoffentwicklung

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Fadi Chaabo

geboren in Beirut/Libanon

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Al. Schmidt  
2. Prof. Dr. med. D. H. Krüger  
3. Priv.-Doz. Dr. T. Wolff

Datum der Promotion: 03.09.2010

## Widmung

*Ich widme diese Arbeit Sidi Abdessalam Yassine,  
meinen Eltern und meiner Familie,  
meiner Ehefrau und  
meinem Sohn, Yusuf Yassine Chaabo.*

## Inhaltsverzeichnis

Widmung .....	3
Inhaltsverzeichnis .....	4
1. Einleitung .....	6
1.1 Allgemeine Bemerkung .....	6
1.1.1 Allgemeine Virologie .....	6
1.1.2 Paramyxoviridae .....	6
1.1.3 Morphologie der Parainfluenzaviren .....	7
1.1.4 Das virale Genom und die Proteine .....	7
1.1.4.1 Das Nukleokapsidprotein .....	8
1.1.4.2 Das P-Gen und seine Genprodukte .....	8
1.1.4.3 Das Matrix-Protein .....	9
1.1.4.4 Das Fusions-Protein .....	9
1.1.4.5 Das Hämagglutinin-Neuraminidase Protein .....	11
1.1.4.6 Das Large-Protein .....	11
1.1.5 Natürlicher Infektionszyklus .....	11
1.2 Impfstoffe gegen humane PIV .....	13
1.2.1 Klinische Bedeutung des humanen Parainfluenza Virus (HPIV) .....	13
1.2.2 Vorarbeiten mit inaktivierten Impfstoffen .....	13
1.2.3 Lebendimpfstoffe gegen HPIV3 .....	14
1.3 Reverse Genetik .....	17
1.4 Impfstoffe und Immunmodulation .....	18
1.5 Das Interferon $\gamma$ induzierbare Protein 10 (IP10) .....	18
2. Herleitung einer Aufgabenstellung .....	20
3. Material .....	21
3.1 Chemikalien .....	21
3.2 Enzyme .....	21
3.3 Oligonukleotide .....	21
3.4 Plasmide .....	21
3.5 Antikörper .....	21
3.6 Biologisches Material .....	22
3.7 Tiere .....	22
3.8 Geräte .....	22
3.9 Reagenzien für molekularbiologische und immunologische Arbeiten .....	24
3.10 Tierversuchsmaterial .....	28
4. Methoden .....	30
4.1 Allgemeiner Überblick .....	30
4.2 PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion .....	31
4.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	32
4.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	33
4.5 Restriktion von DNA .....	34
4.6 Dephosphorylierung .....	34
4.7 DNA-Ligation .....	34
4.8 Transformation .....	35
4.9 PCR-Screening von Klonen .....	35
4.10 Ansetzen von Übernachtskulturen .....	36
4.11 Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparation .....	36
4.12 Präparation von Plasmid-DNA durch Maxi-Präparation .....	36

## Inhaltsverzeichnis

4.13 DNA-Sequenzierung .....	37
4.14 Anlegen von Dauerkulturen .....	38
4.15 Herstellung des Genoms B/HPIV3-IP10 und Transfektion .....	38
4.16 RNS-Aufreinigung, Amplifikation und Sequenzierung des Inserts .....	40
4.16.1 SDS-Gelelektrophorese .....	40
4.16.2 Immunoblot (Western Blot) .....	41
4.17 Wachstumskurve für rekombinante PIV3, Growth-Curve .....	41
4.18 Tierversuch .....	43
4.18.1 Infektion der Tiere .....	43
4.18.2 Töten der Tiere und Organentnahme .....	43
4.18.3 Zellisolation aus Organen der Baumwollratte .....	43
4.19 Virustiterbestimmung der Lunge .....	44
4.20 Plaquetest .....	44
4.21 Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT) .....	45
4.22 ELISA .....	46
4.23 [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Einbau und Probengewinnung für den ELISA .....	47
4.24 Immunhistochemie und HE .....	48
5. Ergebnisbeschreibung .....	50
5.1 Zweck und Zielsetzung .....	50
5.2 Klonierung des IP10 ORF als zusätzliche Geneinheit in B/HPIV3 .....	50
5.3 Generierung des neuen rekombinanten Virus .....	52
5.4 Sequenzierung des viralen Genoms .....	53
5.5 Überprüfung der Expression des IP10 .....	54
5.6 Wachstumskinetik des B/HPIV3-IP10 .....	55
5.7 Replikation der Viren in Baumwollraten .....	56
5.8 Zytokinbestimmung aus dem Serum und nach Stimulation von PBMC .....	59
5.9 Proliferationstest mit PBMC an Tag 21 post infectionem .....	62
5.10 Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT) .....	64
5.11 Histologie .....	66
6. Diskussion .....	73
6.1 Generierung der Viren und Analyse derselben .....	74
6.2 Replikation und Antikörperantwort in der Baumwollratte .....	75
6.3 Zelluläre Immunantwort .....	76
6.4 Histologie der Lungen .....	81
7. Zusammenfassung .....	83
8. Anhang .....	84
8.1 Primer .....	84
9. Literaturverzeichnis .....	85
10. Danksagung .....	90
11. Lebenslauf .....	91
12. Veröffentlichungen .....	92
13. Erklärung .....	93