

3. Material

3.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen VWR, Invitrogen, NEB, Qiagen, Sigma, DIFCO, BioChemika, Amersham, Biochrom, TibMolbiol und Roth in mikro- bzw. molekularbiologischer oder p. a. Qualität bezogen.

3.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen, DNA-Polymerasen, DNA-modifizierende Enzyme sowie die zugehörigen Puffer wurden von den Firmen Invitrogen (USA), Biozym scientific, Applied Biosystems, New England Biolabs (NEB) und Promega GmbH bezogen.

3.3 Oligonukleotide

Als Bezugsquelle für Oligonukleotide dienten die Firmen TibMolbiol, Biomers und Oligoservice. Spezifische Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Programme Bio-Edit und Fast-PCR entworfen. Eine Übersicht der verwendeten spezifischen Primer ist im Anhang dargestellt.

3.4 Plasmide

Das pSport Plasmid mit integriertem Interferon γ induzierbarem Protein-10 Gen (IP-10) der Baumwollratte wurde von Virion-Systems bezogen. Das pGEM-T Plasmid wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

3.5 Antikörper

Im Rahmen der Virustitration wurden die folgenden Antikörper verwendet:

Als Erstantikörper wurde ein in Ziegen hergestelltes kommerzielles polyklonales Antiserum gegen HPIV3 von US Biological (P -3107-21A) verwendet. Die in dem Antiserum enthaltenen Antikörper detektieren die HPIV3 Glykoproteine F und HN.

Material und Methoden

Der Zweitantikörper wurde von der Firma Rockland bezogen. Es handelt sich um einen Meerrettichperoxidase konjugierten anti-Ziege-IgG Antikörper (605-4302), der in einem Hasen erzeugt wurde.

Für ELISAs wurden die folgenden Antikörper von R&D Systems verwendet:

1. Muriner Antikörper gegen Baumwollratten Interleukin 4 (IL-4) (Artikelnummer 840956)
2. Detektions-Antikörper (Part 840957) biotinierter Ziege anti-Baumwollratten IL-4-Antikörper.
1. Bindungs-Antikörper (Part 840821) Ziege anti-Baumwollratten Interferon γ (IFN- γ)
2. Detektions-Antikörper (Part 840822) biotinierter Ziege anti-Baumwollratten IFN γ Antikörper.

3.6 Biologisches Material

Kompetente *Escherichia coli* Stamm XL1 Blue

Rhesusaffen-Nierenzellen (LLC-MK2-Zellen), (ATCC)

Larynxkarzinomepithelzellen (Hep2-Zellen), (Bio Whittaker Europe)

Parainfluenza-Wildtypvirus 3 (PIV3), aufgereinigt, (NIH)

Bovine/humanes Parainfluenza Virus 3 (B/HPIV3), aufgereinigt, (NIH)

Modifiziertes *vaccinia virus ankara* (MVA T7)

3.7 Tiere

Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*)

3.8 Geräte

Brutschrank:

HeraCell (Heraeus)

Material und Methoden

ELISA-Reader	Bio RAD 450
Gelelektrophorese-Apparatur:	GNA-100 (Pharmacia) Harnischmacher-Labortechnik
Geldokumentationssystem:	Digitalkamera Olympus 5050 Zoom Software: Cam2Com (Menchenim)
Harvester	Innotech
Heizblock:	Thermomixer comfort (Eppendorf)
Homogenisator	Omni TH 220 international
Fluoreszenzmikroskop:	Axiovert 135 (Zeiss)
Mikroskop:	Diavert (Leitz)
Kühlschrank	Liebherr Comfort
PCR-Thermocycler:	Personal Cycler (Biometra)
Sterilwerkbänke:	Hera Safe (Heraeus)
Tiefkühlanlage	Hera freeze
UV-Transilluminator:	Biometra FLX-20M (Biometra)
Zentrifugen:	Heraeus Minifuge GL (Heraeus) Sigma Laborzentrifuge 3K15

3.9 Reagenzien für molekularbiologische und immunologische Arbeiten

Für den routinemäßigen Gebrauch in der Molekularbiologie wurden die Lösungen nach dem von Sambrook *et al.* (1989) herausgegebenen Standardwerk *Molecular Cloning* angesetzt. Durch Autoklavieren oder bei Hitzeempfindlichkeit der Bestandteile durch Sterilfiltrieren (Satorius Membranfilter, Porengröße 0,2 µm) wurden sterile Lösungen hergestellt. Sämtliche Lösungen wurden dabei mit deionisiertem Wasser angesetzt

Im Folgenden werden die Bestandteile jener Lösungen angegeben, die selbst hergestellt wurden oder aber deren Bestandteile von den Herstellern öffentlich gemacht wurden.

AmpliTAQ Gold (Applied Biosystems)	250 Units/ <i>tube</i>
Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml Ampicillin, sterilfiltriert
Antarctic Phosphatase (AP, NEB)	Glycerol 50%, Magnesium < 1%, Chlorid < 1%, DTT < 1%
AP-Puffer (10x, NEB)	Bis Tris Propan < 1%, Magnesiumchlorid < 1%, Zinkchlorid < 1%
Bakterien-Resuspendierungspuffer (Qiagen)	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA enthält 100 mg/ml RNase A
Bakterien-Lysispuffer	200 mM NaOH,

Material und Methoden

(Qiagen)	1,0 % SDS
Bakterien-Neutralisationspuffer (Quiagen)	3,1 M KAc, pH 5,5
Blockierungslösung (BioChemika)	50ml 10x PBS, 450ml dH ₂ O, 25 mg Milchpulver
DNA-Probenpuffer	4xTBE ml, FICOLL-400 10%, SDS 0,4%, Bromphenolblau 8,0mg
dNTP-Mix (Invitrogen)	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
Einfrier-Lösung	10 % DMSO in FCS
ELISA-Waschpuffer (R&D Systems)	0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4
ELISA-Reagent Diluent (R&D Systems)	1% BSA in PBS, pH 7,2-7,4
ELISA-Substrat-Solution (R&D Systems)	1:1 Mischung von Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)
ELISA-Stop-Solution	2N H ₂ SO ₄
EMEM Zellkulturmedium (Biochrom)	25 ml FCS, 10 ml Glutamin (200 mM), 0,625 ml Gentamycin (40mg/ml)

Material und Methoden

Ethidiumbromid-Lösung (Serva)	für Gele: 10 mg/ml Ethidiumbromid, 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Agarose-Gellösung
Gentamycin-Stammlösung	40mg/ml, sterilfiltriert
LB-Agar	1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,5 % (w/v) Agar, 1 % (w/v) NaCl, auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert
Overlay-Medium	4 g methylcellulose, 500 ml OptiMEM, 10 ml FBS, Gentamycin (40 mg/ml) 0,625 ml
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert
1x PCR-Reaktionspuffer (<i>Taq</i>)	50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,1 % Triton X-100,

Material und Methoden

	0,02 mg/ml BSA, pH 9,0		
Penicillin/Streptomycin Stammlösung	10mg/ml		
RPMI Zellkulturmedium	10% FCS, Penicillin/Streptomycin und 0,05 mM β - Mercaptoethanol		
SDS-Reagenzien:			
		8%TG	4,5%SG
Acryl/Bisacrylamid	40%/0,8% (wt/v)	6000ul	1126ul
Tris/HCL-Puffer (Sammelgel, SG)	0,5M, pH 6,8		2500ul
Tris/HCL-Puffer (Trenngel, TG)	1,5M, pH 8,8	7500ul	
SDS	10% (wt/v)	300ul	100ul
TEMED		20ul	6ul
Ammoniumperoxidsulfat	10% (wt/v)	300ul	100ul
		ad 30ml	ad 10ml
		Aqua. dest.	
Doppelt konzentrierter SDS-PAGE Auftragspuffer	62.5mM Tris/HCL pH 6,8, 2% SDS, 20%Glycerol, 75mM DTT, Bromphenolblau ad lib.		
Elektrophoresepuffer	Tris 25 mM, Glycin 192 mM, SDS 0,1 % (wt/v)		
Western Blot Reagenzien:			
Kathodenpuffer	0,025 M Tris-Base, 0,04 M e-Animocapronsäure, 20% Methanol (v/v)		
Anode-I-Puffer	0,03 M Tris-Base/20% Methanol (v/v)		
Anode-II-Puffer	0,3 M Tris-Base/20% Methanol (v/v)		
t-TBS	Tris-Base 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1% (v/v)		

Material und Methoden

TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)	10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat ; 10 mM EDTA
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % (w/v) Trypsin, 5 mM Na ₂ EDTA in PBS (pH 7,4), sterilfiltriert
T4-DNA-Ligase-Puffer (NEB)	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 1 mM ATP, 0,025 % (w/v) BSA
T4-DNA-Ligase (NEB)	2.000.000 U/ml

3.10 Tierversuchsmaterial

Ketamin	(Ketavet, 50mg/ml)
Xylazin	(Rompun, 2%Lsg.)
Isofluran	
Eppendorff-Gefäß, 2ml	Eppendorff
Sarstedt-Rundbodenröhrchen	Sarstedt
27G-Kanülen,	Braun
Sterile Becher zum Auffangen des Bluts	
Spritzen, 2ml,	Braun
Falcon, 15ml	Falcon
Röhrchen, Kryo,	Nalgene
Heparinröhrchen,	Vacutainer

Material und Methoden

Präparierbesteck,	Aesculap
Sterile Fäden,	Ethicon
Sterile Flexülen	Braun
Kryomedium, Einbettmedium für Gefrierschnitte	
PBS, Dulbecco,	PAA
Concanavalin A,	Sigma
RPMI-Medium,	Biochrom
RNA-Later	
Cell Strainer 100 µm; 70 µm; 40 µm	BD Falcon

4. Methoden

Gentechnologische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 wurden unter Beachtung der entsprechenden Sicherheitsvorschriften (Gentechnikgesetz) durchgeführt. Der Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) erfolgte ausschließlich in den dafür ausgewiesenen Räumlichkeiten. Der Tierversuch wurde am 15.05.2006 genehmigt, die Genehmigungsnummer lautet: G 0100/06.

4.1 Allgemeiner Überblick

Ziel der molekularbiologischen Arbeiten war es das IP-10-Insert in das bovine/humane Parainfluenzavirus 3 (B/HPIV3) zu klonieren. Das IP-10-Insert wurde von Virion-Systems im pSport Vektor geliefert, woraufhin es mit *SbfI* veränderten Primern (s. Anhang) durch eine PCR vervielfältigt und in den pGEM-T Vektor kloniert wurde. Nach Sequenzierung mit IP10 spezifischen Sequenzierungsprimern (s. Anhang), wurde das mit *SbfI* herausgeschnittene IP10 Insert in den in der Arbeitsgruppe schon vorhandenen modifizierten B/HPIV3 kloniert, der das Genende/Intergenischer Bereich/Genstart-Signal (GE/I/GS) besitzt, das für eine korrekte Transkription unerlässlich ist.

Im ursprünglichen B/HPIV3 Genom war die *SbfI*-Schnittstelle noch nicht vorhanden. Diese wurde aber in Vorarbeiten unter Integrierung von GE/I/GS-Signalen eingefügt. Um zu überprüfen, ob das Insert in der richtigen Richtung integriert wurde, wurde ein Richtungsscreening durchgeführt, der die richtige Richtung des eingebauten IP10 bestätigte. Anschließend wurde das gesamte Konstrukt mit B/HPIV 3 und IP10 Primern sequenziert.

Nach Generierung des Virus mit den dazu nötigen Hilfsplasmiden wurde das neu generierte Virus isoliert und die IP10 mRNA sequenziert. Das Wachstumsverhalten wurde über eine in-vitro-Kinetik überprüft. Weiterhin konnte die Translation des klonierten IP10 anhand eines Western Blots nachgewiesen werden.

Dann schloß sich der Tierversuch an, in dem nach Inokulation des neu hergestellten Impfstoffes die Zell- und Antikörperantwort gemessen wurde. Dazu wurde nach dem Töten der Tiere eine Virustiterbestimmung der Lungen, einen Proliferationstest mittels [³H]-Thymidineinbau, Zytokinbestimmungen, einen Plaquereduktionsneutralisationstest und die Histologie der Lungen durchgeführt.

Die Arbeitsschritte waren folgende:

Material und Methoden

1. PCR mit einer SbfI-Schnittstelle enthaltenen Primern aus dem pSport Vektor
2. Klonierung des IP10 Gens der Baumwollratte in den pGEM-T Vektor und Sequenzierung des Inserts
3. Verwendung eines in der Arbeitsgruppe modifizierten Genoms, das die Genend-intergenischer Bereich und Genstartsignale besitzt (B/HPIV3, GE/I/GS)
4. Klonierung des IP10 Gens durch Sbf-Schnitt in das virale Antigenom
5. Richtungsscreen und Aufreinigung der DNA
6. Transfektion von HEp-2 Zellen mit allen Plasmiden des Rescue-Systems
7. In-vitro Generierung des Virus und anschließendes Sequenzieren der IP10 mRNA
8. Western Blot des neuen Virus mit Nachweis von IP-10
9. In-vitro Kinetik
10. Infektion von Baumwoll-Ratten
11. Bestimmung der PIV3-spezifischen Zell- und Antikörperantwort

Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit Hilfe der 2008 GraphPad Software Inc. software durchgeführt. Der korrigierte Students T-test für ungleiche Varianzen, der one-way ANOVA mit einem posthoc Fischer's PLSD test und der Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test, wurden bei entsprechendem Studiendesign angewendet. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SE) dargestellt.

4.2 PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion

In einem Gesamtvolumen von 25 μ l erfolgten die PCR-Reaktionen. Als *template* dienten die jeweiligen Plasmide. Zu 0,1 μ l (entsprechend 5 ng) DNA wurde folgender PCR-Mix gegeben (25 μ l Gesamtvolumen):

2 x 1 μ l 5'-Primer (*sense*)/3'-Primer (*antisense*)

0,5 μ l dNTP-Mix (je 10 mM)

2,5 μ l PCR-Reaktionspuffer für *Taq*

0,5 μ l *Ampli-Taq*-Gold DNA-Polymerase

18,5 μ l H₂O

Die IP10 PCR-Reaktion aus dem pSport-Vektor und die anderen Reaktionen wurden mit dem im folgenden dargestellten Standard-PCR-Programm (s. Tab. 1) durchgeführt.

Tabelle 4.1. **Standard-PCR-Programm**

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	95°C	10min	
2	95°C	30sec	
3	49°C	30sec	Schritt 2-4, 5 Zyklen
4	72°C	90sec	
5	95°C	30sec	Schritt 5-7, 25 Zyklen
6	55°C	30sec	
7	72°C	90sec	
8	72°C	7min	
9	4°C	∞	

4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die zu herstellenden Gele unterschieden sich in dem Gehalt von Agarose. Je nach Basenlänge wurde ein geeignetes Gel hergestellt, sodass die aufgetragenen Proben eine optimale Wanderungsgeschwindigkeit besaßen. Für die Versuche wurden Gele mit einer Konzentration zwischen 0,7%-2% benutzt.

Herstellung eines 1%Geles:

1. Lösen von 1g Agarose in 100ml TAE-Puffer
2. Anschließendes kurzes Aufkochen
3. Bei einer Temperatur von etwa 50°C mit 0,5µg Ethidiumbromid pro ml Agarose-Gellösung versetzen
4. Abgießen in die bereitgestellten Kammern und abkühlen lassen

Charakterisierung und Isolierung von DNA-Fragmenten:

Die zu untersuchende DNA-Probe wurde mit 10 x DNA-Probenpuffer, wobei der DNA-Puffer 1/10 des Gesamtvolumens ausmacht, versetzt. Nach Positionierung der Gele in die Elektrophoreseapparatur und Auftragen der Proben erfolgte die Wanderung bei einer Spannung um 85 V in 1 x TAE-Puffer. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators erfolgte die Detektion der DNA-Banden. Die Größe und Menge der einzelnen DNA-Banden konnte durch den Vergleich mit verschiedenen DNA-Molekulargewichtsmarkern abgeschätzt werden. Es wurden ein 50bp-, ein 100bp-, und ein 500bp-Molekulargewichtsmarker verwendet (s. Tab.2).

Tabelle: 4.2. **Molekulargewichtsmarker**

Marker	Reichweite	Bandenabstand	Letzte Bande	Dickste Bande
M 50	50-800	50er-Schritte	2652	350
M 100	100-1500	100er-Schritte	2072	605
M 500	500-8500	500er-Schritte	8500	2000

4.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach Lokalisation der zu isolierenden DNA-Bande mithilfe eines UV-Transilluminators wurde sie mit einem Skalpell ausgeschnitten. In einem vorher gewogenen 1,5 ml-Eppendorfgefäß wurde das Gewicht des extrahierten Gelstückes bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass das Gewicht in mg etwa dem Volumen in µl entspricht.

Durchführung:

1. Das Gelstück mit dem dreifachen Volumen QG (Qiagen)-Puffer versetzen und 10 min bei 50 °C inkubieren
2. Nach Lösen des Gelstückes das Gemisch mit einem Gelvolumen Isopropanol versetzen
3. Auf ein 2 ml-Mikrozentrifugengefäß eine QIAquick (Qiagen)Säule platzieren, die Lösung auf die Säule geben und eine Minute bei 13.000 rpm mit der Heraeus Minifuge GL zentrifugieren
4. Die gebundene DNA mit 750µl PE-Puffer (Qiagen) waschen (1 min bei 13 000 rpm)
5. Zur vollständigen Entfernung des ethanolhaltigen PE-Puffers erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

6. Die QIAquick Säule nun in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen und die DNA mit 50µl Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm eluieren
7. Die DNA-Fragmente bei -20°C lagern

4.5 Restriktion von DNA

Die Plasmide wurden in einem 25 µl Ansatz nach Zugabe des entsprechenden Restriktionsenzym und in einigen Fällen mit Bovinem Serum Albumin (BSA) für mindestens zwei Stunden im entsprechenden Puffer bei 37°C inkubiert (s. Tab.3.3). In einigen Fällen musste danach das Enzym für 30 min bei 80°C inaktiviert werden.

Tabelle: 4.3. verwendete Enzyme und Puffer

Enzyme	Restriktionspuffer
<i>PstI</i>	Puffer 3 (NEB) + BSA
<i>BlnI</i>	Puffer 2, 4(NEB)
<i>NdeI/SbfI</i>	Puffer 4 (NEB)
<i>NcoI/SacI</i>	Puffer 1 (NEB) + BSA
<i>SacI</i>	Puffer 1 (NEB)

4.6 Dephosphorylierung

Nach Restriktion der Plasmide erfolgte die Dephosphorylierung durch Zugabe der Antarctic Phosphatase (AP) und des AP-Puffers. Das Puffervolumen sollte 1:10 des Endvolumens betragen. Die Inkubationszeit betrug 1h bei 37 °C. Im Anschluss erfolgte die Hitzeinaktivierung für 15 min bei 70 °C.

4.7 DNA-Ligation

Sowohl das SbfI geschnittene Eluat-Produkt als auch der B/HPIV3 (+GE/I/GS-Signal) wurden auf 50 ng/µl eingestellt. 1 µl Vektor, 2 µl Insert-DNA, 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer und 2 µl

T4-DNA-Ligase wurden gemischt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

Tabelle: 4.4. **Ligationsansatz**

Ansatz
1 µl (= 50 ng) B/HPIV3 (+GE/I/GS-Signal) mit 2 µl (=100 ng) Eluat der Insert-DNA + 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer + 2 µl T4-DNA-Ligase + 13 µl H ₂ O

4.8 Transformation

Die kompetenten E. coli-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und resuspendiert. 2µl der Ligationsansätze wurden mit jeweils 18 µl TE-Puffer versetzt, um einen zweiten Ansatz mit einer Verdünnung von 1:10 zu erhalten. Es resultierten zwei Verdünnungen jedes Ligationansatzes für die Transformation.

Durchführung:

1. Je 60 µl kompetente Zellen mit 15 µl der Ligationsansätze versetzen, mischen und 30 min auf Eis inkubieren
2. Die Transformationsansätze 45 s bei 42°C und dann 3 min auf Eis inkubieren
3. Zu jedem Transformationsansatz 0,5 ml SOC-Medium hinzufügen und 1h bei 37°C im Brutschrank inkubieren
4. Die Zellen auf LB-Selektivagarplatten (30 µg/ml Streptomycin und 50 µg/ml Ampicillin) ausplattieren
5. Die Agarplatten dann für 16 bis 20 h bei 37°C inkubieren

4.9 PCR-Screening von Klonen

Um zu überprüfen, ob die Ligation erfolgreich war, wurde ein PCR-Screening der Klone durchgeführt. Dazu wurde je Ansatz 0,5 µl der Primer (10 pmol/µl), 0,3 µl Taq, 1 µl Puffer, 0,5 µl dNTP, 2,5 µl H₂O mit 5 µl einer TE-Suspension einer Bakterienkolonie versetzt.

Anschließend wurde das Gemisch dem Standard-PCR-Programm unterzogen. Auf ein 2 %iges Agarosegel wurde der Ansatz aufgetragen und elektrophoretisch kontrolliert.

4.10 Ansetzen von Übernachtskulturen

3 ml LB-Selektivmedium (50 µg/ml Ampicillin) wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Klones inokuliert und bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden am folgenden Tag für Plasmidminipräparationen verwendet.

4.11 Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparation

Durchführung:

1. 1,5 ml der Übernachtskulturen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen und 1 min bei 17,900 g zentrifugieren
2. Diesen Vorgang mit wiederum 1,5 ml der jeweiligen Übernachtskultur wiederholen
3. Danach das Zellsediment in 200 µl Resuspendierungspuffer, P1-Puffer (Qiagen), aufnehmen
4. Nach Zugabe von 250 µl Lysispuffer, P2-Puffer (Qiagen), das Gefäß mehrfach invertieren
5. Die Suspension anschließend mit 350 µl Neutralisationspuffer, N3-Puffer (Qiagen), versetzen
6. Das faserige Sediment durch mehrfaches Invertieren verteilen, 10 min bei 17,900 g zentrifugieren und der vom ausgefallenen Proteinpellet getrennte Überstand auf eine zuvor in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß plazierte Silica Spin Säule geben
7. Nach einminütiger Zentrifugation bei 17.900 g den Durchfluss verwerfen und die an die Membran gebundene Plasmid-DNA mit 500 µl PE-Puffer beladen
8. Anschließend für 1 min zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen
9. Zur vollständigen Entfernung des Ethanol-haltigen Waschpuffers erneut zentrifugieren
10. Die Silica Spin Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
11. Die Plasmid-DNA mit 30 µl Wasser durch Zentrifugation von der Säule eluieren

4.12 Präparation von Plasmid-DNA durch Maxi-Präparation

Nach Ansetzen von Übernachtskulturen wurden die Suspensionen mit einem Volumen von 3 ml in 300 ml vorgelegtes Medium überführt und wieder für eine Nacht bei 37°C und 180 rpm

inkubiert. Es erfolgte nach Überführung in ein geeignetes Gefäß die Zentrifugation bei 3220 g für fünfzehn Minuten bei 4 °C.

Durchführung:

1. Das Pellet in 10 ml Resuspendierungspuffer, P1-Puffer (Qiagen), aufnehmen, nachdem der Überstand verworfen wurde
2. Anschließend eine ebenso große Menge an Lysispuffer, P2-Puffer (Qiagen), hinzugeben
3. Nach fünfmaligem invertieren erfolgt eine fünf minütige Inkubation bei Raumtemperatur
4. Eine gleiche Menge an Neutralisationspuffer, N3-Puffer (Qiagen), hinzugeben
5. Die Suspension nach mehrmaligen invertieren für 20 Minuten auf Eis inkubieren
6. Anschließend 30 Minuten bei 3220 g und 4 °C zentrifugieren und den Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, in ein frisches Gefäß überführen und noch einmal bei 3220 g für 15 min zentrifugieren
7. Den Überstand nach Äquilibration auf die Qiagen-tip-Säule geben
8. Die Säule nach Durchlauf des Überstandes mit 2x 30 ml QC-Puffer (Qiagen) waschen
9. Die Elution erfolgt mit 15 ml QF-Puffer (Qiagen)
10. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol erfolgt das Ausfällen der DNA
11. Das Gemisch bei 3220 g für 30 min bei 4°C zentrifugieren und den Überstand verwerfen
12. Die nun erhaltene DNA mit 5 ml 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur für 15 min zentrifugieren
13. Den Überstand vorsichtig dekantieren
14. Die DNA nun lufttrocknen und dann in Wasser aufnehmen

4.13 DNA-Sequenzierung

Es wurden 350 ng Plasmid-DNA mit 0,5 µl (100 pmol/µl) Sequenzier-Primer, 0,5 µl BigDye-Reaktionslösung (Applied Biosystems), 1,5 µl Sequenzier-Puffer (Applied Biosystems) und 7 µl H₂O versetzt. Die *cycle sequencing*-Reaktion erfolgte in einem PCR-Thermocycler (s.Tabelle 4.5).

Durchführung:

1. Den Reaktionsansatz zur Reinigung der Sequenzierprobe mit 100 µl absolutem Ethanol versetzen und nach halbstündiger Inkubation bei -20°C für 20 min bei 10.000 g zentrifugieren
2. Anschließend die Probe mit 100µl 70%igem Ethanol versetzen und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren, um sie dann für 10 min bei 10.000 g zu zentrifugieren
3. Nach Entfernung des Überstandes die DNA für eine Minuten bei 90°C trocknen

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch Mitarbeiter des Servicelabors am Institut für Medizinische Genetik des Universitätskrankenhauses Berlin Charite Campus Virchow auf einem ABI Prism3100 DNA-Sequencer der Firma Applied Biosystems. Die DNA-Sequenz wurde in Form eines Vier-Farben-Elektropherogramms dokumentiert. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle: 4.5. PCR-Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	1min	
2	96°C	15sec	
3	50°C	5sec	Schritt 2-4,
4	60°C	4min	25 Zyklen
5	10°C	∞	

4.14 Anlegen von Dauerkulturen

500 µl der Bakterienkultur wurden mit 400 µl Glycerol-Lösung versetzt und anschließend bei -80°C gelagert.

4.15 Herstellung des Genoms B/HPIV3-IP10 und Transfektion

Die Herstellung von Viren durch das reverse Genetik System für Negativstrangviren ist seit 1994 erfolgreich und stetig fortschreitend. Die Viren lassen sich in vitro herstellen, indem man Plasmide benutzt, die das minimale nötige genetische Material enthalten, damit das Virus sich replizieren kann. Dazu wird das modifizierte Vaccinia Ankara Virus (MVA) mit vier Plamiden, die das Antigenom, das L-Protein (pTM (L)), das N-Protein (pTM (N)) und das P-Protein (pTM (L)) exprimieren, in für das Viruswachstum geeignete Zellen tranfiziert. Die Plasmide stehen alle unter Kontrolle des Bakteriophagen T-7 RNA Polymerase Promoters. Nach Transfektion entsteht das Antigenom, der Polymerasekomplex (P- und L-Protein) und das N-Protein zur Anlagerung an die RNA, durch die im MVA mittransfizierte T7-RNA-Polymerase.

Material und Methoden

Nachdem sich der nun neu gebildete Polymerasekomplex an das Antigenom mit schon gebundenem N-Protein angelagert hat und das Genom repliziert wurde, kann die mRNA für die jeweiligen Gene transkribiert werden. Der Übergang von Transkription zu Replikation wird durch die Konzentration nicht verpackten Nucleokapsids reguliert, sodass dann das Virus gebildet werden kann.

Vorbereitung: Ansetzen von HEp-2 Zellen mit einer 90%igen Konfluenz. Alle zur Transfektion nötigen Plasmide wurden vom National Institutes of Health (Bethesda) zur Verfügung gestellt.

Durchführung:

1. 15 µl Lipofectamin mit 185 µl OptiMEM (ohne Zusätze) mischen
2. Genom und Hilfsplasmide mischen
pTM (N) 0,2µg
pTM (P) 0,2µg
pTM (L) 0,1µg
B/HPIV3-IP10 5µg auf 200µl auffüllen mit OptiMEM plus Lipofectamin
3. 20 min. bei Raumtemperatur inkubieren
4. 3×10^7 MVA-T7 in 0,8 ml OptiMEM plus 2% FCS geben
5. Ultraschall drei mal für 2 sec. Einwirken lassen
6. MVA zu der Plasmid-Lösung zugeben und auf Hep2 –Zellen geben
7. Ca. 12 h bei 32 °C inkubieren, dann Mediumwechsel um die Zytotoxizität des MVA und des Lipofectamin zu reduzieren
8. Zwei weitere Tage bei 32°C inkubieren, dann auf Zellkulturflaschen (25cm²) mit vorbereiteten LLC-MK2-Zellen geben. Die Zellen werden zwei Stunden mit dem Überstand infiziert und es folgt dann ein Mediumwechsel
9. Der Überstand wird wöchentlich auf kleinen Zellkulturflaschen wie in Punkt 8. passagiert bis ein Zytopathischer Effekt zu sehen ist
10. Mit der Virussuspension werden nun große Flaschen angeimpft, deren Überstand nach vier Tagen weggefroren wird

4.16 RNS-Aufreinigung, Amplifikation und Sequenzierung des Inserts

Die RNS-Aufreinigung erfolgte mit dem QIAamp Viral RNS Mini Kit und das Vorgehen nach dem Handbook desgleichen.

Im Anschluss an die Aufreinigung folgte die reverse Transkriptase (RT) mit Hilfe von oligo-dT-Primern. Die erhaltene cDNS wurde mit mRNA spezifischen Primern, die im Anhang dargestellt sind, zur anschließenden Sequenzierung amplifiziert. Die Amplifikation diente der Überprüfung des IP10 Inserts, das keinen Aminosäureaustausch zeigte. Die PCR erfolgte nach dem Standard PCR Programm wie in Tab. 4.1 beschrieben, jedoch wurde ein 50 µl Ansatz gewählt, um eine größere Ausbeute zu erhalten. Die Sequenzierreaktion erfolgte mit IP10 spezifischen Primern, die im Anhang dargestellt sind, analog der Tabelle 4.5.

Durchführung der RT:

1. Zugabe von 2 µl oligo-dT-Primer (50 ng/ µl), 1 µg RNS, 2 µl dNTPs (jedes Nukleotid 10 mM) in einem Gesamtvolumen von 13 µl für 5 min auf 65 °C erhitzen
2. Auf Eis stellen, dann 4 µl First Strand Buffer (Invitrogen) und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (Invitrogen) hinzugeben und das Gemisch 2 min bei 37 °C inkubieren
3. Zusatz von 1 µl RT des Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV-RT, Invitrogen, 200 U/µl) und weitere 60 min bei 37 °C inkubieren
4. Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min

4.16.1 SDS-Gelelektrophorese

LLC-MK 2 Zellen wurden mit B/HPIV3-IP10 infiziert und 72 Stunden bei welcher Temperatur inkubiert. Zellysate wurden mit der entsprechenden Menge 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 3 Minuten auf 95°C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen. Durch das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde erreicht, dass die Proteine nicht nur gelöst wurden, sondern auch eine konstante negative Gesamtladung pro Masseinheit erhalten, sodass ihre elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Proteins abhängt. Durch Dithiothreitol (DTT) werden Disulfidbrücken in den Proteinen reduziert. Bei einer „diskontinuierliche SDS-PAGE“ wird ein Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite (5%) vor dem eigentlichen Trenngel verwendet. Es wird durch die Ionenwanderung vor den Proteinen und die dadurch hervorgerufene erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit eine Fokussierung der Proteine in einer scharfen Bande beim Eintritt ins Trenngel bewirkt.

Durchführung:

Nach Ladung der Proteine auf ein Gel wanderten die Proteine zunächst im Sammelgel bei 30 mA (max.250Volt) für 60 Minuten in Richtung Anode. Danach wurden die Proteine im Trenngel für 60Minuten bei 30 mA voneinander getrennt.

4.16.2 Immunoblot (Western Blot)

Western Blot

Mittels der Western Blot-Analyse können Identität, Größe und relative Menge der exprimierten Proteine bestimmt werden.

Durchführung:

1. Unmittelbar im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese erfolgt der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine proteinbindende Membran nach dem Tank-Blotting-Verfahren
2. Inkubation durch 5% Magermilchpulver über Nacht bei 4°C
3. Nach drei Waschschritten mit Waschpuffer und 1-2h-zweistündiger Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:1000 in Blotting-Reagent), folgen erneute Waschschrritte, welche überschüssige Antikörper, die keine Antigen-Antikörper-Bindung eingehen, entfernen
4. Der Sekundärantikörper, mit dem die Membran anschließend unter gleicher Vorgehensweise wie bei dem Primärantikörper inkubiert wird (Verdünnung 1:10000 in Blotting-Reagent), ist zur Detektion an das Enzym Meerrettich-peroxidase gekoppelt
5. Für die Chemolumineszenzreaktion, welche die an die Proteine gebundenen Antikörper sichtbar macht, wird die Membran für zwei Minuten in einer Visualisierungslösung inkubiert
6. Ein Röntgenfilm hält die Lichtemission der Membran fest und wird anschließend in einer Dunkelkammer entwickelt

4.17 Wachstumskurve für rekombinante PIV3, Growth-Curve

Eine Aussage über das Wachstumsverhalten mehrerer Viren im Vergleich kann durch eine Wachstumskinetik überprüft werden. Es zeigt sich ob ein Virus X in der Zellkultur genauso gut wächst wie ein Vergleichsvirus.

Durchführung:

Material und Methoden

Drei Tage vor der Infektion:

Es wurden LLC-MK-2 Zellen in 6-well-Platten ausgesät. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass sie am Tag der Infektion 70-80% Konfluenz erreicht haben. Pro Virus wurden 2 wells benötigt, 2 zusätzliche für die Kontrollinfektion mit dem Wildtypvirus.

Infektion

Es wurde eine MOI von 0,01 gewählt, dh. das Verhältnis Virus zu Zellen beträgt 1 zu 100. Die Zellzahl betrug $1,5 \times 10^6$ Zellen, weshalb die Viren auf $1,5 \times 10^4$ Viren verdünnt und pro well zugeben wurden.

1. Einstellen der Virustiter auf 3×10^4 Viren/ml
2. Abnahme des Mediums
3. Zugabe von 500µl-Virussuspension (also $1,5 \times 10^4$ Viren)
4. Inkubation bei RT auf Schüttler für 2-3 Stunden
5. Dreimaliges vorsichtiges Waschen der wells mit vorgewärmten 1x PBS
6. Zugabe von 5 ml Medium (normales MK2-Kulturmedium)
7. Abnahme von 2 ml des gerade zugegebenen Mediums, die anschließend in 4x 0,5ml bei -80°C eingefroren werden. (=Nullwert)

Virus-infizierte Zellen wurden bei 32°C und 5 %CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Probenentnahme

Anschließend wurden alle 24 Stunden für 7 Tage jeweils eine Probe gezogen und in 4x 0,5ml bei -80°C eingefroren. Die entnommene Menge Flüssigkeit wurde durch frisches Medium ersetzt.

Titration

Die gezogenen Proben wurden nun einzeln mit Hilfe eines Plaque-Tests (einheitliche Methode!) titriert und es wurde eine Wachstumskurve der Viren über die Zeit aufgestellt.

4.18 Tierversuch

4.18.1 Infektion der Tiere

Die Baumwollratten wurden in speziellen pathogenfreien Filterkäfigen gehalten. Die Infektion erfolgte mit ca. 8 Wochen. Dazu wurden die Tiere zum besseren Umgang mit einem leicht mit Isofluran befeuchteten Handtaschentuch betäubt um im nächsten Schritt eine intramuskuläre Injektion mit 150 µl einer 1:1 Mischspritze Ketamin (50mg/ml) und Xylazin (2%) zu erhalten. Die Infektion erfolgte intranasal in vier Einzelschritten zu je 25 µl mit ca. $5 \cdot 10^6$ pfu/ml PIV3wt, B/HPIV3-IP10 und B/HPIV3.

4.18.2 Töten der Tiere und Organentnahme

Nach Betäuben und intramuskulärer Narkose wie in Punkt 4.18.1 erfolgte das Töten der Tiere an Tag 21 durch Dekapitation nach vorheriger Desinfektion der Halsregion mit Ethanol. Das Blut, ca. 2 ml, wurde in sterilen Bechern mit 1 ml vorgelegtem NaCl aufgefangen und durch Spülen mit ca. 1 ml Kochsalzlösung versetzt und dann in Heparinröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Organentnahme von Lunge nach medianer Eröffnung von Thorax und Abdomen.

4.18.3 Zellisolation aus Organen der Baumwollratte

PBMC-Isolierung und Plasmaentnahme für PRNT

Die Gewinnung von PBMC (*mononukleäre Zellen des peripheren Blutes*) erfolgte nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation. Als Lymphozytentrennmedium wurde Ficoll-Paque (GE-Healthcare) benutzt. Bei der Zentrifugation des Ficollgradienten entstehen vier Phasen: die obere Plasma-Phase, die darunter liegende weißliche Bande enthält die Lymphozyten und Monozyten, dann folgt das Trennmedium Ficoll, und unterhalb des Ficollkissens sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten an.

Durchführung:

1. 3ml Ficoll-Trennlösung in ein Röhrchen pipettieren
2. Ficoll-Trennlösung mit 4ml heparinisiertem und mit Kochsalzlösung verdünntem Cotton-Rat-Blut besonders vorsichtig überschichten; hierzu das Röhrchen etwas schräg halten und das Blut mit einer Pipette vorsichtig am Rand ablaufen lassen
3. Röhrchen vorsichtig in die Zentrifuge stellen und bei 800 g 20 min zentrifugieren

4. An der Grenze der Phasen bildet sich ein weißer Ring, in welchem sich die Lymphozyten befinden. Diesen Ring vorsichtig mit einer Pasteurpipette abheben und in ein neues Röhrchen überführen
5. Überstand abnehmen und für Antikörpernachweisverfahren einfrieren
6. Überführen der Lymphozyten in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen
7. Zugabe von 6 ml PBS
8. Vorsichtiges Suspendieren der Zellen
9. Zentrifugation der Zellen bei 300g für 10 min
10. Überstand verwerfen
11. Waschschrift wiederholen
12. Überstand verwerfen
13. Zellen in Zellkulturmedium aufnehmen
14. Zellzählung in 3 %Essigsäure (1:20) oder 0,5 %Trypanblau (1:5) durchführen

4.19 Virustiterbestimmung der Lunge

Zur Bestimmung des Virustiters benutzen wir 6-*well*-Platten. Eine große Flasche mit 175 cm² reichte zur Herstellung von sechs 6-*well*-Platten aus. Wir setzten das Overlaymedium mind. fünf Tage vor Virustiterbestimmung an. Um das Virus zu titrieren war es nötig die Lungenzellen zu homogenisieren.

Durchführung:

1. Wiegen der Lungen in Sarstedtröhrchen
2. Mit Medium auf das 20-fache des Lungengewichts auffüllen
3. Homogenisieren
4. Zentrifugieren (10 min bei 600 g)
5. Je 500 µl des Überstandes in well 1 (1:20Verdünnung)
6. Nun folgt der Plaquetest, siehe 4.20

4.20 Plaquetest

Der Plaquetest dient zum quantitativen Nachweis von Viren. Dieser wurde zur Titration der gereinigten Viren, zur Virustiterbestimmung aus den Lungen der Ratten und für den PRNT benutzt.

Durchführung:

1. Je 500 µl der zu untersuchenden Suspension in *well* 1 der 6 *well*-Platten
2. Danach dekadische Verdünnungsreihe
3. Die Platte für 2 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler stellen
4. Inokulum abnehmen
5. Vorsichtig mit 3ml Overlay überschichten und bei 32°C für 5-7 Tage inkubieren

Nach 5-7 Tagen Inkubation der Viren schloß sich die Plauefärbung an.

Durchführung:

1. Nach 5-7 Tagen Zugabe von 3 ml 80 % eisgekühltem Methanol und Fixieren für 1 h
2. Vorsichtige Abnahme des Overlays plus Methanol und Refixieren für ½ h mit 80 % Methanol
3. Abnahme des Methanols und Zugabe von 2 ml 5 % Blockierlösung (Magermilchpulver), für 30 min auf den Schüttler stellen
4. Wegschütten des Blottos und waschen mit 2 ml PBS
5. Zugabe von 500 µl des 1/300 verdünnten 1.Antikörpers für 90 min bei Raumtemperatur
6. Dreimaliges Waschen mit je 2 ml/*well* PBS
7. Zugabe von 500 µl des 1/300 Verdünnten 2.Antikörpers für 90 min bei Raumtemperatur
8. Dreimaliges Waschen mit je 2 ml/*well* PBS
9. Zugabe von 500 µl 1:1 Mix des Peroxidasesubstrats (4-chloro-1-naphtol) für 10 min
10. Auszählen der Plaques

4.21 Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT)

Um einen ausreichenden Schutz des Organismus zu gewährleisten ist neben der zellulären Antwort für die Neutralisation des Virus die Humorale von entscheidender Bedeutung. Für einen Impfstoff, der effizient Viren neutralisiert, sollte die Untersuchung die durch den potentiellen Impfstoff hervorgerufene Immunantwort die Bestimmung des Neutralisationstiters mit einschließen.

Durch Reduktion der infektiösen Partikel durch Zugabe eines bestimmten Plasmavolumens des infizierten Tieres ergibt sich der Neutralisationstiter.

Mit Hilfe des Plaquetests lässt sich ein Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT) durchführen, um die neutralisierenden Antikörper zu quantifizieren.

Für die Aufreinigung der peripheren monokleären Zellen (PBMC) wurde das Gemisch auf Ficoll geladen. Nach Abnahme der PBMC-Bande wurde das verdünnte Serum, welches die Antikörper aus dem Blut enthält, oberhalb des Ficolls abgenommen.

Durchführung PRNT:

1. Herstellung und Vorlegen von 200 µl einer 1:4 Verdünnung im ersten *well*
2. Verdünnungsreihe der Plasmaproben in 1:2-Schritten auf einer 96-*well*-Platte durch Überführen von 100 µl Serum aus dem ersten *well* bei schon vorgelegten 100 µl Medium in das *well* 2 und anschließendes Wiederholen für die restlichen *wells*. Aus dem zehnten *well* jeweils 100 µl verwerfen. Das elfte und zwölfte *Well* dient als Negativkontrolle
3. Verdünnen des PIV3wt (Titer $5 \cdot 10^7$ Pfu/ml) in fünf Schritten (4* 1:10, abschließend 1:6, 1:2048) auf 833 Pfu/ml verdünnt
4. Mischen von 110 µl (also ca. 90 Pfu) der Virussuspension zur vorgelegten Serumverdünnungsreihe
5. Inkubation bei Raumtemperatur der Neutralisationsansätze für 30 min
6. Überführung von 2 mal 100 µl Neutralisationsansatz in ein *well* einer konfluent mit MK2-Zellen bewachsenen 24-*well*-Platte, damit duplizieren der Ansätze
7. 2 ½ h schwenken bei Raumtemperatur
8. Abnahme der Suspension und ersetzen durch Overlaymedium
9. Inkubation bei 32 °C für fünf Tage
10. Plaque-Färbeprotokoll, siehe 4.20

4.22 ELISA

Mit dem ELISA wird eine Antigen-Antikörper Wechselwirkung mit einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen. Der ELISA ist eine sehr einfache und empfindliche Technik um Antigene oder Antikörper nachzuweisen. Es wurde zum Nachweis der Proteine IL-4 und IFN γ der sogenannten „sandwich-assay“ benutzt.

Die Zytokine wurden aus dem Blut an Tag drei und nach Stimulation der PBMC an Tag 21 post infectionem gemessen.

Durchführung:

1. Verdünnen des Bindungsantikörpers und Detektionsantikörpers 1:180 in PBS
2. Auftragen von 50 $\mu\text{l/well}$ des Bindungsantikörpers auf eine 96-*well*-Platte
3. Abdecken der Platten und bei Raumtemperatur über Nacht inkubieren lassen
4. Aspiration der Antikörperverschüttung und dreimaliges Waschen mit 300 $\mu\text{l/well}$ Waschpuffer
5. Platten mit 300 $\mu\text{l/well}$ Reagent Diluent blocken und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren lassen
6. Aspiration der Lösung und dreimaliges Waschen mit 300 $\mu\text{l/well}$ Waschpuffer
7. Erstellen der Verdünnungsreihe des Standards
8. Verdünnen der Proben 1:3 in Reagent Diluent
9. Auftragen von 50 $\mu\text{l/well}$ der Proben und der Standards und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Mit Klebefolie bedecken
10. Aspiration der Lösung und dreimaliges Waschen mit 300 $\mu\text{l/well}$ Waschpuffer
11. Zugabe von 50 $\mu\text{l/well}$ des Detektionsantikörpers und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Mit Klebefolie bedecken
12. Aspiration der Lösung und dreimaliges Waschen mit 300 $\mu\text{l/well}$ Waschpuffer
13. Zugabe von 50 $\mu\text{l/well}$ (Arbeitsverdünnung 1:200 in RD) der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase. Mit Klebefolie bedecken und für 20 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Vermeiden von direkter Lichteinwirkung
14. Aspiration der Lösung und dreimaliges Waschen mit 300 $\mu\text{l/well}$ Waschpuffer
15. Zugabe von 50 $\mu\text{l/well}$ der Substrat-Lösung. Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Vermeiden von direkter Lichteinwirkung
16. Zugabe von 25 $\mu\text{l/well}$ der Stop-Lösung. Leichtes Schwenken der Lösung
17. Messen der OD bei 450 nm und bei einer Wellenlängenkorrektur bei 540 nm

4.23 [^3H]-Thymidin-Einbau und Probengewinnung für den ELISA

Der [^3H]-Thymidin-Einbau dient dem quantitativen Nachweis sich teilender Zellen. Durch Messung des Einbaus radioaktiven Thymidins in Zellen lassen sich Rückschlüsse auf die DNA-Synthese und damit auf die Zellteilung ziehen. Die Autoradiographie erfasst den Einbau photographisch mit Hilfe eines Strahlungsdetektors.

Für den [³H]-Thymidin-Einbau und den ELISA wurden pro zu untersuchendem Tier $5 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml Zellsuspensionsmedium aufgenommen. Diese wurden dann in vier Ansätzen zu je 100 µl ($5 \cdot 10^5$ Zellen) aufgeteilt und in 96-*well*-Platten gegeben.

Durchführung:

1. Zugabe von 100 µl der verschiedenen Stimulationslösungen
2. Erster Ansatz: Negativ-Kontrolle. Zu diesen wird ein Gemisch aus 50 µl Medium und 50 µl der NTE-Sucrose (20%) gegeben
3. Zweiter Ansatz: Virusstimulation. Ein Gemisch aus 50 µl Medium und 50 µl der Virussuspension des gereinigten PIV3 ($2 \cdot 10^6$ PFU/ml) hinzu geben
4. Dritter Ansatz: UV-inaktivierte Virusstimulation. Dazu gleiche Menge an Virus wie unter Punkt 4 30 min UV inaktivieren und dann zu 50 µl Medium hinzu geben
5. Zellen anschließend 4 Tage bei 37°C kultivieren
6. An Tag 4 100 µl des Überstandes abnehmen (vorsichtig, um nicht die Zellen mitzunehmen) und in zwei Aliquots à 50 µl einfrieren, die für die weitere Proteinbestimmung im ELISA verwendet werden
7. Das Medium mit 100 µl Thymidin-Medium versetzen, dadurch wird pro *well* eine Menge von 0,5 µCi [³H]-Thymidin hinzu gegeben. Außerdem wird jeweils noch einmal 50 µl der Stimulationslösungen hinzugefügt.

Nach weiteren 18h Kultur wurden die Zellen gewaschen, geerntet (Harvester) und die Filter mit den Zellen zur Analyse eingeschickt.

4.24 Immunhistochemie und HE

Für die immunhistochemische Färbung an Tag 5 nach Infektion wurden 4µm dicke Schnitte eines formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebes geschnitten und anschließend entparaffinisiert. Die Schnitte wurden mit kaltem Wasser gespült und mit *Tris-buffered saline* (pH 7.4), vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper gegen CD3 (#N1580, Dako, Glostrup, Denmark, dilution 1:10), gewaschen. Für die Detektion wurde ein biotinylierter donkey anti-rabbit (Dianova, Hamburg, Germany) verwendet. Die Farbreaktion erfolgte mit dem streptavidinAP kit (K5005, Dako), bei der die alkalische Phosphatase an das Streptavidin

Material und Methoden

gekoppelt ist. Der resultierende Komplex zwischen Biotin und Streptavidin mit alkalischer Phosphatase wird durch eine Farbumsetzung des Substrats (*Fast Red*) mit alkalischer Phosphatase nachgewiesen, das eine rote Farbe zeigt.

Die Negativkontrollen wurden nur mit dem Zweitantikörper inkubiert. Positive Zellen wurden in der 10x Vergrößerung gezählt (hpf = 0.636 mm^2). Es wurden drei Gesichtsfelder ausgelesen und davon der Durchschnitt gebildet. Diese Mittelwerte wurden wiederum in jeder Versuchsgruppe gemittelt. Die Haematoxylin und Eosin (HE)-Färbung erfolgte nach der konventionellen Methode.

5. Ergebnisbeschreibung

5.1 Zweck und Zielsetzung

Die Ergebnisse können in drei Hauptabschnitte unterteilt werden. Im ersten Abschnitt wurde der offene Leserahmen des Immunmodulators IP10 in die antigenomische cDNA des rekombinanten B/HPIV3 als zusätzliche Geneinheit an erster Position kloniert. Im zweiten Abschnitt wurde das B/HPIV3-IP10 Virus de novo von der antigenomischen cDNA generiert und in vitro charakterisiert. Im dritten Abschnitt erfolgte die Charakterisierung des neuen Virus in vivo in Baumwollratten.

Abb. 3 Genom der rekombinanten Chimäre des bovinen Parainfluenzavirus 3 und des bovinen Parainfluenzavirus 3

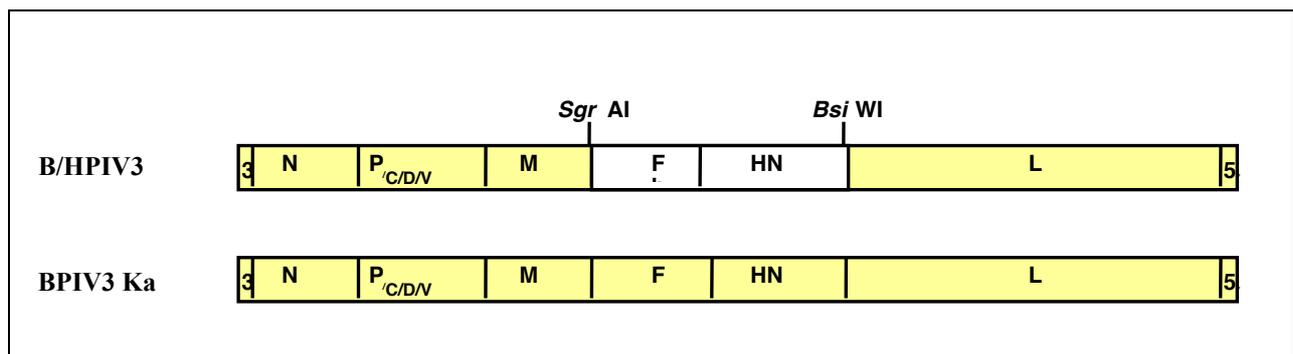


Abb.3. Genom der rekombinanten Chimäre des bovinen Parainfluenzavirus 3 (B/HPIV3), das als Grundlage für die Generierung des B/HPIV3-P10 genutzt wurde, und des bovinen Parainfluenzavirus 3 des Stammes Kansas (BPIV3 Ka). Die F und HN Gene wurden als Einheit durch die Enzyme Sgr AI und Bsi WI in das BPIV3 Ka kloniert, sodass sie zwischen dem M- und L-Gen liegen.

5.2 Klonierung des IP10 ORF als zusätzliche Geneinheit in B/HPIV3

Die kodierende Sequenz (ORF) des IP10 Gens der Baumwollratte (IP10cr) wurde in das Genom des B/HPIV3-Plasmids, das ein zusätzliches Genende/Intergenischer Bereich/Genstart-Signal vor dem N Gen besitzt, durch SbfI-Schnitt kloniert. Dieses Plasmid wurde in Vorversuchen der Arbeitsgruppe hergestellt. Das B/HPIV3 Plasmid wurde vor Klonierung sequenziert und es zeigte sich keine kodierende Mutation.

Der IP10 Leserahmen wurde aus einem Plasmid herauskloniert und die SbfI-Schnittstellen wurden durch PCR an das zu klonierende Insert, bestehend aus 285 Nukleotiden des IP10 Leserahmens (open reading frame, ORF) und 44 Nukleotiden untranslatierte Sequenz (UTR) des

Ergebnisbeschreibung

IP10 Gens, angefügt. Zur korrekten Funktion der Polymerase wurde sichergestellt, dass die Gesamtzahl der Nukleotide im Genom durch sechs teilbar war.

Abb.4: Die Nukleinsäuresequenz der kodierenden Sequenz des IP10 Gens

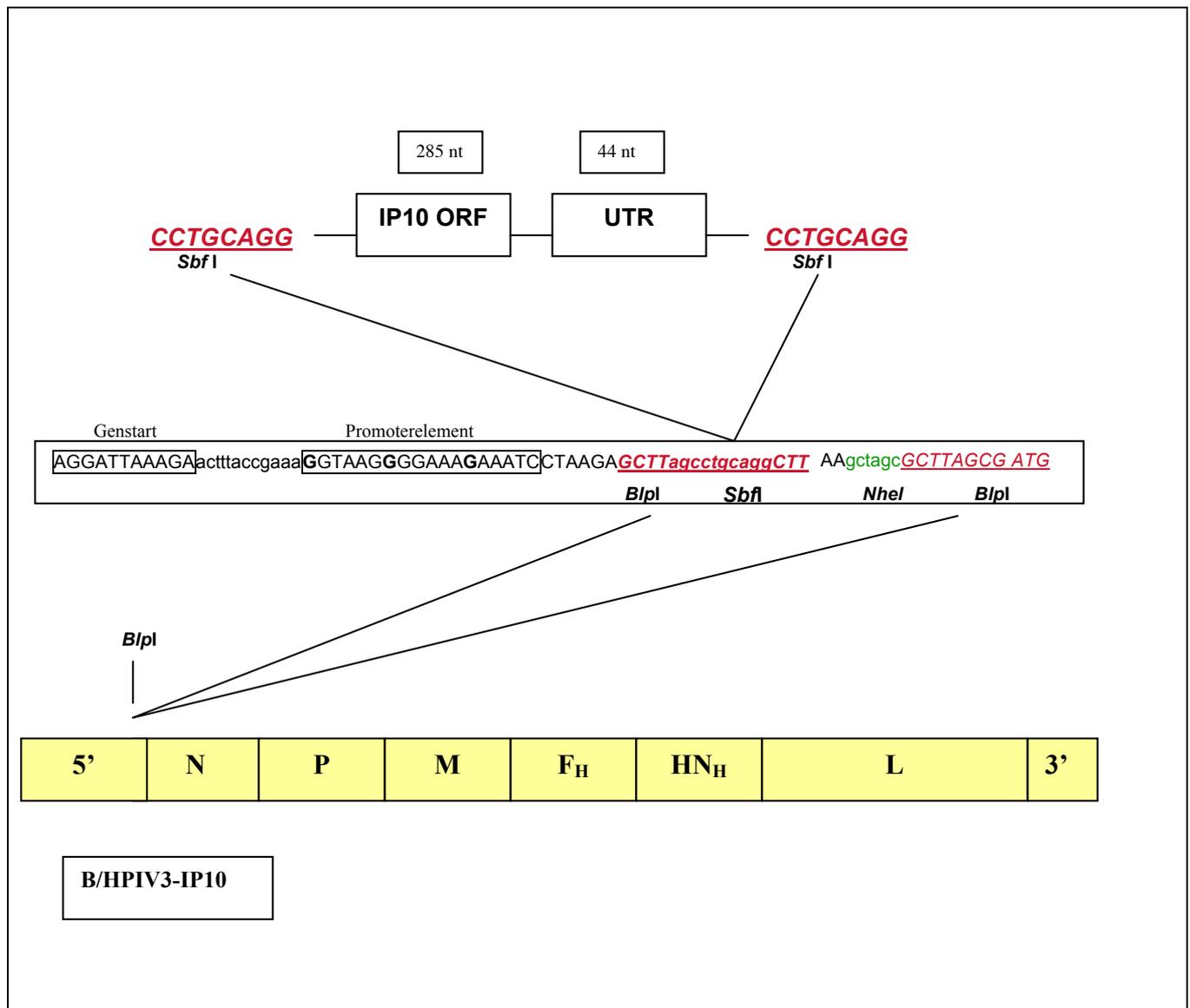


Abb.4: Die Nukleinsäuresequenz der kodierenden Sequenz des IP10 Gens entspricht der publizierten Sequenz (Genbank Nr. AF421394). Das IP10cr-Insert besteht aus der kodierenden Sequenz, an der sich 44 Nukleotide untranslatierte Sequenz (UTR) des IP10 Gens anschließen. An diese Sequenz wurden die SbfI-Schnittstellen per PCR angefügt. Anschließend erfolgte die Klonierung per SbfI-Schnitt in das modifizierte B/HPIV3, welches das Genende/Intergenischer Bereich/Genstart-Signal integriert hat und eine zusätzliche SbfI Schnittstelle besitzt. Die Sequenz ist als antigenomische cDNA notiert. Um den richtigen Einbau des Inserts zu bestätigen wurde ein Richtungsscreen durchgeführt, d.h. eine PCR durchgeführt, bei der ein Primer asymmetrisch in dem Insert platziert ist und der zweite Primer ausserhalb des Inserts im N Gen platziert ist. So konnte von der Amplifikatlänge auf die Richtung des Inserts geschlossen

werden. Das Insert lag in richtiger Richtung im B/HPIV3-Plasmid und somit konnte nach Sequenzierung des Inserts das Virus neu generiert werden. Die Sequenzierung des IP-10-Inserts bestätigte ausserdem, dass keine Mutationen in dem das Genom kodierende Plasmid vorlagen.

5.3 Generierung des neuen rekombinanten Virus

Die Herstellung des neuen rekombinanten Virus erfolgte in HEp-2 Zellen. Dazu wurden HEp-2 Zellen mit dem das B/HPIV3-IP10 Antigenom kodierende Plasmid sowie mit drei Hilfsplasmiden, die die BPIV3 Polymeraseproteine N, P und L kodieren, transfiziert. Alle vier Plasmide standen unter der Kontrolle des Bakteriophagen T7 Promotors und Terminators. Die HEp-2 Zellen wurden nach Transfektion der Plasmide mit einem modifizierten Vaccinia Ankara Virus (MVA) infiziert, das die RNA abhängige RNA Polymerase des Bakteriophagen T7 exprimiert. Mithilfe der T7 Polymerase wurde das virale Antigenom generiert und N, P und L mRNA exprimiert. Die Translation von N, P und L führte zur Bildung des aktiven BPIV3 Polymerasekomplexes, der daraufhin virales Genom von der antigenomischen RNA synthetisierte. Das virale Genom diente als Matrizze für die Transkription viraler mRNA's, sodass ein produktiver Replikationszyklus stattfinden und infektiöse Viren gebildet werden konnten. Dieser Prozess ist relativ ineffizient, sodass sich im Überstand der HEp-2 Zellen meist nur wenige infektiöse Viren befinden. Der Überstand wurde drei Tage nach Transfektion der Plasmide und Infektion mit MVA-T7 auf frische LLC-Mk2 Zellen passagiert und nach 7 Tagen nochmals auf frische LLC-Mk2 Zellen passagiert. Nach der zweiten Passage auf LLC-Mk2 Zellen war infektiöses Virus durch Hämadsorption mit Erythrozyten der Blutgruppe 0 detektierbar. Der Überstand wurde dann auf 225cm² Zellkulturflaschen amplifiziert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Abb.5 Transfektion der Plasmide und Inkektion mit MVA-T7

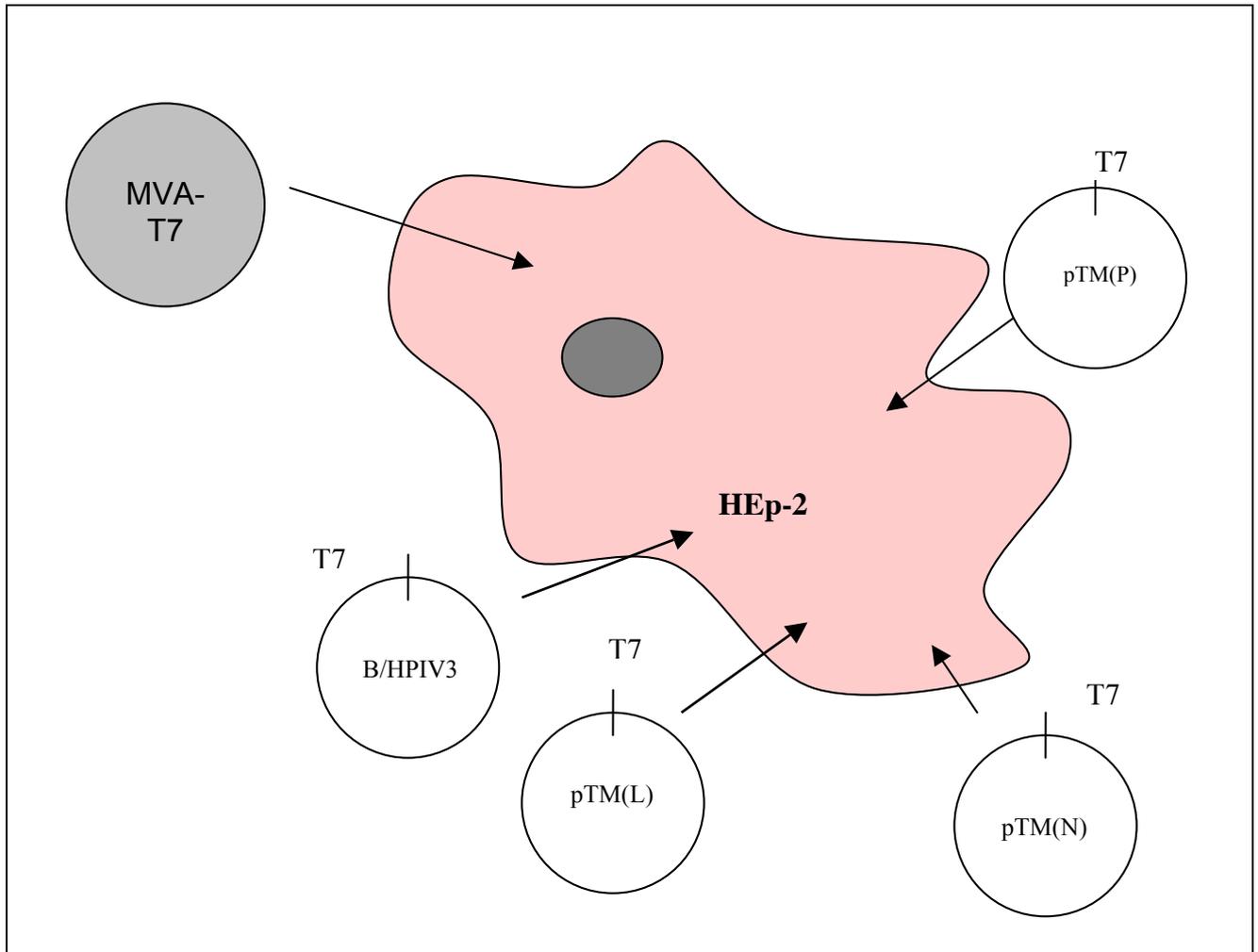


Abb.5 Dargestellt ist die Generierung des B/HPIV3 durch Transfektion der Plasmide, die das virale Antigenom sowie die Hilfsplasmide N, P und L kodieren, in HEp-2 Zellen und Infektion mit MVA. Nach Transfektion bildet die DNA abhängige RNA-Polymerase die Transkripte, aus denen die Proteine translatiert werden, sodass sich anschließend der Ribonukleoproteinkomplex bilden kann. Die vier Plasmide stehen alle unter Kontrolle des T7-Promoters an dem das MVA die Transkription beginnt.

5.4 Sequenzierung des viralen Genoms

Nach erfolgter Generierung des rekombinanten Virus war es notwendig, die Sequenz des viralen Genoms zu überprüfen. Dazu wurde virale RNS aus dem Überstand der Zellen mit den enthaltenen Viren mit einem RNS Extraktionskit (Qiagen Viral RNA Mini Kit) aufgereinigt. Die genomische RNS wurde mit Hexamerprimern in cDNS umgeschrieben, mit virusspezifischen Primern amplifiziert und anschließend in einem Servicelabor sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass das de novo generierte Virus den IP10 Leserahmen sowie die Genstart und Genstopsequenzen enthielt und dass in vitro keine unerwünschten Mutationen aufgetreten waren.

Abb.6 Amplifikatlängenkontrolle

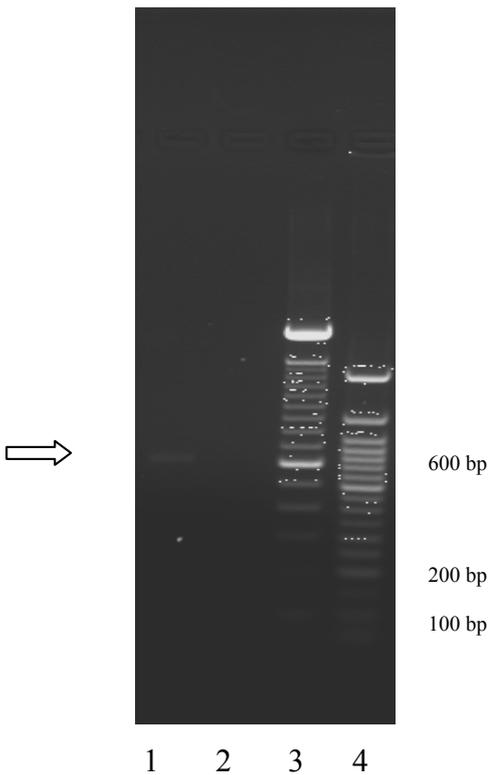


Abb.6 Dargestellt ist die Amplifikatlängenkontrolle. Nach RNS Aufreinigung erfolgte die reverse Transkriptase und anschließend die Amplifikation der cDNS mit virusspezifischen Primern (Seq PCR forward und Seq PCR reverse). In Bahn 1 läuft das IP-10-Amplifikat, Bahn 2 ist leer, in Bahn 3 läuft die 100 bp Bande (bp) und in Bahn 4 läuft die 50 Basenpaar Bande (bp). Das Amplifikat hat ohne IP10 Insert eine Länge von 265 Basenpaaren im Genom. Es muss also bei einer Länge von 345 Basenpaaren für das IP 10 Insert bei 610 Basenpaaren (Pfeil) laufen, wie man im Bild erkennt.

5.5 Überprüfung der Expression des IP10

Die Expression von IP10 Inserts wurde mit dem Western Blot überprüft. Dazu wurden LLC-MK2 Zellen mit B/HPIV3-IP10 infiziert und drei Tage bei 37°C inkubiert. Nach 72 Stunden erfolgte die Lyse der Zellen. 25µg des Gesamtprotein-Lysats wurden nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Die dann folgende Antikörperrnachweisreaktion mit einem Antikörper gegen IP-10cr macht es möglich, das zu identifizierende Protein kenntlich zu machen. Als Negativkontrolle wurde ein rekombinantes Virus mit anderem Insert verwendet.

Abb.7 Proteinkontrolle mittels Western Blot

Ergebnisbeschreibung

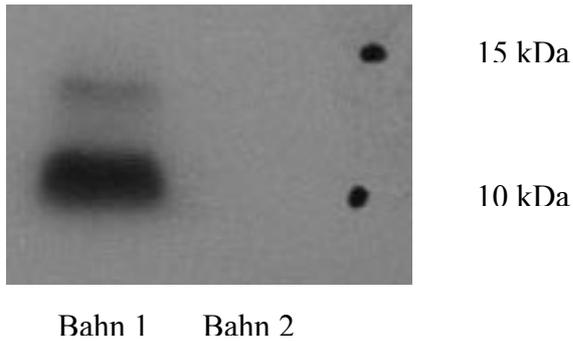


Abb.7 Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteinlysats mittels Western Blot. Das mittels spezifischer Antikörper durch Chemolumineszenz kenntlich gemachte IP10 läuft nach elektrophoretischer Auftrennung in Bahn 1 in Höhe des 10 kDa Markers. Ein-Punkt Markierungen in Höhe des ursprünglich laufenden Markers im Blot kennzeichnen den Ort des Markers, der keine Chemolumineszenzreaktion hervorruft und deshalb nicht zu sehen ist. Oberhalb der IP10 10 kDa Bande läuft eine weitere unbekannte Bande oberhalb der 10 kDa Markierung.

Es zeigte sich in Bahn 1 eine 10 kDa Bande und eine Bande unterhalb der 15 kDa Markierung. In der Negativkontrolle konnte keine Expression von IP10 nachgewiesen werden.

5.6 Wachstumskinetik des B/HPIV3-IP10

Die Expression zusätzlicher nicht-viraler Gene kann die Eigenschaften des Virus ändern. Dies ist besonders für das Wachstumsverhalten von Bedeutung. Um Viren miteinander in ihrem Wachstumsverhalten zu vergleichen ist es nötig, eine Wachstumskinetik zu erstellen. Die Viruskonzentration im Zellüberstand wurde anhand eines Plaquetests bestimmt. Drei Tage vor der Infektion wurden LLC-MK 2-Zellen ausgesät, sodass sie am Tag der Infektion 70-80% Konfluenz erreichten. Die Infektion von B/HPIV3, B/HPIV3-IP10 und HPIV3-Wildtyp erfolgte mit einer MOI von 0.01, d.h. pro 100 Zellen wurde eine infektiöse Einheit Virus zugegeben. Nach Infektion wurde alle 24 h der Zellüberstand entnommen und durch Medium ersetzt. Die Proben wurden aliquotiert bei -80°C gelagert und anschließend durch serielle Dilution und Plaquetest (Plaques bildende Einheiten oder plaque forming units, PFU) titriert.

Abb.8 Wachstumskinetik

Ergebnisbeschreibung

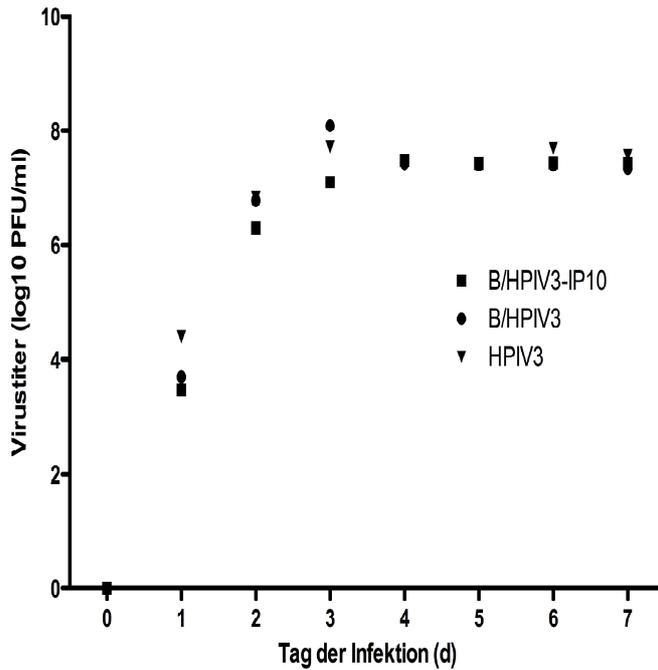


Abb.8 Dargestellt sind multizyklische Wachstumskurven der rekombinanten Viren B/HPIV3, B/HPIV3-IP10cr und HPIV3 Wildtyps auf LLC-MK2 Zellen. Die multizyklische Replikation (MOI von 0,01) der zwei Chimären wird mit der Replikation des humanen PIV3-Wildtypvirus verglichen. Der Virustiter in als log₁₀ PFU pro Milliliter angegeben. Die Viren HPIV3, B/HPIV3-IP10 und HPIV3 unterschieden sich nicht in ihrer Wachstumskinetik.

Es zeigte sich, dass sich die Replikation von B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 nicht wesentlich von der des Wildtypvirus HPIV3 unterscheidet. B/HPIV3-IP10 replizierte bis zum Tag drei etwas langsamer als die anderen zwei Viren, erreichte jedoch mit einem max. Titer von 3×10^7 PFU/ml ein mit HPIV3 und B/HPIV3 vergleichbares Plateau.

5.7 Replikation der Viren in Baumwollratten

Ein attenuierter Impfstoff zeichnet sich durch verminderte Replikation im Wirtsorganismus aus. Dadurch verringert sich aber auch seine Immunogenität, da die Replikation des attenuierten Lebendimpfstoffs mit der Immunogenität korreliert. Ein optimaler Impfstoff sollte trotz eingeschränkter Replikation die Immunogenität seines Muttervirus nach Infektion mit dem Virus zeigen. Eine Aussage darüber kann jedoch nur nach Infektion der Tiere und Virustiterbestimmung aus den Lungen erfolgen. Die höchsten Titer sind dabei zwischen dem Tag zwei und fünf zu beobachten. Acht Wochen alte Baumwollratten wurden intranasal mit ca. 5×10^6 pfu HPIV3wt, B/HPIV3-IP10, oder B/HPIV3 infiziert. Einer vierten Gruppe von

Ergebnisbeschreibung

Baumwollratten wurde intranasal Zellkulturmedium instilliert. Am Tag drei wurden die Tiere getötet und Blut und Lunge wurden zur Analyse entnommen. Das Blut wurde anschliessend zentrifugiert und für die Proteinbestimmung mittels Elisa von den Zellbestandteilen getrennt. Die Zellen wiederum wurden für den [³H]-Thymidintest aufbereitet. Die Virustiterbestimmung in der Lunge erfolgte durch Plaquetest.

Abb.9 Virusreplikation

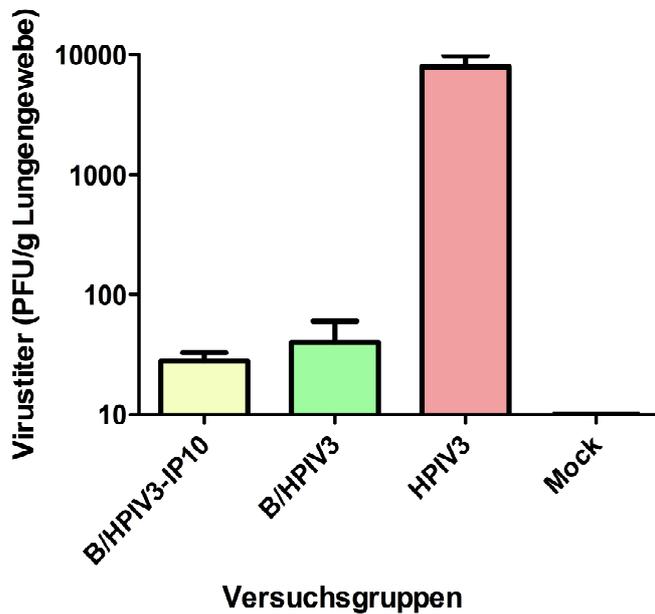


Abb.9 Virusreplikation. Die dargestellten Virustiter ergeben sich aus den Mittelwerten von fünf Tieren pro Gruppe. Die Bestimmung erfolgte an Tag drei nach intranasaler Infektion mit $5 \cdot 10^6$ pfu der jeweiligen Viren bzw. Medium. Dabei zeigte B/HPIV3-IP10 die größte Restriktion, war jedoch mit B/HPIV3 vergleichbar. HPIV3 zeigte einen signifikanten Unterschied in der Replikation zu den zwei Erstgenannten ($p < 0.05$). Die mit Medium inokulierte Gruppe hatte keinen Virusnachweis. Mittelwerte \pm SE (standard error) sind dargestellt. Der Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test wurde für den Vergleich der Titer benutzt.

Während HPIV3 in der Lunge von Baumwollratten effizient replizierte und an Tag drei p.i. einen Titer von 7860 ± 1968 pfu/g (Mittelwert \pm standard error) Lungengewebe erreichte, war die Replikation von B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 mit 40 ± 20 pfu/g und 28 ± 5 pfu/g, respektive, signifikant reduziert ($p < 0.05$ im Tukey-Kramer Test). Die Insertion des IP10 Gens in das Genom von B/HPIV3 hatte keinen zusätzlichen attenuierenden Effekt auf die Replikation von B/HPIV3.

5.8 Zytokinbestimmung aus dem Serum und nach Stimulation von PBMC

Um zu testen, ob die Überexpression von IP10 zu einem TH1 Bias führt, wurden IL-4 (als Th2 Marker) und IFN γ (als Th1 Marker) im Serum der Baumwollratten und in stimulierten PBMC bestimmt.

Abb.10 Serum IL-4 Konzentration

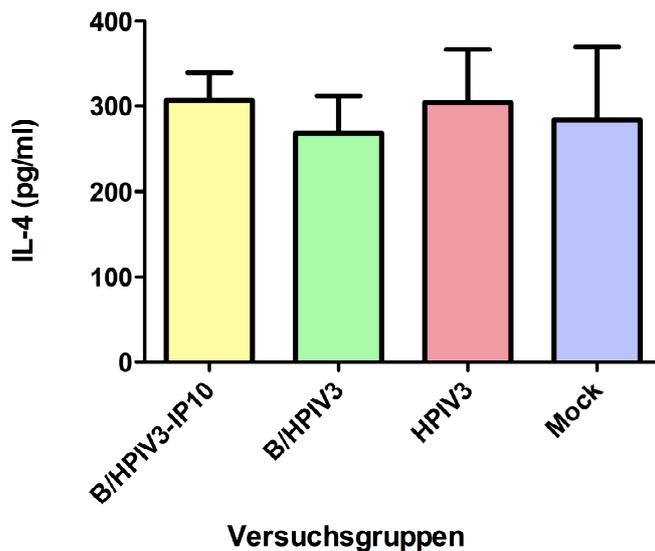


Abb.10 Serum IL-4 Konzentration an Tag drei post infectionem für die mit B/HPIV3-IP10, B/HPIV3, HPIV3 und Mock infizierten Tiere. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den vier Gruppen (Tukey Kramer Test).

Für die Zytokinbestimmung an Tag drei aus dem Serum zeigte sich sowohl für IL-4 als auch für IFN γ kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Versuchsgruppen (Tukey Kramer Test). Für B/HPIV3-IP10 infizierte Tiere lag der gemessene Wert von IL-4 von 306±33 pg/ml nur knapp über dem für HPIV3 infizierte Tiere mit 304±62 pg/ml. B/HPIV3 infizierte Tiere mit 268±43 pg/ml und die Mock-Gruppe mit 284±86 pg/ml lagen nur leicht darunter.

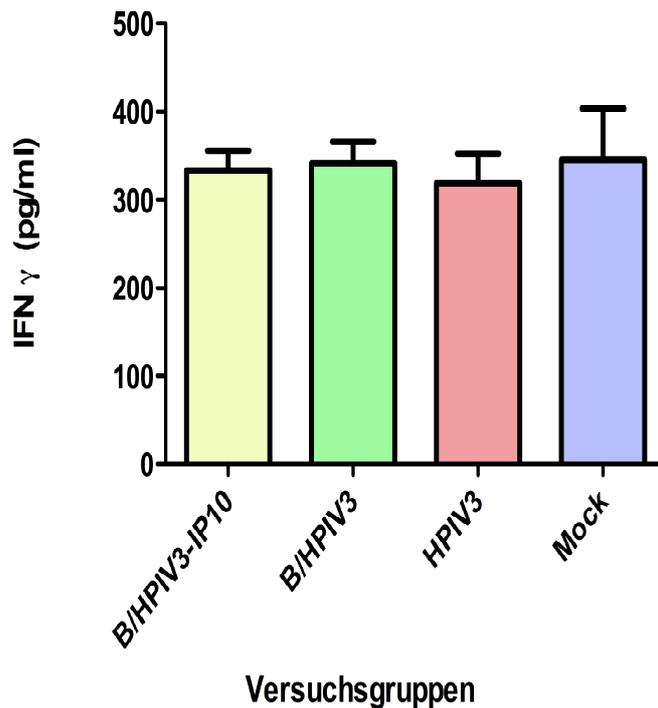
Abb.11 IFN γ Bestimmung Tag 3

Abb.11 Zytokinbestimmung für das IFN γ aus dem Serum an Tag drei post infectionem. Die IFN γ Konzentration im Serum der mit B/HPIV3-IP10, B/HPIV3, HPIV3 und Mock infizierten Tiere liegen alle auf gleicher Höhe. Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied (Tukey Kramer Test).

Die für IFN γ bestimmten Mittelwerte waren 333±22, 341±24, 313±34 und 345±58 pg/ml für B/HPIV3-IP10, B/HPIV3, HPIV3 und Mock-infizierte Gruppe, respektive. Es waren keine signifikanten Unterschiede im Tukey Kramer Test zu erkennen.

Jeweils 5 Tiere pro Gruppe wurden nach 21 Tagen getötet, um PBMC zu isolieren und mit Medium, HPIV3 bzw. inaktiviertem HPIV3 zu stimulieren und Zytokine im PBMC Überstand zu bestimmen. In der B/HPIV3 Gruppe konnten Zellen von zwei Tieren nicht ausgewertet werden, da die Anzahl der PBMC unzureichend war.

Medium stimulierte (Negativkontrolle) und virusstimulierte PBMC unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der IFN γ Konzentration. Die mittleren IFN γ Konzentrationen der mit Medium stimulierten PBMC betragen 270±36, 312±61, 297±10 und 436±60 pg/ml für die B/HPIV3-IP10, B/HPIV3, HPIV3 und Mock-infizierten Gruppen, respektive.

Zwischen virusstimuliertem und UV-inaktiviertem Ansatz sowie zwischen Medium stimuliertem und UV-inaktiviertem Ansatz zeigte sich kein signifikanter Unterschied bis auf