

Aus der Abteilung für Zellbiologie und Virusgenetik
des Heinrich Pette Institutes
an der Universität Hamburg
Direktor Prof. W. Ostertag

***Ex-vivo* Untersuchungen des LCMV Tropismus in eukaryotischen Zelllinien**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von Konstantinos Tsiakas

aus Lamia Griechenland

Hamburg 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 2. Nov. 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Priv. Doz. Dr. D. von Laer

Korreferent: Prof. Dr. W. Ostertag

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Erläuterung der Thematik	1
1.1.1. Gentransfer	2
1.1.2. Retrovirale Vektoren	3
1.1.2.1. Wirtsbereiche muriner Retroviren	3
1.1.2.2. Genomische Struktur von Retroviren	3
1.1.2.3. Retrovirale Verpackungslinien	5
1.1.2.4. Sicherheit beim Umgang mit retroviralen Vektoren	7
1.1.3. Mängel retroviraler Vektoren	8
1.1.4. Retrovirale Pseudotypen	8
1.2. Erfassung des wissenschaftlichen Umfeldes	9
1.2.1. MLV(LCMV)-Pseudotyp	9
1.2.2. Das Virus der Lymphozytären Choriomeningitis (LCM-Virus)	9
1.3..Problemstellung	13
1.3.1. LCMV-Tropismus (Verteilung des LCMV)	13
1.3.2. Klonierung des LCMV-Rezeptors	14
1.4. Ziel der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Zellkulturmethoden	15
2.1.1. Wachstumsmedien und Lösungen	15
2.1.2. Zelllinien und Standardkulturbedingungen	16
2.1.2.1. Adhärenente Zelllinien	16
2.1.2.2. Suspensionszellen	16
2.1.2.3. Allgemeine Zellkulturbedingungen	17
2.2. Tropismus LCMV	17
2.2.1. Anzucht von LCM-Wildvirus	17
2.2.2. Plaque-Test	18
2.2.3. LCMV Replikation	18
2.2.3.1. LCMV Replikation in adhärenenten Zelllinien	18
2.2.3.2. LCMV Replikation in Suspensionszellen	19

2.2.4. Immunfluoreszenz	19
2.2.5. Virusbindungsanalysen	20
2.2.6. Herstellung von MLV(LCMV)-Pseudotypen.....	21
2.2.7. Bestimmung des MLV(LCMV)-Pseudotyptiters.....	21
2.2.7.1. LacZ-Assay mit adhärennten Zellen.....	21
2.2.7.2. LacZ-Assay mit Suspensionszellen	22
2.3. Expressionsklonierung des LCMV-Rezeptors	22
2.3.1. Vorversuche	22
2.3.1.1. Bestimmung der Klonierungseffizienz von Jurkat-Zellen.....	22
2.3.1.2. Verpackung der cDNA-Bank und des <i>EGFP</i> -Kontrollvektors	24
2.3.1.3. Protokoll Jurkat -Transduktion mit der c-DNA-Bank	25
2.3.1.3.1. Infektion von Jurkat-Zellen mit dem <i>EGFP</i> -Kontrollvektor.....	25
2.3.1.3.2. Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse	25
2.3.1.4. Verpackung des Selektionsvektors	26
2.3.1.4.1. Verpackung des MLV(LCMV) <i>EGFP</i> -Vektors	26
2.3.1.4.2. Verpackung des MLV(LCMV) <i>neo</i> -Vektors	27
2.3.1.4.3. Bestimmung des MLV(LCMV) <i>neo</i> Pseudotyptiters.....	27
2.3.1.4.4. Ultrazentrifugation des MLV(LCMV) <i>neo</i> -Überstandes	28
2.3.2. Expressionsklonierung.....	28
Tag 0: Infektion der Jurkat-Zellen mit der verpackten cDNA-Bank.....	28
Tag 1: Untersuchung der Transduktionseffizienz mittels Einzelzell-PCR.....	29
Tag 2: Infektion von Jurkat-Zellen mit MLV(LCMV) <i>neo</i> Pseudotyp	29
Tag 3: Klonierung im Selektionsmedium.....	29
2.3.3 Testung der Klone mittels MLV(LCMV) <i>lacZ</i> -Pseudotyp-Transduktion.....	30
2.4. Molekularbiologische Methoden	30
2.4.1. Isolierung der genomischen DNA	30
2.4.2. Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	31
2.4.3. Nested PCR.....	32
2.4.3.1. Einzelzell- PCR	32
2.4.4. Agarosegelelektrophorese.....	33
2.4.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
2.4.6 Klonierung des Amplifikates im Plasmid Bluescript (pBS).....	35
2.4.6.1. DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	35
2.4.6.2. Dephosphorylierung des Vektors pBS.....	35

2.4.6.3. Phosphorylierung der PCR-Produkte	36
2.4.6.4. Ligation.....	36
2.4.6.5. Transformation kompetenter E. coli-Stämme.....	36
2.4.6.6. DNA-Mini-Präparation.....	37
2.4.6.7. Testverdau.....	38
2.4.6.8. DNA-Maxi-Präparation	38
2.4.6.9. Sequenzierung.....	39
2.4.7. Klonierung des GEP-Fragmentes in retroviralen Expressionsvektor	40
2.4.7.1. Glätten überstehender DNA-Enden.....	41
2.4.7.2. Infektion von Jurkat-Zellen mit pM5 $_{neo}$ -GEP.....	42
2.5. Analyse der α-Dystroglykan Expression	42
2.5.1. Testung der α -Dystroglycan-Expression mittels FACS-Analyse.....	42
2.5.2. Nachweis des α -Dystroglykan-Proteins mittels Western-Blot.....	43
2.5.2.1. Zellextrakte	43
2.5.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	43
2.5.2.3. Western-Blot-Analysen	44
2.5.2.3.1. Vorbereitung der Proben-SDS-PAGE	44
2.5.2.3.2. Coomassie-Färbung.....	45
2.5.2.3.3. Blotting	46
2.5.2.3.4. Immunologischer Proteinnachweis.....	47
2.5.3. RT-PCR	48
2.5.3.1. Herstellung der mRNA	48
2.5.3.2. cDNA Synthese (Erststrangsynthese).....	49
2.5.3.3. Quantifizierung der α -Dystroglycan-mRNA-Expression	50
3. Ergebnisse	51
3.1. LCMV-Infektion von eukaryotischen Zelllinien.....	51
3.1.1. Nachweis der LCMV-Vermehrung mittels Plaque-Tests.....	51
3.1.2. Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien mit LCMV	54
3.1.3. LCMV Bindung	56
3.1.4. MLV(LCMV) <i>lacZ</i> Transduktion von Jurkat- und CD 34+ Stamm-Zellen.....	57
3.2. Versuch der Identifikation des LCMV-Rezeptors mittels Expressionsklonierung	60
3.2.1. Vorversuche.....	61
3.2.1.1. Bestimmung der Klonierungseffizienz von Jurkat	62

3.2.1.2. Hintergrundsbestimmung	63
3.2.1.3. Verpackung der cDNA-Bank und die Transduktion von Jurkat	64
3.2.1.4. Verpackung des Selektionsvektors	65
3.2.2. Durchführung der Expressionsklonierung	66
3.2.2.1. Versuch zur Identifizierung der cDNA in transduzierten Klone	67
3.2.2.2. Bestimmung des Titers der Expressionsbank (Einzelzell-PCR)	69
3.2.2.3 Expression des GEP-Homologs in Jurkat.....	71
3.3. Dystroglykan Expression in eukaryotischen Zelllinien	72
3.3.1. Nachweis der α -DG Expression mittels Durchflusszytometrie.....	72
3.3.2. Nachweis des α -DG Proteins mittels Western-Blot	74
3.3.3. Quantifizierung der α -DG-mRNA-Expression in Jurkat	75
4. Diskussion	78
4.1. Charakterisierung des LCMV-Tropismus	79
4.2. Infektionsblock auf Rezeptorebene	80
4.2.1. LCMV-Protein-Expression in Jurkat-Zellen	80
4.2.2. Transduktionsversuche mit MLV(LCMV), Bindungsanalysen.....	81
4.3. Expressionsklonierung	82
4.4. Expression des α-Dystroglykans.....	83
5. Zusammenfassung.....	86
6. Literaturverzeichnis.....	87
Danksagung	94
Lebenslauf	95
Abbildungsverzeichnis	96
Abkürzungen	97
Erklärung	100

1. Einleitung

1.1. Erläuterung der Thematik

Unter Gentherapie wird die Behandlung genetisch bedingter Erkrankungen durch Veränderung des Genoms bezeichnet. Ziel der Gentherapie ist es, therapeutische Gene in Zellen einzubringen. Hierdurch könnte eine Vielzahl von Erkrankungen gebessert oder sogar geheilt werden. Hierzu gehören neben den eher seltenen monogenetischen Erbkrankheiten auch erworbene und sehr viel häufigere Erkrankungen wie Neoplasien und AIDS (Blau and Khavari 1997).

Grundsätzlich gibt es bei der Gentherapie zwei Möglichkeiten. Die somatische Gentherapie und die Keimbahntherapie. Bei der somatischen Gentherapie werden nur Körperzellen in ihrer genetischen Zusammensetzung verändert. So ist die Therapie auf ein Individuum beschränkt. Die Keimbahntherapie wird durch den Transfer des intakten Gens in die befruchtete Eizelle durchgeführt und somit sind alle Zellen des ausgewachsenen Individuums genetisch verändert. Der Einsatz der Keimbahntherapie am Menschen ist wegen der Veränderung erblicher Merkmale und der aus ihr resultierenden ethischen Aspekte verboten.

Um monogenetische Erbkrankheiten zu heilen, kann der Gentransfer *ex vivo* oder *in vivo* erfolgen. *Ex vivo* Verfahren: Dem Patienten werden Körperzellen entnommen, vermehrt und gentechnisch verändert. Die Zellen erfüllen jetzt die vorher fehlenden Funktionen. Sie werden dem Patienten reinjiziert oder reimplantiert (Abb. 1).

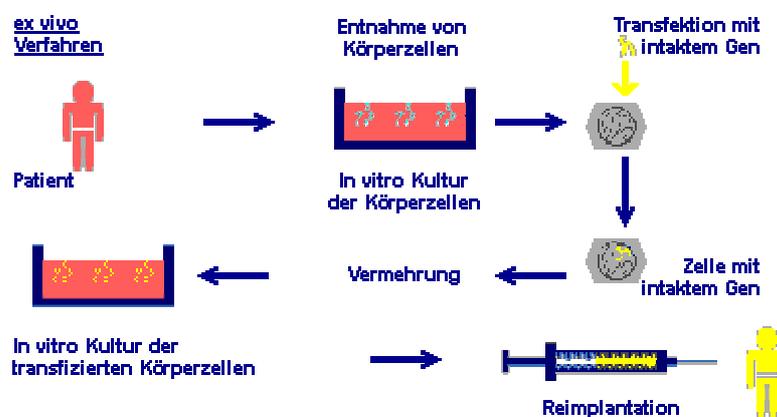


Abbildung 1: *Ex vivo* Verfahren der somatischen Gentherapie.

(Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen).

In vivo Verfahren: Bei diesem Verfahren wird das therapeutische Gen dem Körper des Patienten direkt zugeführt. Vektoren, die das Gen enthalten, werden injiziert oder inhaliert und gelangen so an ihren Funktionsort.

Zur Zeit wird in den meisten Fällen der Gentransfer *ex vivo* durchgeführt. Die *ex vivo* Gentransfermethoden sind generell effizienter als die aktuell zur Verfügung stehenden *in vivo* Methoden. Die Anwendbarkeit der *ex vivo* Gentherapie beschränkt sich, methodisch bedingt, nur auf jene Zellen, die relativ leicht aus dem Körper isoliert und in ausreichenden Mengen gezüchtet werden können. Zudem gelingt die Reimplantation der *in vitro* transfizierten Zellen oft nur unvollständig oder die Expression des Transgens geht *in vivo* relativ rasch verloren.

1.1.1. Gentransfer

Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie ist die effiziente und reproduzierbare Einschleusung und Expression des gewünschten Gens in die Zellen. Zu diesem Zweck werden biologische, chemische und physikalische Transportmittel verwendet. Die verschiedenen Gentransportmittel weisen Vor- und Nachteile auf. Im Gegensatz zu chemischen und physikalischen Methoden besteht der Vorteil des viralen Gentransfers in der hohen Effizienz und der langfristigen Expression. Grundlage dafür ist, dass die Viren bereits Mechanismen entwickelt haben, um ihr Genom in Zellen einzuführen.

Als besonders vorteilhaft haben sich retrovirale Vektoren erwiesen. Retroviren integrieren das fremde Gen direkt in eines der zellulären Chromosomen. Dadurch kann eine langfristige Expression des Transgens im Menschen erreicht werden. Die Integration von fremder DNA in das Wirtsgenom führt zu einer permanenten Modifikation der Zellen. Alternativ kann diese Modifikation eine unerwünschte Aktivierung bzw. Deaktivierung von regulatorischen Mechanismen der Zellen hervorrufen. Außerdem infizieren Retroviren nur sich teilende Zellen. Ein weiterer Nachteil besteht in der relativ begrenzten Größe des zu verpackenden Gens (8-10 Kb).

1.1.2. Retrovirale Vektoren

Für viele Anwendungen in der Gentherapie ist die langfristige Expression von therapeutischen Genen, wie z.B. die Expression von Drogenresistenzgenen in hämatopoetischen Stammzellen, (Baum, Hegewisch-Becker et al. 1995) von großer Bedeutung. Im Gegensatz zu Adenoviren oder Herpes simplex Viren eignen sich Retroviren sehr gut für diesen Anwendungsbereich. Vielversprechend scheint der Einsatz von Lentiviren wie HIV für den Gentransfer. Lentiviren sind Retroviren, die im Gegensatz zu den herkömmlichen Retroviren, die sich vom murinen Moloney Leukämie Virus (MLV) ableiten, nicht proliferierende Zellen infizieren (Klimatcheva, Rosenblatt et al. 1999; Buchschacher and Wong-Staal 2000).

1.1.2.1 Wirtsbereiche muriner Retroviren

Rekombinante Retroviren für den Gentransfer werden auf der Basis muriner Retroviren, vor allem des MLV, entwickelt. Man unterscheidet bei murinen Retroviren zwischen drei Wirtsbereichen. Das Wirtsspektrum ecotroper muriner Retroviren beschränkt sich auf Zellen von Mäusen und Ratten. Amphotrope murine Retroviren besitzen ein breiteres Wirtsspektrum, das sowohl murine als auch nicht murine - einschließlich humaner Zellen - umfasst. Xenotrope murine Retroviren weisen ebenfalls ein breites Wirtsspektrum auf, das jedoch Mäuse ausschließt.

1.1.2.2. Genomische Struktur von Retroviren

Retroviren sind RNA-Viren, die sich stabil in das Genom einer Wirtszelle integrieren und über ein DNA-Intermediat (Provirus) replizieren. Die Partikel sind von einer Membran umhüllt, welche die retroviralen Hüllproteine trägt. Replikationskompetente Retroviren beinhalten in ihrem Genom zwei identische einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 7 - 10 Kb. Die genomische RNA enthält drei kodierende Regionen: a) *gag* für die gruppenspezifischen Antigene, Nukleokapsid-Protein, Kapsidprotein und Matrixprotein, b) *pol* für die reverse Transkriptase, virale Protease und Integrase und c) *env* für die Hüllproteine. Nach dem Eintritt des Virus in die Zelle erfolgt im Zytoplasma die reverse Transkription des RNA-Genoms in doppelsträngige DNA.

Für die Integration der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA (Provirus) in das Wirtsgenom der Zelle ist der Transport in den Kern erforderlich. Dies ist nur bei aufgelöster Kernmembran möglich, so dass nur teilende Zellen infiziert werden können. Das Genom eines klassischen Retrovirus beinhaltet kodierende und regulatorische Regionen (Abb. 2).

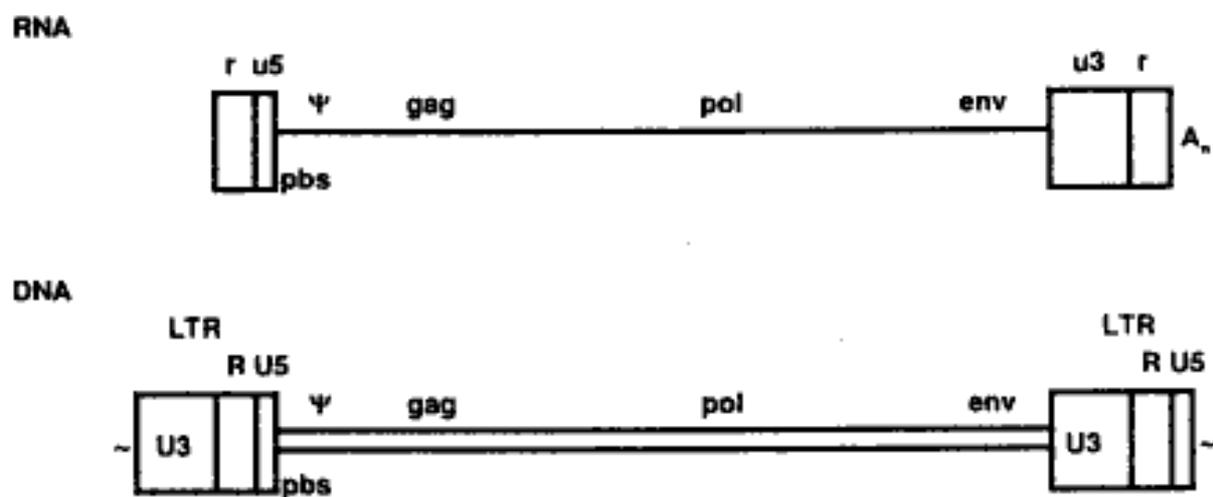


Abbildung 2: RNA-Genom und integriertes DNA-Genom eines Retrovirus (Robert Koch Institut, Deutschland). R oder r kennzeichnet repetitive Nukleotidsequenzen, die an beiden Termini vorkommen. Die Nukleotidsequenz u5 oder U5 (unique sequence) erscheint nur am 5'-Ende des RNA-Genoms, während u3 oder U3 nur am 3'-Ende auftritt; LTR (long terminal repeat) ist eine an beiden Termini des DNA-Genoms (Provirus) vorkommende Repetition; pbs (primer binding site) ist die Bindestelle für den tRNA-Primer; Ψ markiert das Verpackungssignal; gag, pol und env sind kodierende Regionen; A_n kennzeichnet die 3'-poly(A)-Sequenz. Die Termini sind im Vergleich zum Gesamtgenom vergrößert dargestellt.

1.1.2.3. Retrovirale Verpackungslinien

Retrovirale Gentransfersysteme bestehen aus dem retroviralen Vektor und der Verpackungszelllinie (Abb. 3). Der retrovirale Vektor kodiert für retrovirale Proteine und verfügt über das Verpackungssignal Ψ und die retroviralen 5'- und 3'-LTR, die eine Insertionsstelle für das zu übertragende Gen sowie ggf. einen Selektionsmarker flankieren. Die Verpackungszelllinie stellt die für die Verpackung der Vektor-RNA und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendigen retroviralen Proteine zur Verfügung. Für die Herstellung einer Verpackungszelllinie wird Nukleinsäure (Helfergenom), welche für die retroviralen Strukturproteine kodiert, in eine Zelllinie eingeführt. Bei diesem Helfergenom ist das Verpackungssignal Ψ deletiert, so dass virale RNA, die in der Verpackungszelllinie von dem Helfergenom abgelesen wird, nicht in Virionen verpackt wird.

Der Tropismus eines retroviralen Vektors wird von seinem Hüllprotein vermittelt. Je nach Art der vom Helfergenom expremierten retroviralen Hüllproteine wird zwischen ecotropen bzw. amphotropen Verpackungszelllinien unterschieden. Bei der Entwicklung rekombinanter Retroviren werden die Hüllproteine der murinen Retroviren modifiziert oder ausgetauscht, um einen breiteren Wirtsbereich, einen auf einen bestimmten Zelltyp ausgerichteten Wirtstropismus oder eine höhere Stabilität des Virions zu erreichen. Hierbei wird das Gibbon Ape Leukämie Virus (GaLV) als Spender des Hüllproteins zunehmend bedeutsam. GaLV weist einen Wirtsbereich auf, der sich von amphotropen murinen Retroviren unterscheidet, da es auch Rinder- und Hamsterzellen, jedoch keine Mäusezellen infiziert. GaLV weist auch eine bessere Infektiosität für humane Stammzellen auf (Movassagh, Desmyter et al. 1998).

Nach Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Vektor werden von diesem Transkripte hergestellt. Diese werden sowohl translatiert als auch als genomische RNA in neue Virionen verpackt, welche von der Verpackungszelllinie freigesetzt werden. Mit Hilfe dieser in der Regel replikationsdefekten Virionen können Zielzellen infiziert werden, in deren Genom sich das von der übertragenen retroviralen RNA umgeschriebene Provirus stabil integriert. Dort werden das zu übertragende Gen sowie ggf. der Selektionsmarker expremiert.

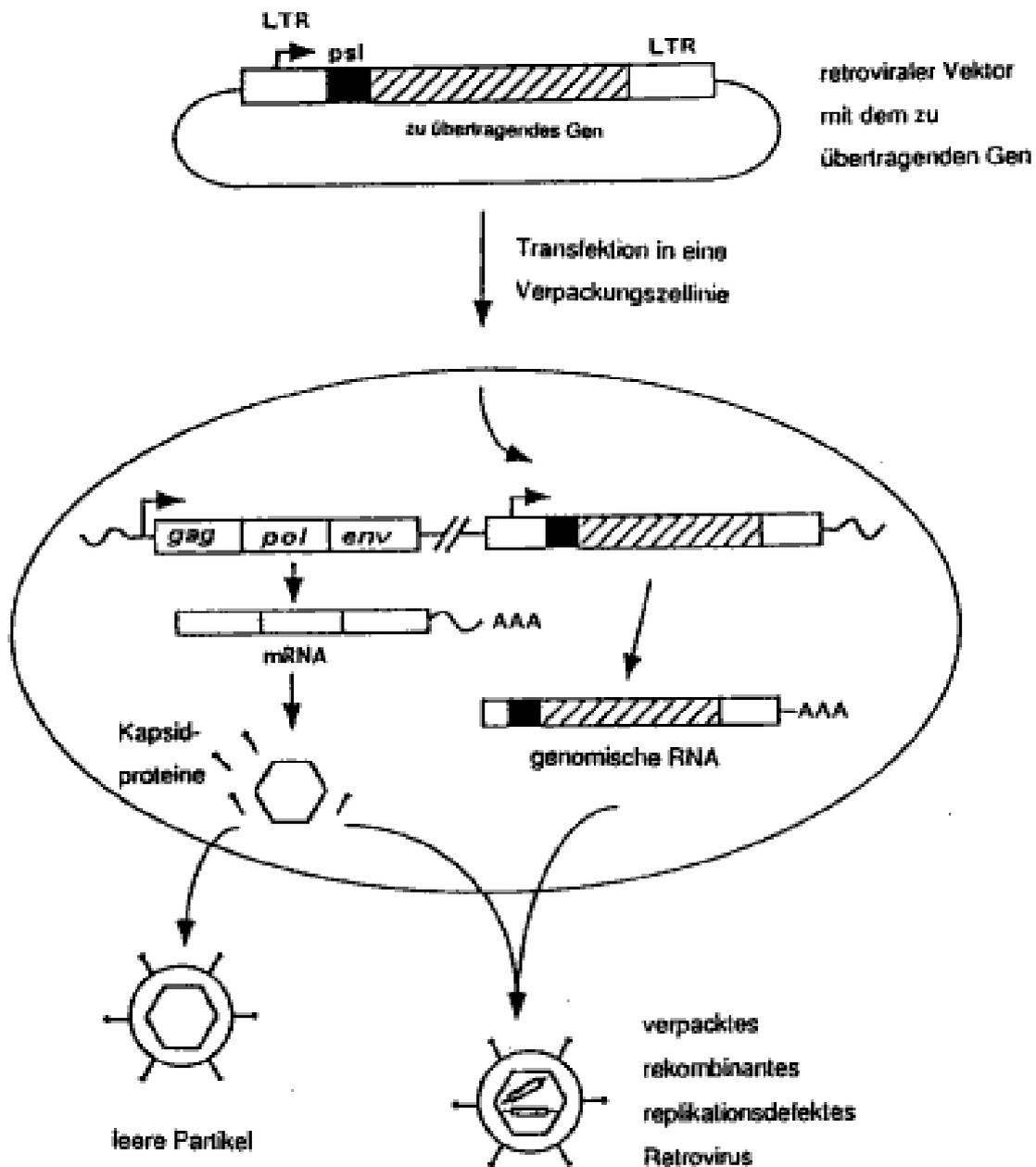


Abbildung 3: Herstellung rekombinanter replikationsdefekter Retroviren (Robert Koch Institut Deutschland). Der retrovirale Vektor mit dem zu übertragenden Gen wird in die Verpackungszelllinie, die die retroviralen Strukturproteine konstitutiv expremiert, transfiziert. Vom retroviralen Vektor werden Transkripte hergestellt, die sowohl translatiert als auch als genomische RNA mit Hilfe der viralen Strukturproteine zu neuen Virionen verpackt werden, welche von der Verpackungszelllinie abgegeben werden.

1.1.2.4. Sicherheit beim Umgang mit retroviralen Vektoren

Das Gefährdungspotenzial beim Umgang mit rekombinanten Retroviren, die von murinen Retroviren abgeleitet sind, wird als gering bewertet. Im Verlauf der Infektion integriert sich das provirale Genom ungerichtet in das Genom der Wirtszelle und könnte in Einzelfällen durch Insertionsmutagenese die Aktivierung zellulärer Onkogene oder die Änderung der Transkriptionsaktivität anderer regulatorischer Gene induzieren. Bei einigen Verpackungszelllinien wurde nach Transfektion des retroviralen Vektors auch die Entstehung replikationskompetenter Retroviren beobachtet. Derartige infektiöse Viren können durch Rekombination zwischen dem vorliegenden Helfergenom und dem eingeführten retroviralen Vektor entstehen. Eine Rekombination ist insbesondere dann möglich, wenn das Helfergenom im Vergleich zum retroviralen Wildtyp-Genom nur wenige Deletionen trägt und eine starke Homologie zwischen Vektor und Helfergenom besteht.

Um die Rekombinationswahrscheinlichkeit zu vermindern, wurden die Verpackungszelllinien verbessert, so dass nun sowohl Linien mit geringer, aber messbarer Rekombination zu replikationskompetenten Retroviren zur Verfügung stehen, als auch Linien, die keine replikationskompetenten Retroviren mehr freisetzen.

Bei der Entwicklung von Verpackungszelllinien, die rekombinante Retroviren mit veränderten Hüllproteinen erzeugen, ist die Entstehung replikationskompetenter Retroviren in der Regel nicht zu erwarten, da üblicherweise die *gag pol* Gene des MLV getrennt von den Hüllproteingenen in die Zelllinie eingeführt werden und keine ausgeprägte Homologie vorliegt. Da Retroviren mit veränderten Hüllproteinen in der Regel humane und andere Zellen infizieren, entspricht deren Gefährdungspotenzial dem von amphotropen murinen Retroviren. Bei amphotropen replikationsdefekten murinen Retroviren kann ein geringes Gefährdungspotential für den Menschen nicht ausgeschlossen werden, da Primatenzellen sowohl *in-vitro* als auch unter bestimmten Bedingungen *in-vivo* mit amphotropen Retroviren infizierbar sind.

1.1.3. Mängel retroviraler Vektoren

Die bisher verwendeten retroviralen Vektoren haben entscheidende Mängel, die ihrem erfolgreichen Einsatz in der Klinik im Wege stehen: 1) Sie werden meist nur in unzureichenden Titern produziert und können durch die Instabilität ihrer Hüllproteine nicht durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert werden (Moennig, Frank et al. 1974). 2) Ebenfalls durch die Instabilität ihrer Hüllproteine können Vektorpartikel nicht ohne Verlust der Infektiosität aufgereinigt werden. Da aber in den Zellkulturüberständen, in denen Vektoren geerntet werden, eine Reihe von immunogenen zellulären Verunreinigungen vorhanden sind, ist eine solche Aufreinigung für den klinischen Einsatz wünschenswert. 3) Retrovirale Vektoren werden, ebenfalls über ihre Hüllproteine, von Komplement inaktiviert. 4) Der Rezeptor für das Hüllprotein der klassischen amphotropen Vektoren wird auf fast alle gängigen Zelllinien expremiert. Allerdings weisen primäre humane Zellen, die attraktive Ziele für Gentherapie sind, wie Hepatozyten und hämatopoetische Stammzellen, einen Mangel an funktionellem Rezeptor auf (von Laer, Thomsen et al. 1998).

1.1.4. Retrovirale Pseudotypen

Der Einbau von Hüllproteinen anderer Virusarten in die Virushülle erweitert das Wirtsspektrum von MLV. Solche gemischten Virionen werden als Pseudotypen bezeichnet. Verpackungslinien für Pseudotypvektoren expremieren die Gene von MLV, ausgenommen *env* (*env*-negative MLV-Verpackungslinien), sowie das Hüllproteingen des „fremden“ Virus. Das G-Glykoprotein (VSV-G) des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) kann verwendet werden, um murine Retroviren mit einem breiteren Wirtsbereich auszustatten, der zusätzlich die Infektion von Hamster- und Fischzellen ermöglicht (Yee, Friedmann et al. 1994). Der VSV-Rezeptor scheint auf allen Zellen expremiert zu werden. Durch die MLV(VSV-G) Pseudotypenvektoren konnte der Transduktionsblock für amphotrope Vektoren in hämatopoetische Zelllinien überwunden werden (von Laer, Thomsen et al. 1998). Ferner können MLV(VSV) Pseudotypen zu hohen Titern aufkonzentriert und aufgereinigt werden. Allerdings ist die Toxizität des VSV-G Proteins für die Verpackungslinien wie auch für die Zielzellen problematisch. Die MLV(VSV G) Pseudotypen können nur wenige Tage lang von sterbenden Verpackungslinien geerntet werden. Diese Pseudotypen dienen aber als Prototyp, der zeigt, dass die Verwendung alternativer Hüllproteine eine vielversprechende Entwicklungsmöglichkeit viraler Vektoren darstellt.

1.2. Erfassung des wissenschaftlichen Umfeldes

Alle hier genannten Schwachstellen herkömmlicher Vektoren müssen vor dem erfolgreichen Einsatz in der Klinik behoben werden (Stocking and Baum 1997; Larochelle, Vormoor et al. 1996). Eine Alternative zu VSV-G-Hüllproteinen für den Einbau in retrovirale Vektoren bietet das Hüllprotein des Lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV-GP).

1.2.1. MLV(LCMV)-Pseudotyp

Die Glykoproteine GP-1 und GP-2 des Lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV) können ebenfalls retrovirale Vektoren pseudotypisieren. Diese Pseudotypen wurden durch die LCMV-Infektion retroviraler Verpackungslinien, die kein retrovirales Hüllprotein enthalten, hergestellt. MLV(LCMV-GP)-Pseudotypen lassen sich ohne Verlust der Infektiosität im Gradienten reinigen. Im Gegensatz zum VSV-G sind die LCMV-Glykoproteine aber nicht zelltoxisch. Die MLV(LCMV-GP)-Pseudotypen weisen außerdem, soweit es bisher untersucht wurde, einen breiten Zelltropismus auf. So sind verschiedene humane Zelllinien, sowie Hunde-, Maus- und Hamsterzellen mit dem MLV(LCMV)-Pseudotypvektoren transduzierbar. Im folgenden Abschnitt wird näher auf die Virologie des LCMV eingegangen (Cosset, Takeuchi et al. 1995; Miletic, Bruns et al. 1999).

1.2.2. Das Virus der Lymphozytären Choriomeningitis (LCM-Virus)

Das LCM-Virus gehört zur Gruppe der Arenaviren und wurde von Armstrong und Lillie 1934 identifiziert. Der natürliche Wirt ist *Mus musculus*. In der Natur weisen infizierte Mäuse keine Symptome auf. Nur unter Laborbedingungen ruft das LCMV eine tödliche Infektion hervor. Beim Menschen verläuft die Infektion unterschiedlich, meistens wie bei einem grippalen Infekt und selten als aseptische Meningitis (Lehmann-Grube 1971). Das LCM-Virus ist ein umhülltes RNA-Virus mit einem Durchmesser von 50 bis 300 nm. Das Innere des Virus enthält elektronendichte Granula, die als Wirtsribosomen identifiziert wurden. Das Virusgenom besteht aus zwei RNA-Molekülen verschiedener Größe, die L-RNA (L für "large") mit ca. 8 Kb sowie die S-RNA (S für "small") mit ca. 3,5 Kb.

Die L-RNA kodiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase und das Protein Z, das bisher ungeklärte Funktionen erfüllt. Die RNA-Polymerase wird für die Replikation und Transkription des Virusgenoms benötigt (Bishop 1990). Die S-RNA kodiert für das Nukleoprotein (NP) und die Glykoproteine GP-1 und GP-2, die in der Hülle des Virus verankert sind. Die viralen Glykoproteine GP-1 (40-46 kDa) und GP-2 (35 kDa) entstehen durch Prozessierung aus dem Vorläuferprotein GPC. GP-1 ist ein peripheres Membranprotein und somit für die Interaktion mit dem LCMV-Virusrezeptor der Zielzellen verantwortlich. GP-2 ist ein Transmembranprotein, das mit GP-1 durch ionische Bindungen interagiert. Die zwei einzelsträngigen RNA-Segmente (L und S) des LCMV Genoms kodieren für je zwei Gene in zweisinniger Orientierung. Die Nukleoprotein-Region der S-RNA wird im Zytoplasma in eine mRNA transkribiert (positive Orientierung), während die Glykoprotein-Region von der antigenomischen RNA zur GP-mRNA erst nach der Umschreibung der genomischen RNA transkribiert wird (Abb. 4). Die beiden Gene werden durch eine nicht kodierende intergenische Region (IGR) getrennt, die eine Haarnadelstruktur bildet und innerhalb der Arenaviren konserviert ist. Diese Struktur könnte als Transkriptionsterminator wirken. Diese zweisinnige Orientierung der genomischen RNA, die sowohl für die S- als auch für die L-RNA gilt, wird als "ambisense" bezeichnet. Die frühen Proteinprodukte des L-Segments und der NP-Region des S-Segments sind für eine effiziente RNA-Synthese erforderlich (Lee, Novella et al. 2000).

Die Virusfreisetzung findet durch Knospung ("Budding") an der Zellmembran statt. Dabei kommt es zu Membranverdickungen und Anlagerung von Ribosomen ähnlichen Strukturen. Im Gegensatz zu anderen umhüllten Viren ist die Verpackung der Virionen bei den Arenaviren nicht sehr genau, da unterschiedliche Mengen an Wirtsribosomen und genomischer RNA verpackt werden. Dies könnte für die unterschiedliche Größe der LCMV-Partikel verantwortlich sein (Abb. 5).

Das LCMV infiziert ein breites Spektrum verschiedener Säugetiere (Binder, Fehr et al. 1997; Borrow, Evans et al. 1995; Borrow, Tishon et al. 1991; Klavinskis and Oldstone 1987). Das breite Wirtsspektrum wies darauf hin, dass der LCMV-Rezeptor in verschiedenen Organismen konserviert ist. In infizierten neugeborenen Mäusen konnte außerdem das LCMV aus den meisten Organen isoliert werden. Im Gegensatz zu den meisten murinen Zelllinien waren Lymphozyten und Neuronen gegenüber der LCMV-Infektion resistent (Borrow, Tishon et al. 1991; de la Torre, Rall et al. 1993).

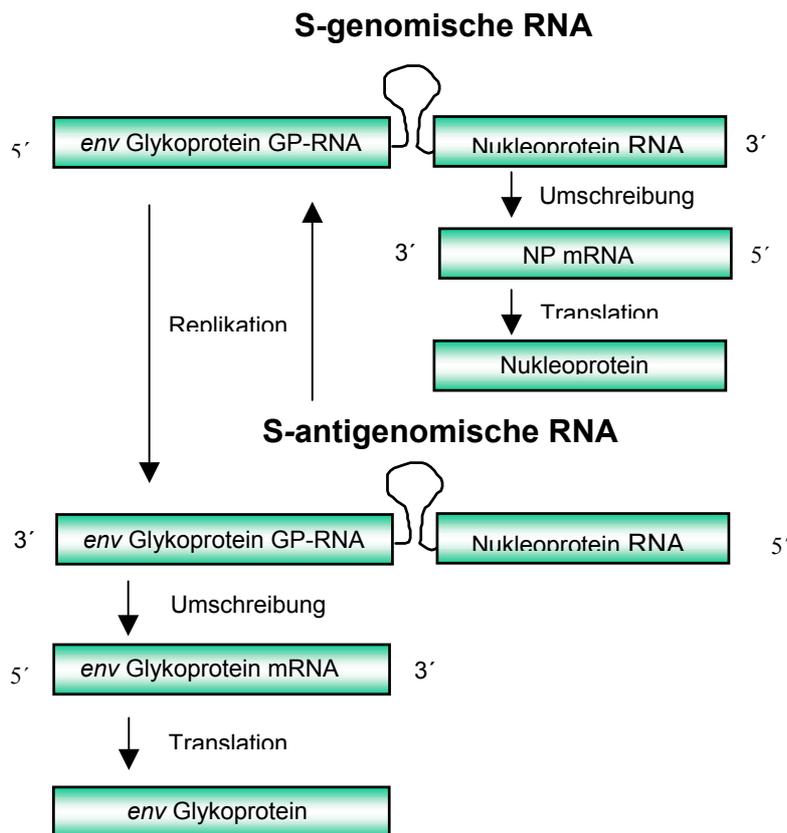


Abbildung 4: Schematische Darstellung der kodierten Regionen des genomischen S-RNA-Segments vom LCMV. Zweisinnige Orientierung (Ambisense) der GP- und NP-Regionen. Beide Gene werden durch eine nicht kodierende Haarnadelstruktur getrennt. Als Resultat dieses Arrangements kann die GP-mRNA erst nach der Replikation der LCMV-genomischen-RNA transkribiert werden. Dies gilt auch für das L-RNA-Segment. Die Transkription des LCMV-Genoms erfolgt im Zytoplasma (Southern 1996).

Ein Fortschritt für die Identifikation des Rezeptors war die Analyse der LCMV-Bindung an Fibroblasten, hämatopoetische und epitheliale Zellen. Bei murinen lymphoiden Zelllinien konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Die Ursache der Resistenz dieser Zelllinien schien auf Rezeptorebene zu liegen. Das Bindungsepitop für neutralisierende Antikörper ist in GP-1 (Parekh and Buchmeier 1986; Burns and Buchmeier 1991). LCMV-Tropismus-Varianten, die Makrophagen bzw. Lymphozyten oder beides (amphotropic) besser infizieren, wurde von King, de Fries et al. 1990 beschrieben. Diese Stämme wurden von CD4+ T-Lymphozyten neugeborener LCMV-infizierter Mäuse isoliert. In den Makrophagentropen Stämmen wurden Punktmutationen in der RNA-Polymerase (höher Titer) und im Hüllprotein (bessere Bindung) nachgewiesen (Matloubian, Kolhekar et al. 1993).

Die Entstehung zellspezifischer LCMV-Varianten kann durch die hohe Mutationsrate und Evolutionsmechanismen von RNA-Viren erklärt werden (Steinhauer and Holland 1987; Holland, Spindler et al. 1982). Diese Eigenschaft des LCMV-Hüllproteins durch Punktmutationen einen zellspezifischen Tropismus zu vermitteln, wäre für den Einsatz des MLV(LCMV)-Pseudotyps für Gentherapie ein großer Vorteil (cell targeting).

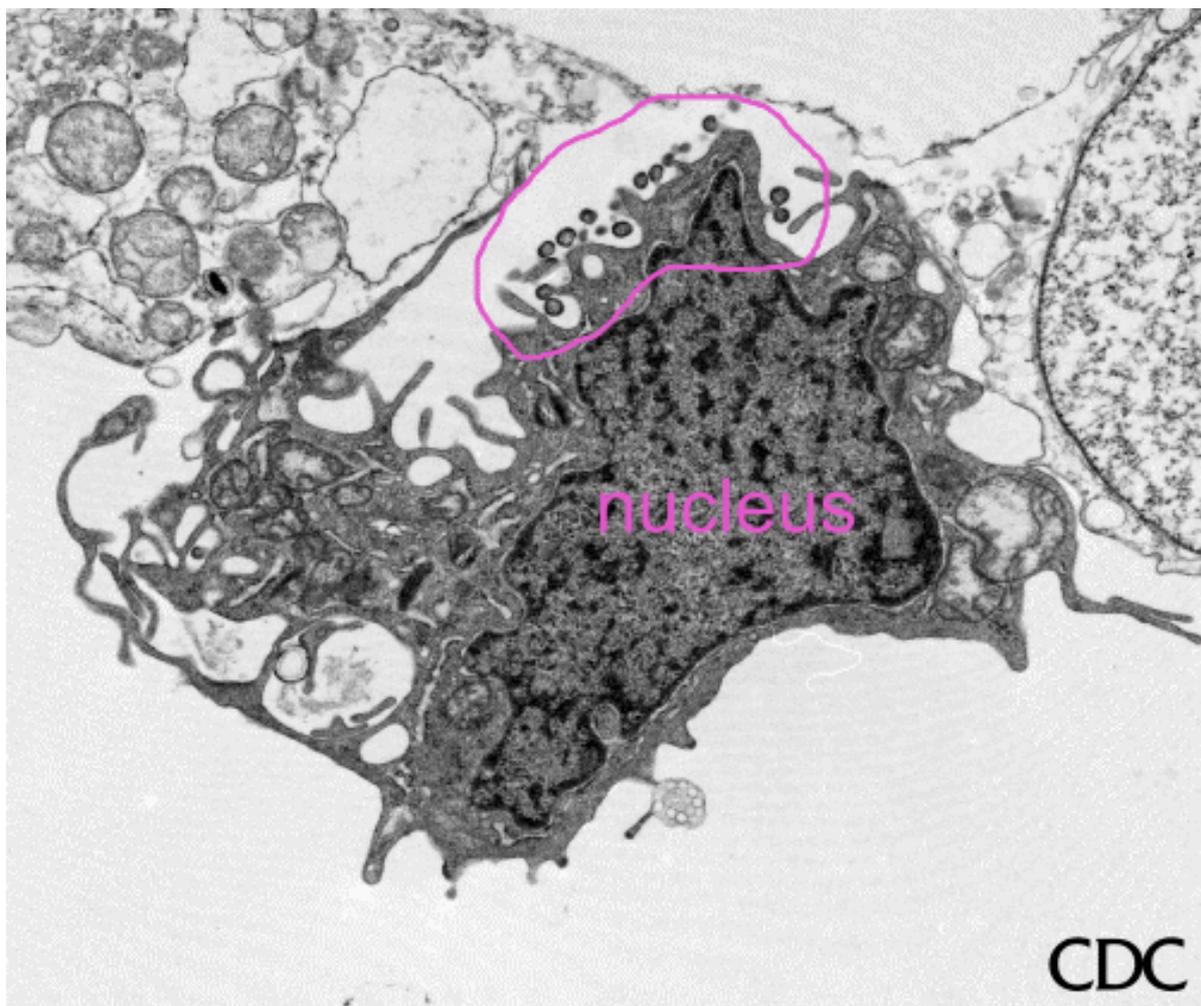


Abbildung 5: Elektronenmikroskopie. Freisetzung von LCMV-Partikel aus infizierten Vero-Zellen (Center for Disease Control CDC, Atlanta USA).

1.3. Problemstellung

Der Eintritt des LCM-Virus in die Zielzelle wird durch einen Protein-Rezeptor vermittelt, der am Anfang dieses Vorhabens noch nicht identifiziert war. Auch die Verteilung dieses Rezeptors in verschiedenen Geweben und Zellarten war nicht im Detail untersucht. Für die Gentherapie wichtige Zielzellen, wie Lymphozyten, waren in Mäusen gegenüber der LCMV-Infektion resistent. Aus diesem Grund war die Untersuchung der Expression des LCMV-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien von Interesse. Wichtig war es hierbei vor allem, eine Zelllinie zu identifizieren, die keinen LCMV-Rezeptor trägt, da dieser Rezeptor mit Hilfe der Expressions-Klonierung in einer negativen Zelllinie kloniert werden sollte.

1.3.1. LCMV-Tropismus (Verteilung des LCMV-Rezeptors auf verschiedenen Zellarten)

Die Untersuchungen zur Expression des Rezeptors konzentrieren sich vor allem auf Zellen, die für die Gentherapie wichtig sind, wie hämatopoetische Vorläuferzellen, Hepatozyten, Neuronen und Lymphozyten. Außerdem wurden besonders eingehende Untersuchungen an der humanen T-lymphozytären Linie Jurkat vorgenommen, da diese in Vorversuchen weder mit LCM-Wildvirus noch mit MLV(LCMV)-Pseudotypen transduzierbar war. Diese Linie erschien somit ein geeigneter Kandidat zu sein, um den Rezeptor zu klonieren. Zwei Methoden wurden angewendet, um einen funktionellen LCMV Rezeptor auf Zellen nachzuweisen: 1. Infektion mit dem LCM-Wildvirus, 2. Transduktion mit dem (MLV)LCMV-Pseudotyp. Zum Rezeptornachweis auf Zellen reicht es jedoch nicht unbedingt aus, die Replikation vom LCM-Wildvirus zu analysieren. So können sich Viren auch in einigen Rezeptor-positiven Zellen nicht vermehren (z.B. durch einen Mangel an zellulären Kofaktoren). Außerdem ist möglicherweise die Transduktion mit dem MLV(LCMV)-Pseudotypen durch den zusätzlich in Pseudotyppräparationen enthaltenen LCM-Wildvirus in einigen Zellen gehemmt. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Zelllinien, die nicht mit LCM-Wildvirus und nicht mit MLV(LCMV)-Pseudotyp-Vektoren infizierbar sind, trotzdem einen funktionellen Rezeptor tragen. Daher sollte noch eine weitere Nachweismethode eingesetzt werden. Als Maß für die Expression des Rezeptors wurde die Bindung des LCM-Virus an die Zellmembran untersucht. Hierbei wurde LCM-Virus an die Zelloberfläche gebunden und mittels antiviraler Antikörper durch Durchflusszytometrie nachgewiesen. Ein monoklonaler Antikörper gegen LCMV-GP war bereits verfügbar.

1.3.2. Klonierung des LCMV-Rezeptors

Für die Klonierung des Rezeptors wurde eine Zelllinie eingesetzt, auf der in keiner der vorangegangenen Untersuchungen LCMV-Rezeptor nachgewiesen werden konnte. In diesen Zellen wurde dann cDNA einer retroviralen Expressionsbank expremiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem MLV(LCMV) Pseudotyp-Vektor infiziert, der einen Selektionsmarker enthält. Nur die Zellen, die die cDNA des LCMV-Rezeptorgens expremieren, werden hierbei transduziert und erhalten dadurch den retroviral kodierten Selektionsmarker. Nach der Selektion wurden die resistenten Klone auf ihre Infizierbarkeit mit LCMV geprüft. Aus Zellklonen, die tatsächlich für LCMV empfänglich geworden sind, sollte die ektope cDNA kloniert und charakterisiert werden. Hierdurch wurde geprüft, ob die cDNA tatsächlich für einen funktionellen LCMV-Rezeptor kodiert.

1.4. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war die eingehende Untersuchung des Tropismus von LCMV und der Expression des LCMV Rezeptors auf verschiedene Zellarten. Zu diesem Zweck sollten für gentherapeutische Anwendungen interessante Zelllinien im Hinblick auf a) die Replikation des LCMV, b) die Expression der viralen Proteine und c) die Bindung von LCMV untersucht werden. Hierbei sollte die Ursache der Resistenz von humanen lymphoiden Jurkat-Zellen geklärt werden. Der Nachweis bzw. Mangel eines funktionellen LCMV-Rezeptors in verschiedenen Zelllinien wurde durch die Transduktion mit MLV(LCMV) Pseudotypen analysiert. Mit Hilfe der Expressions-Klonierung wurde anschließend die Klonierung des LCMV-Rezeptors in Jurkat-Zellen versucht.

In der Zeit der Durchführung dieses Vorhabens wurde von einer anderen Arbeitsgruppe das α -Dystroglycan, ein hoch konserviertes und in vielen verschiedenen Zelllinien vorhandenes Protein, als LCMV-Rezeptor identifiziert (Cao et al. 1998). Dies öffnete neue Möglichkeiten, um die Expression des Rezeptors in Zellen zu analysieren. Unter diesem neuen Aspekt wurde die Expression des α -Dystroglycanproteins in Jurkat- Zellen genauer untersucht und mittels RT-PCR quantifiziert.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkulturmethoden

2.1.1. Wachstumsmedien und Lösungen

- Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM; GIBCO, Eggenstein).
- Iscoves Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Flow Laboratories, Meckenheim).
- Minimal Essential Medium (MEM; Flow Laboratories, Meckenheim).
- Rosewelt Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI; GIBCO, Eggenstein).
- Fetal Calf Serum (FCS, Sigma, München).
- Horse Serum (PAN Systems, Aidenbach).
- BIT Serum Substitute (CellSystems).
- Pyruvat (GIBCO, Eggenstein).
- Trypsin/EDTA (Seromed, Berlin).
- Glutamin 200mM.

- PBS-Puffer: Natriumchlorid 0,13 mM, Kaliumchlorid 2,7 mM, Dinatriumhydrogenphosphat 6,5 mM, Kaliumdihydrogenphosphat 1,5 mM.

- Methylzellulose: MethoCult™ Basismedium H4100 2,6% „high viscosity“ Methylzellulose in IMDM (CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen Deutschland).

- Agar (Difco, Detroit, USA).
- Protamin Sulfat Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland).

- Zytokine (PEPRO TECH, Inc. Rocky Hill, NJ) Angaben über die Endkonzentration:
 - Stem cell factor (SCF) c-kit ligand 50ng/ml.
 - Granulocyte Macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 10ng/ml.
 - Interleukin 3 (IL 3) 50 ng/ml, Flt3-ligand (hrFLT) (100 ng/mL).
 - Bovine Papiloma Virus (BPV) konditioniertes Medium vom Hybridom XX3 AG-8653 (Labor F. Mehlers Basel): beinhaltet murinen IL-3 Wachstumsfaktor geeignet für die Anzucht von murinen hämatopoetischen Stammzellen.

2.1.2. Zelllinien und Standardkulturbedingungen

Sämtliche Nährmedien beinhalten 2% Glutamin (200mM) und 1% Pyruvat (100mM), der pH wurde mittels NaHCO₃ (7,5% Lösung) auf 7,6 eingestellt.

2.1.2.1. Adhärenente Zelllinien

L929	Murine Fibroblastenzelllinie (ATCC Nr. CRL-2148)-DMEM 10% FCS.
BHK	Hamster Nierenzelllinie (ATCC Nr. CRL-8544)-DMEM 5% FCS.
HUH-7	Humane Hepatoma-Zelllinie-DMEM 10% FCS.
SC-1	Murine embryonale Fibroblastsen (ATCC Nr. CRL-1404) -MEM.10% FCS.
TE671	Humane Fibroblastenzelllinie Te 671 (ATCC HTB 139)-DMEM 10% FCS.
TELCeB	TE671 Zellklon, der die retroviralen Gene <i>gag</i> , <i>pol</i> und den retroviralen Vektor MFGnls <i>LacZ</i> enthält-DMEM 10% FCS (Cosset, Takeuchi et al. 1995).
293	Humane Nierenepithelien (ATCC Nr. CRL-1)-DMEM 10% FCS.
Phoenix	GP- und Ampho GP-Phoenix sind rekombinante 293 Zelllinien, die die retroviralen Gene <i>gag</i> , <i>pol</i> bzw. das amphotrope Hüllprotein <i>env</i> exprimieren - DMEM 10% FCS (Pear, Nolan et al. 1993).
MS-5	Maus hämatopoetische Stromazellen-DMEM 10% FCS.

2.1.2.2. Suspensionszellen

CD 34+	Primäre aus Nabelschnur isolierte humane hämatopoetische Stammzellen in IMDM 20% BIT Serum Substitute mit Wachstumsfaktoren (SCF, FLT, IL-3). Die Isolierung erfolgte durch positive Selektion von CD 34 exprimierenden Zellen mittels MACS „Isolations-Kit“ nach Färbung der Zellen mit PE-gekoppeltem HPCA-2 Antikörper und Separation im Magnetfeld (MACS „High Gradient Magnetic Separation Columns“ Miltenyi Biotec, Gladbach Deutschland).
K562	Humane Erythroleukämie Zelllinie (ATCC Nr. CCL-243)-RPMI 10% FCS.
Jurkat	Humane T-Lymphozyten (ATCC TIB-152)-RPMI 10% FCS.
MO-7e	Faktorabhängige humane hämatopoetische leukämische Vorläuferzellen (IL-3, GM-CSF)-IMDM 20% FCS (Griffin, Cannistra et al. 1990; Avanzi, Porcu et al. 1991).

FDC-Pmix Murine hämatopoetische Stammzellen. Diese Zelllinie wurde aus retroviral infizierten Stammzellen von Mäusen (B6D2F₁) etabliert (Spooncer, Heyworth et al. 1986; Boettiger and Dexter 1984). Anzucht in mIL-3 konditioniertem Medium der BPV -IMDM 20%HS.

2.1.2.3. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in Brutschränken (Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂, die CD 34+ humane hämatopoetische Stammzellen zusätzlich bei einer 95%igen Luftfeuchtigkeit (Feuchtbrutschrank) kultiviert.

Durchführung: Adhärente Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen (T 25) bzw. Gewebekulturpetrischalen (Ø 9cm), Suspensionszellen in unbehandelten Petrischalen kultiviert. Das Medium wurde bei allen Zelllinien alle 2-3 Tage gewechselt. Adhärenz wachsende Zelllinien wurden, wenn die Kultur konfluent war, mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung von ihrer Unterlage gelöst, vereinzelt und in frischen Gewebekulturgefäßen subkultiviert. Zum Subkultivieren der in Suspension wachsenden hämatopoetischen Zelllinien erfolgte alle 2-3 Tage ein Umsetzen der Zellen in neues Medium, in der Regel 1:5 verdünnt (Zelldichte von 5×10^4 bis 1×10^6). Zum längerfristigen Lagern wurden die Zellen unter kontrollierten Bedingungen in FCS unter Zusatz von 10 % DMSO eingefroren und in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs gelagert.

2.2. Tropismus LCMV

2.2.1. Anzucht von LCM-Wildvirus

Durchführung: Die Anzucht von LCM-Wildvirus erfolgte in L929-Zellen. Für die Vermehrung wurde ein Überstand von LCMV-WE-Strain bekannter Konzentration verwendet. Subkonfluente Kulturen (Ø 9cm Gewebekulturschalen, 10^6 Zellen/Schale) wurden mit PBS gewaschen und mit einer MOI von 0,01 in 2 ml DMEM/10% FCS für 30 min im 37°C Brutschrank infiziert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und frisches Medium hinzugegeben. Nach Inkubation für 48 h im Brutschrank wurden die virushaltigen Überstände abgesammelt und durch einen 0,8 µm Filter filtriert, um die Zellreste zu entfernen. Die Überstände wurden aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.2. Plaque-Test

Material: DMEM/Methylzellulose 0,9% (1:1 Lösung von 2xDMEM und MZ 1,8%)
2XDMEM.
Kristallviolettlösung: 0.2(w/v)% Kristallviolett, 11% (v/v) Formaldehyd,
2% (v/v) Ethanol in dH₂O.

Durchführung: Von einer nicht zu dicht gewachsenen Zellkulturschale mit L929-Zellen wurde das Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit Trypsin von der Unterlage gelöst und mit DMEM auf eine Zellzahl von $1,1 \times 10^5$ /ml eingestellt. Je 2 ml der Zellsuspension wurde in ein Loch einer 6-Loch-Zellkulturplatte gegeben. Nach Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 16-24 h wurde das Medium abgenommen und LCM-Virus mit Faktor 10 in Reihe verdünnt (in DMEM). Die Verdünnungen wurden in einem Volumen von 0,4 ml/Loch einer 6-Loch-Platte zugegeben und anschließend im Brutschrank bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach Abnehmen der Überstände wurden 2 ml Methylzellulose/DMEM(2x) pro Vertiefung hinzugegeben. Die Platten wurden für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden 1,5 ml DMEM (2x)/Loch hinzugefügt und die Platten für einen weiteren Tag bei 37°C inkubiert. Der Inhalt der Platten wurde abgegossen und der Zellrasen mit Kristallviolett für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Wässern und Trocknen der Platten konnten die Plaques gezählt werden. Die Anzahl der Plaques wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und als Plaque Forming Units /ml Überstand (PFU) angegeben.

2.2.3. LCMV Replikation

2.2.3.1. Adhärenente Zelllinie

Für die Infektion der verschiedenen Zelllinien wurde LCMV-WE-Überstand bekannter Konzentration verwendet. Das Verhältnis Viruspartikel zu Zellen (moi) wurde durch Verdünnen dieses Überstandes eingestellt. Jeweils 10^6 Zellen wurden infiziert. Der Titer des freigesetzten Virus am 1., 2., und 3. Tag wurde mittels Plaque-Test gemessen. Die Infektion adhärenter Zelllinien erfolgte wie oben beschrieben (s. Anzucht von LCM-Wildvirus). Suspensionszellen wurden wie im folgenden Kapitel beschrieben infiziert:

2.2.3.2. Suspensionszellen

Die Suspensionszellen wurden 12 h vor Versuchsbeginn mit frischem Medium verdünnt. Vor der Infektion wurden die Zellen pelletiert und mit frischem Medium resuspendiert. Die Zelldichte wurde auf $2 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation von 0,5 ml der Zellsuspension mit 0,5 ml Virusüberstand im Brutschrank bei 37°C für 30 min. Für die Inkubation wurden 6-Loch-Platten verwendet. Nachfolgend wurden die infizierten Zellen pelletiert, einmal mit PBS gewaschen, in 10 ml frischem Medium aufgenommen und in Petrischalen im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Überstände wurden täglich abgesammelt und sämtliche Zellen ohne Subkultivierung in frischem Medium gehalten. Um die Zellreste zu entfernen, wurden die Überstände durch einen $0,8 \mu\text{m}$ Filter filtriert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Der Titer wurde nach dem Auftauen der Überstände mittels Plaque-Test bestimmt.

2.2.4. Immunfluoreszenz

Die Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien (Anteil infizierter Zellen einer Zellpopulation) wurde mittels Immunfluoreszenz gemessen.

Material: IFT Objektträger mit Vertiefungen.

Primärer Antikörper: Kaninchen anti-LCMV Serum 1:50 in PBS verdünnt
(Bruns, Kratzberg et al. 1990).

Sekund. Antikörper: Goat anti Rabbit FITC (Pharmigen) 1:50 in PBS Evans-Blue verdünnt.
IF Mikroskop.

Azeton/Methanol Lösung 1:1 (-20°C).

Feuchte Kammer.

5% Glycerinlösung in dH_2O .

Durchführung: Adhärenente Zelllinien wurden trypsiniert, pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Suspensionszellen wurden pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Zelldichte wurde bei der Aufnahme in PBS auf 10^6 pro ml eingestellt. Von den jeweiligen Zellsuspensionen wurden $10 \mu\text{l}$ pro Vertiefung des Trägers aufgetragen. Nach Lufttrocknen (ca. 10 min) erfolgte die Fixierung mit Azeton/Methanol Lösung bei -20°C und die Inkubation mit $50 \mu\text{l}$ des primären Antikörpers in einer feuchten Kammer für 30 min.

Nach 3x Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurden die Objektträger mit 50 µl des sekundären Antikörpers inkubiert und anschließend 3x mit PBS und 1x mit Aqua Bidest in einer Küvette gewaschen. Nach der Beschichtung mit Glycerinlösung und dem Abdecken mit einem Deckglas wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop angesehen. Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden die Zellen durch die Absorption von Licht erregt und unter Aussendung von Licht höherer Wellenlänge relaxiert. Die Intensität und die Wellenlänge des emittierten Lichtes sind für die infizierten (FITC-markierten) und die nicht infizierten (Evans Blue) Zellen unterschiedlich. Somit können die immunreaktiven Zellen (grün) aus der gesamten Zellpopulation (rot) erkannt werden. Der Anteil der immunreaktiven Zellen von jeweils 200 ausgezählten, wurde in Dreifachbestimmung gezählt.

2.2.5. Virusbindungsanalysen

Die Bindungsstudien wurden als ein indirekter Weg zur Abschätzung der Rezeptormenge auf die Oberfläche der Zielzellen gewählt. Derzeit war der Rezeptor des LCMV noch nicht bekannt.

Material: FACS Gerät Becton Dickinson, Heidelberg.
Kaltes PBS 3%FCS (4 °C).

Primärer Antikörper: Monoklonaler Maus anti-LCMV gp 44 Antikörper
(Bruns, Cihak et al. 1983) in PBS 3%FCS (4 °C) 1:30 verdünnt.
Monoklonaler Maus anti-VSV-G Antikörper 1:30 verdünnt
(Isotypkontrolle von M. Bruns)

Sekund. Antikörper: FITC gekoppelter Goat anti-Maus Antikörper
(Dako, Glostrup, Dänemark) 1:50 in PBS 3%FCS (4 °C) verdünnt.
Fixierlösung: 2%ige Paraformaldehydlösung in PBS, (4 °C).
PBS, (4 °C).

Durchführung: Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 5×10^5 Zellen abgesammelt (adhärente Zellen wurden zuerst trypsinisiert), pelletiert und mit virushaltigem Überstand bei 4 °C für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 2 ml eiskaltem serumhaltigen PBS gewaschen und in 50 µl einer 1:30-Verdünnung von einem monoklonalen anti-LCMV-GP Mausantikörper bzw. anti-VSV-G Isotypkontrolle-Antikörper (gelöst in PBS) resuspendiert.

Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min) und dann für weitere 30 min in 50 µl einer 1:50-Verdünnung von FITC-gekoppeltem Ziege anti-Maus Antikörper auf Eis inkubiert. Nach der nächsten Waschung (3x mit eiskaltem PBS) wurden die Ansätze in 500 µl PBS mit 2% Paraformaldehyd fixiert und schließlich am FACScalibur analysiert. Nach erfolgter Virusbindung und Färbung wurden die Zellproben auf ihre Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer untersucht.

2.2.6. Herstellung von MLV(LCMV)-Pseudotypen

Die Herstellung von MLV(LCMV)-Pseudotypen erfolgte in TELCeB. Subkonfluente Kulturen (10 cm Gewebekulturschalen, 10^6 Zellen/Schale) wurden mit PBS gewaschen und mit LCM-Wildvirus (moi von 0,01) in 2ml DMEM/10% FCS für 30 min im Brutschrank bei 37°C infiziert. Anschließend wurde frisches Medium (10 ml/Gewebekulturschale) hinzugegeben. Nach Inkubation für 72 h im Brutschrank wurden die virushaltigen Überstände abgesammelt und durch einen 0,8 µm Filter filtriert, um die Zellreste zu entfernen. Nachfolgend wurden die Überstände aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.7. Bestimmung des MLV(LCMV)-Pseudotypiters

Material: Fixierlösung: PBS/Paraformaldehyd 2% (4°C).

X-gal stain solution: 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 2mM $MgCl_2$ in PBS löst (bei 4°C gelagert).

X-gal (20 mg/ml gelöst in Methylformamid).

2.2.7.1. LacZ-Assay mit adhärenenten Zellen

Durchführung: Adhärenente Zielzellen wurden 6 h vor Infektion mit Pseudotypüberständen von LCMV-infizierten TelCeB in 24-Lochplatten zu 5×10^4 /well ausgesät. Die Pseudotyp-Überstände wurden mit Medium in Reihe verdünnt (1:10,1:100 etc.) und in einem Volumen von 1ml/Loch auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden für 1h bei 2000 rpm zentrifugiert und dann für 2 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen.

Nachfolgend wurden die Zellen mit PBS/Formaldehyd 2% (0,4 ml/Loch) für 5 min fixiert. Das PBS/Formaldehyd-Gemisch wurde abgenommen und die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde X-gal (20 mg/ml) in der X-gal "stain solution" auf 1 mg/ml verdünnt. Das Gemisch wurde in einem Volumen von 0,2 ml/Loch auf die 24 Lochplatte gegeben. Nach der Inkubation im Brutschrank für 6-24 h bei 37°C konnten die positiven Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Die Anzahl der positiven Zellen wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und als LacZ Transfer Unit /ml Überstand (LTU) angegeben.

2.2.7.2. LacZ-Assay mit Suspensionszellen

Durchführung: Die Zielzellen (Suspensionszellen) wurden 6 h vor Versuchsbeginn zu 5×10^4 /Loch in 24-Lochplatten ausgesät. Pseudotypüberstände von LCMV-infizierten TELCeB wurden auf den Zielzellen in Reihe verdünnt (1:10, 1:100 etc.). Die Platten wurden für 1h bei 2000 rpm zentrifugiert und dann für 2 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und bei 10000 rpm für 10 sec abzentrifugiert. Nach Waschen mit PBS (Zentrifugation bei 10000 rpm für 10 sec) wurden die Zellen in 0,4 ml PBS/Paraformaldehyd 2 % pro Eppendorfgefäß resuspendiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 10000 rpm für 10 sec abzentrifugiert und die Überstände abgossen. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 10000 rpm für 10s). X-gal (20mg/ml) wurde in der X-gal stain solution auf 1mg/ml verdünnt und die Zellen wurden in 0,4 ml der Lösung pro Eppendorfgefäß resuspendiert. Nach der Inkubation im Brutschrank für 6-24 h bei 37°C konnten die positiven Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Die Anzahl der positiven Zellen wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und als LacZ Transfer Unit LTU/ml Überstand angegeben.

2.3. Expressionsklonierung des LCMV-Rezeptors

2.3.1. Vorversuche

2.3.1.1. Bestimmung der Klonierungseffizienz von Jurkat-Zellen

Material: MethoCult™ Basismedium für „colony assays“ von humanen Zellen H4100
2,6 % „high viscosity“ Methylzellulose in IMDM (CellSystems®
Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen Deutschland).

Agar für Klonierung 3% (Difco, Detroit USA).

a) In Methylzellulose 0,9 %

Durchführung: 40 ml der 2,6 %igen IMDM/Methylzellulose-Lösung wurden mit 1 ml Glutamin 200mM, 1 ml Pyruvat, 20 ml FCS und 38 ml RPMI gemischt (Endvolumen von 100ml, 1% Methylzellulose), kräftig geschüttelt und zum Entfernen der Luftblasen ca. 15 min stehengelassen. Folgende Jurkat-Zellverdünnungen wurden in RPMI vorbereitet: 6×10^3 /ml, 6×10^2 /ml, 60/ml und 6/ml. In 7 ml-sterile Gefäße wurden mittels einer 20 ml sterilen Spritze jeweils 5ml der 1%igen Methylzellulose-Lösung verteilt und 0,5ml jeder Zellverdünnung hinzugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurden die Gefäße für 15 min stehen gelassen und mit einer neuen sterilen 5 ml Spritze je Zellverdünnung in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte überführt. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C. Nach zwei Wochen wurden die gewachsenen Jurkat-Kolonien ausgezählt. Die Klonierungseffizienz wurde als Mittelwert von drei Ansätzen pro Zellverdünnung angegeben.

b) In Agar 0,28 %

Durchführung: In 100 ml sterilem dH₂O wurden 3 gr Agar gelöst, in der Mikrowelle (Daewoo) für einige Sekunden aufgeköcht und bei 55°C gekühlt. 10 ml der 3%igen Agar-Lösung wurden mit 90 ml bei 45°C vorgewärmtem Medium (RPMI-20%FCS) gemischt und bei dieser Temperatur im Wasserbad aufbewahrt. Eine Zehner-Verdünnungsreihe der Jurkat-Zellsuspension mit 6×10^3 /ml, 6×10^2 /ml, 60/ml und 6/ml Zellen wurde in RPMI 20%FCS vorbereitet und 0,5 ml jeweils in 6-Loch-Platten eingeführt. Jedes well wurde anschließend mit 4,5 ml der 0,3%igen Agar/Medium-Lösung aufgefüllt. Der Inhalt wurde durch Pipettieren gemischt. Nach Kühlung bei Raumtemperatur wurden die Zellen in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C für zwei Wochen kultiviert. Die Auszählung der gewachsenen Klone erfolgte in drei unterschiedlichen Ansätzen pro Zellverdünnung wie bei der Klonierung in Methylzellulose.

2.3.1.2. Verpackung der retroviralen cDNA-Bank und des EGFP-Kontrollvektors

Material: retrovirale cDNA: hergestellt aus einer murinen MS-5 Stroma Zelllinie und kloniert in einem retroviralen pMX Vektor ohne Markergen. Die cDNA wurde uns von einer mit uns zusammenarbeitenden Gruppe zur Verfügung gestellt (Kitamura 1998).
VSV-G Hüllprotein Plasmid: M3 pSUT-VSV-G-NJ (S. Thomsen, 1996)
Plasmid von (Hara and Miyajima 1992).
EGFP-Plasmid: M56 pSF α 11GFP(SHX) (M. Schwieger 1998) (5'LTR von MPSV, 3'LTR von SF α), Vektor von (Baum, Hegewisch-Becker et al. 1995).
Gag-pol-Plasmid: M57 pSVgagpol (SV40-Promotor, SV40 Poly-A-Signal) (H. Woodrich 1997).
Phoenix Ampho gp Zelllinie.
CaPO₄ Transfektions-Kit.
Chloroquinlösung: 8 mg pro ml in PBS.

Durchführung: Für die Verpackung wurden am Tag vor der Transfektion 2x10⁶ Phoenix-Zellen in zwei (\varnothing 9cm) Gewebekulturschalen ausgesät. Am Versuchstag wurde das Medium gewechselt und 10 μ l Chloroquinlösung hinzugefügt. In 450 μ l dH₂O wurden 1 μ l der retroviralen Expressionsbank (bzw. 1 μ g EGFP), 3 μ g VSV-G- und 10 μ g gag pol –Plasmid-DNA aufgenommen und mit 50 μ l 2,5 M CaCl₂-Lösung versetzt. Zu dieser Mischung wurden 500 μ l 2 x HEBS-Puffer tropfenweise zugefügt, gevortext und 15 min inkubiert. Die Mischung wurde tropfenweise über die Gewebekulturschale verteilt. Durch vorsichtiges Schwenken des Kulturgefäßes wurde für eine gleichmäßige Verteilung des Kopräzipitats gesorgt. Der Transduktionsansatz wurde im Brutschrank bei 37°C über 10 h inkubiert. Anschließend erfolgte ein Medienwechsel und eine weitere Inkubation über Nacht. Am folgenden Tag wurde die von den Zellen nicht aufgenommene DNA durch zweimaliges Waschen mit Calcium-Magnesium freiem PBS-Puffer entfernt und mit frischem Medium kultiviert. Nach Inkubation für 48 h im Brutschrank wurden die virushaltigen Überstände abgesammelt und, um die Zellreste zu entfernen, durch einen 0,8 μ m Filter filtriert. Die Überstände wurden aliquotiert und bei –80°C eingefroren.

2.3.1.3. Protokoll für die Transduktion von Jurkat-Zellen mit der c-DNA-Bank

Die retrovirale cDNA-Bank war in einem pMX-Vektor, der kein Markergen beinhaltet, kloniert. Deswegen war die Etablierung eines Protokolls für die Transduktion von Jurkat-Zellen nur indirekt mit einem Kontrollvektor möglich. Zu diesem Zweck wurde ein retroviraler EGFP-Vektor verwendet. Um die Expression der gesamten cDNA-Bank zu ermöglichen und zeitgleich multiple Insertionen zu vermeiden, wurde bei einer Ausgangszellpopulation von 10^6 Jurkat-Zellen eine Transduktionseffizienz von 20-30% angestrebt. Die Transduktionseffizienz ist von der MOI abhängig und unterschiedlich für jede Zelllinie.

2.3.1.3.1. Infektion von Jurkat-Zellen mit dem EGFP-Kontrollvektor

Zur Bestimmung des Titers nach der transienten Verpackung wurden zwei verschiedene Zelllinien (Jurkat und Te 671) mit dem EGFP-Kontrollvektor infiziert. Um die Transduktionseffizienz zwischen Fibroblasten und Lymphozyten vergleichen zu können, wurden Infektionsbedingungen gewählt, unter denen die adhären Zellen und Suspensionszellen möglichst analog behandelt wurden.

2.3.1.3.2. Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse

Durchführung: Hierfür wurden 12 h vor Durchführung des Versuchs 2×10^5 Jurkat- bzw. Te 671-Zellen/Loch einer 6-Loch-Gewebekulturplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gegen Verdünnungen des retroviralen EGFP-Überstandes ausgetauscht. Die Verdünnungsreihen (10^0 - 10^{-2}) des virushaltigen Mediums wurden mit Protaminsulfat ($4 \mu\text{g/ml}$) gemischt und $0,25 \text{ ml}$ jeweils pro Infektionsansatz in Dreifachbestimmung verwendet. Die Platten wurden anschließend für 2 h bei 2000 rpm und RT zentrifugiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach 16 h Inkubation im Brutschrank wurden die virushaltigen Überstände gegen 2 ml frisches Medium pro well ausgetauscht. Am zweiten Tag nach der Infektion erfolgte die Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse. Zu diesem Zweck wurden die Zellen $2 \times$ gewaschen (die Te 671 zuerst trypsiniert) in $0,5 \text{ ml}$ PBS resuspendiert und auf EGFP-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Die Transduktionseffizienz konnte als Anteil fluoreszierender Zellen der Jurkat- bzw. Te 671-Zellpopulation gemessen werden.

Aus der Transduktionseffizienz, dem entsprechenden Verdünnungsfaktor und der Ausgangszellzahl konnte der Virustiter (als Mittelwert von drei Ansätzen) errechnet werden.

2.3.1.4. Verpackung des Selektionsvektors

Für die Selektion der Jurkat-Zellen, die nach der retroviralen cDNA Transduktion mit der retroviralen Expressionsbank den LCMV-Rezeptor exprimieren, wurde ein MLV/(LCMV)*neo*-Pseudotyp verwendet. Um einen hohen Titer des Selektionsvektors zu erreichen, wurde der optimale zeitliche Abstand zwischen LCMV-Infektion und Transfektion des MP1*neo* Vektors bestimmt. Zu diesem Zweck wurde ein retroviraler EGFP-Vektor unter analogen Bedingungen verpackt. Die Verwendung des EGFP als Markergen für die Bestimmung des Titers und der Transduktionseffizienz ist im Vergleich zu *neo* weniger arbeitsaufwendig.

2.3.1.4.1. Verpackung des MLV(LCMV) EGFP-Vektors

Material: retroviraler EGFP-Vektor: (M56) pSF α 11GFP(SHX) mit 5'LTR von MPSV, 3'LTR von SF α . (M. Schwieger 1998) (Baum, Hegewisch-Becker et al. 1995). Phoenix GP (*env* freie *gag/pol* exprimierende) Verpackungszelllinie.

Durchführung: Die Herstellung des MLV(LCMV)EGFP-Pseudotyps erfolgte durch die Infektion der Verpackungslinie mit LCMV und die Calciumphosphat-Transfektion des EGFP-Vektors. Hierfür wurden jeweils 12 h vor Durchführung der LCMV-Infektion 2 Ansätze mit 10e6 Te671-Zellen in \varnothing 9cm -Gewebekultur-Schalen ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte die Inkubation mit 2 ml LCMV-Überstand bei einer moi von 0,01 bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde der infektiöse Überstand gegen 10 ml frisches Medium ausgetauscht. Die zwei Ansätze wurden unmittelbar danach bzw. 12 h später mit dem retroviralen Vektor und Calciumphosphat transfiziert. Die Calciumphosphat-Transfektion erfolgte wie oben beschrieben. Die zwei Transfektionsansätze wurden jeweils im Brutschrank bei 37°C und 2 % CO₂ über 10 h inkubiert. Am folgenden Tag wurde von den Zellen nicht aufgenommene DNA durch zweimaliges Waschen mit Calcium-Magnesium freiem PBS-Puffer entfernt und mit frischem Medium kultiviert. Die virushaltigen Überstände wurden 32, 44, 56, 68 und 80 h nach der LCMV-Infektion abgesammelt und 10ml frisches Medium zugefügt.

Um die Zellreste zu entfernen, wurden die Überstände durch einen 0,8 µm Filter filtriert und anschließend bei –80°C eingefroren. Die Bestimmung des Titers erfolgte auf Te 671-Zellen durch Durchflusszytometrie wie oben beschrieben.

2.3.1.4.2. Verpackung des MLV(LCMV)*neo*-Vektors

Material: retroviraler pMP1*neo* Vektor (5'LTR von MESV, 3'LTR von MPSV in pUC19) (Eckert, Stockschlader et al. 1996).

Phoenix GP (*env* freie *gag/pol* exprimierende) Verpackungszelllinie.

Durchführung: Der retrovirale pMP1*neo* Vektor wurde mit analogen Bedingungen wie der *EGFP*-Kontrollvektor verpackt. Eine zeitgleiche LCMV-Infektion und Transfektion der Verpackungslinie (Ausgangszellpopulation von 10e6 Zellen) wurde durchgeführt. Dies erwies sich im früheren Arbeitsabschnitt als optimale zeitliche Bedingung, um einen hohen Virustiter zu erreichen. Nach der Inkubation im Brutschrank für 56 h und täglichem Mediumwechsel (je 10 ml) wurden die virushaltigen Überstände abgesammelt, filtriert, aliquotiert und bei –80°C eingefroren. Der Titer wurde anschließend durch „Geneticin-Transfer-Unit“ (GTU)-Assay gemessen (von Laer, Thomsen et al. 1998).

2.3.1.4.3. Bestimmung des MLV(LCMV)*neo* Pseudotypiters

Material: G 418 (GIBCO, Eggenstein).

Durchführung: Um den Titer des MLV(LCMV)*neo* Pseudotyp-Überstandes zu bestimmen, wurde der „Geneticin-Transfer-Unit“ (GTU)-Assay auf der adhären Ten Te 671-Zelllinie durchgeführt. Hierfür wurden 5 x 10³ Te 671-Zellen/Loch einer 24-Loch-Gewebekulturplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gegen 0,25ml seriell verdünnte Pseudotyp-Überstände ausgetauscht. Dies wurde als dreifach Bestimmung durchgeführt. Die Platten wurden für 2 h bei 2000 rpm zentrifugiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die virushaltigen Überstände gegen 1 ml des Selektionsmediums (0,6 mg/ml G418) pro well ausgetauscht. Bis zum Sichtbarwerden von Zellklonen (ca. 12 Tage) wurde alle 2 bis 3 Tage das Selektionsmedium gewechselt. Aus der Klonzahl und dem entsprechenden Verdünnungsfaktor konnte der Virustiter als „Geneticinresistenz Transfer Unit“ (GTU)/ml Überstand errechnet werden.

2.3.1.4.4. Ultrazentrifugation des MLV(LCMV)*neo* Pseudotyp-Überstandes

Durchführung: Der Titer des MLV(LCMV)*neo*-Pseudotyps war um den Faktor 4 schlechter als der Titer des *EGFP*-Kontrollvektors. Um den Titer des MLV(LCMV)*neo* Pseudotyps zu erhöhen, war eine Ultrazentrifugation erforderlich. Zu diesem Zweck wurden 200 ml Überstände von insgesamt 20 Ansätzen abgesammelt und in 6 Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckmann) überführt. Die Überstände wurden wie beschrieben hergestellt. Anschließend erfolgte das Ausstarieren und die Ultrazentrifugation mittels SW28 Rotors bei 25000 rpm für 3 h (4°C). Die Viruspellets wurden mit 1,7ml RPMI/10%FCS Medium /Röhrchen resuspendiert gemischt (Endvolumen von 10,2ml) und bei -80°C eingefroren. Zweihundert µl des pelletierten Virusüberstandes wurden für die Titration durch den GTU-Assay auf Te 671 wie oben beschrieben verwendet.

2.3.2. Expressionsklonierung

Tag 0: Infektion der Jurkat-Zellen mit der verpackten cDNA-Bank

Für die Infektion von Jurkat-Zellen mit der retroviralen Expressionsbank wurden die oben beschriebenen Infektiosbedingungen verwendet (s.2.3.1.3.2).

Nach der Bestimmung des *EGFP*-Virustiters auf Te 671- und der Infizierbarkeit der Jurkat- im Vergleich zu Te 671-Zelllinie wurde die optimale Menge des retroviralen cDNA Überstandes eingestellt. Bei einer Ausgangs-Zellpopulation von 8×10^5 Jurkat-Zellen wurden 5,5 ml Überstand verwendet. Die Zellen wurden in 20 Kavitäten einer 24-Loch-Platte verteilt (4×10^4 /well) und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium gegen 275 µl infektiösen Überstand der retroviralen Expressionsbank ausgetauscht. Protaminsulfat (4µg/ml) wurde für die Infektion hinzugefügt. Die Platten wurden für 2 h bei 2000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend über Nacht bei 37°C kultiviert. Die virushaltigen Überstände wurden am nächsten Tag nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm gegen 1 ml frisches Medium ausgetauscht. Nach weiteren 24 h Inkubation im Brutschrank erfolgte die Infektion der Jurkat-Zellen mit dem MLV(LCMV)*neo* Selektionsvektor.

Tag 1: Untersuchung der Transduktionseffizienz mittels Einzelzell-PCR

Um die Transduktionseffizienz in den Jurkat-Zellen, die mit der retroviralen c-DNA-Bank transduziert wurden, zu bestimmen, wurde eine Einzelzell-PCR eingesetzt. Dies war notwendig, da der retrovirale pMX-Vektor der cDNA-Bank kein Markergen beinhaltetete (s. 2.4.3.1).

Tag 2: Infektion von Jurkat-Zellen mit MLV(LCMV)*neo* Pseudotyp

Durchführung: Drei $\times 10^6$ cDNA-transduzierte Jurkat-Zellen wurden in 10 ml des pelletierten MLV(LCMV)*neo* Pseudotyps mit einer *moi* von 3 ohne Protaminsulfat transduziert. Die Platte mit den Jurkat-Zellen wurde zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und das Medium gegen 0,5ml der MLV(LCMV)*neo*-Pseudotypsuspension pro Vertiefung ausgetauscht. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 2 h mit 2000 rpm bei Raumtemperatur und eine Inkubation über Nacht im Brutschrank. Am folgenden Tag wurde das virushaltige Medium entfernt und 1 ml frisches Medium/Loch hinzugegeben. Zwölf Stunden später wurden die Jurkat-Zellen erneut pelletiert und in 0,5 ml frischem Medium pro Vertiefung resuspendiert.

Tag 3: Klonierung im Selektionsmedium G418/Methylzellulose/RPMI/20%FCS

Material: MethoCult™ Basismedium H4100 2,6% „high viscosity“ Methylzellulose in IMDM. (CellSystems® Biotechnologie)
G418 Lösung im PBS (100mg/ml) (GIBCO, Eggenstein).

Durchführung: Um definierte Zellklone der Jurkat-Zellen erhalten zu können, mussten diese in 0,9% Methylzellulose kloniert werden. Ca. 30 h nach der Infektion mit dem MLV(LCMV)*neo*-Pseudotyp wurden die Jurkat-Zellen in halbfestem Selektionsmedium kultiviert. Die Vorbereitung von 100 ml einer 1%igen Methylzellulose/RPMI/20%FCS Suspension erfolgte durch Mischen von 40 ml der 2,6%igen IMDM/Methylzellulose-Lösung, 1 ml Glutamin 200mM, 1 ml Pyruvat, 20 ml FCS, 37 ml RPMI, 1,1ml G418 und 0,9 ml NaHCO₃ wie oben beschrieben (s. 2.3.1.1.a).

Insgesamt 21 sterile Gefäße (7ml) wurden mit 5 ml der 1%igen Methyllzellulose-Lösung jeweils aufgefüllt und mit den Jurkat-Zellen gemischt. Hierfür wurde 0,5 ml Zellsuspension von jedem Loch der Jurkat-Zell-Platte pro 5 ml Selektionsmedium hinzugegeben (1/10 v/v). Als Negativkontrolle wurden $1,5 \times 10^5$ nicht transduzierte Jurkat-Zellen in 0,5 ml Medium aufgenommen und mit 5 ml Selektionsmedium gemischt. Die G418-Endkonzentration des Selektions-Mediums betrug 1mg/ml. Nach 10-tägiger Kultivierung in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C waren die Zellklone sichtbar. Bei der Negativkontrolle waren nur apoptotische Zellen zu beobachten. Am Tag 17 wurden durch sterile Einwegspritzen die einzelnen Kolonien in 100 µl G418-haltigem Medium/well in 96w/Platten überführt und bis zur Konfluenz in einer feuchten Kammer bei 37°C weiter kultiviert. Die Anzucht der Klone wurde in 6-Loch-Platten fortgesetzt. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 2×10^5 /ml unter Selektionsdruck gehalten und jeden 3. Tag in frisches Medium umgesetzt. Am Tag 30 wurde die Testung der Klone für die Expression des LCMV-Rezeptors mittels MLV(LCMV)lacZ-Transduktion durchgeführt. Am Tag 40 wurde die genomische DNA isoliert. Die Klone wurden anschließend wie oben beschrieben eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.3 Testung der Klone mittels MLV(LCMV)lacZ-Pseudotyp-Transduktion

Durchführung: Die Expression des LCMV-Rezeptors in transduzierten Jurkat-Zellen wurde mit dem MLV(LCMV)lacZ-Pseudotyp getestet. Hierfür ist jeweils ein Aliquot (10^5 Zellen) der 90 isolierten Klone in eine Kavität von insgesamt vier 24-Lochplatten ausgesät. Sämtliche Klone wurden jeweils mit 200 µl Pseudotypüberstand infiziert und nach zwei Tagen mit „X-gal stain solution“ angefärbt. Am folgenden Tag wurde die Zahl der LacZ-exprimierten Zellen gezählt. Als Positivkontrolle wurden Te 671-Zellen mit identischen Bedingungen transduziert und angefärbt. Als Negativkontrolle wurden native Jurkat-Zellen verwendet. Die Infektion mit dem Pseudotyp und die LacZ-Färbung erfolgte wie oben beschrieben .

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Isolierung der genomischen DNA

Material: Lysepuffer A: 100mM KCL, 10mM Tris, HCL ph 8,3, 2,5mM MgCl₂.
Lysepuffer B: 10mM Tris, HCL ph 8,3, 2,5mM MgCl₂, 1% Tween 20
(Polyoxyethylensorbitan von Sigma), 1% Nonodet P 40 (Fluka).
Proteinase K: Lyophilisat 10 mg/ml (Boehringer).

Durchführung: Zur Präparation der genomischen DNA aus Jurkat wurden pro Klon 2×10^6 pelletierte Zellen eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde die DNA aus nativen Jurkat-Zellen isoliert. Die Zellen wurden mit 125 μ l Lysepuffer A in Eppendorfgefäße resuspendiert und anschließend mit 125 μ l Lysepuffer B gemischt. Zunächst wurden 13,2 μ l Proteinase K zugegeben und die Eppendorfgefäße über Nacht bei 56°C inkubiert. Um die Proteinase K zu inaktivieren, wurden die Lysate für 10 min bei 94°C erhitzt. Fünf μ l von jeder Probe wurden direkt in die PCR eingesetzt und die Reste bei -20°C eingefroren.

2.4.2. Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) wird verwendet, um von bestimmten Nukleotidsequenzen in vitro millionenfach Kopien enzymatisch herzustellen. (Higuchi, Krummel et al. 1988; Mullis and Faloona 1987). Als Matrize dient doppelsträngige DNA. Als Startmoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an die Matrizen-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird. Ein Syntheszyklus besteht aus drei Abschnitten. Im ersten Schritt wird die DNA bei 94°C denaturiert. Darauf folgt die Anlagerungsreaktion der Primer bei einer Temperatur zwischen 48°C und 60°C. Ausgehend von diesen Primern findet die Polymerisation bei 72°C statt. Da sich nach jedem Syntheszyklus die Anzahl der Matrizen verdoppelt, müssen die Oligonukleotide in großem Überschuss im Reaktionsansatz vorhanden sein. Nur wenn genug Oligonukleotide vorhanden sind, die mit den neu synthetisierten DNA-Fragmenten hybridisieren, kann weitere DNA-Synthese stattfinden.

Material: PCR Kit (Qiagen): 10 x Puffer, dNTPs 10 mM, Taq-Polymerase (5U/ μ l).
Primer 5'(CS 248): GGTGGACCATCCTCTAGACT 10pm/ μ l.
Primer 3'(CS 249): CCCTTTTCTGGAGACTAAAT 10pm/ μ l.
Personal Cycler (Biometra).

Durchführung: Zur Durchführung der PCR wurde das kommerziell erhältliche „Taq DNA-Polymerase Kit“ (Qiagen) verwendet. Die PCR-Ansätze wurden entsprechend dem Qiagen-Protokoll bei 4°C zusammenpipettiert und die PCR danach im „Personal Cycler“ (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Als Matrizen wurden jeweils 5 µl der aus den Klonen isolierten DNA eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde die DNA von nativen Jurkat-Zellen verwendet. Als Positivkontrolle wurde das EGFP-Gen von einem pMX-Kontrollvektor amplifiziert. Bei der Amplifikationsreaktion wurden die Proben zunächst 3 min bei 94°C denaturiert und dann in einem 3-Schritt-Zyklus, bestehend aus 1 min Denaturierung bei 94°C, 2 min Hybridisierung bei 58°C und einer Elongationszeit von 2 min bei 72°C mit insgesamt 35 Zyklen amplifiziert. Am Ende der Amplifikation wurde eine verlängerte Elongationszeit von 7 min angehängt. Die Proben wurden anschließend gelelektrophoretisch analysiert (s. 2.4.4.).

2.4.3. Nested PCR

Die nested PCR dient der Amplifikation geringer DNA Mengen. Zu diesem Zweck werden zwei PCR-Runden mit verschiedenen Primer-Paaren gefahren. Das erste Primer-Paar liegt außerhalb des zu amplifizierenden Bereichs. Während dieser PCR wird die Menge an entscheidender DNA erhöht. Eine geringe Menge Amplifikat aus der ersten PCR wird in der zweiten PCR eingesetzt. Das Amplifikat aus der ersten PCR-Runde dient dann in der zweiten Runde als Matrize (verschachtelte PCR).

2.4.3.1. Einzelzell- PCR

Voraussetzung für eine erfolgreiche Einzelzell-PCR ist eine „automated cell deposition unit“ (ACDU) an einem Zellsortierer (FACS), um definierte Zellzahlen in „wells“ einer Mikrotiterplatte sortieren zu können. Anschließend wurde durch „nested“-PCR ein nicht-kodierender Abschnitt des retroviralen Vektors amplifiziert. Dies ermöglicht die Identifizierung aller transduzierten Zellen, unabhängig von der Größe der cDNA-Insertion. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Bestimmung des Anteils positiver (transduzierter) Ansätze. Der Berechnung der Infektionsrate wurde die Poissonverteilung zu Grunde gelegt (Bertram, Hufert et al. 1995) (s. 3.2.2.2).

Material: Zellsortierer: MoFlo, Cytomation
Spezialeinsatz für den Thermacycler GeneAmp 9600.
MicroAmp Reaction Tubes Perkin Elmer.
MicroAmp Tray/ Retainer Set, MicroAmp Base.
Lysis-Puffer A, B und Proteinase K wie beschrieben (s. 2.4.1.).

Durchführung: Die MicroAmp-Reactiontubes wurden in den Spezialeinsatz (MikroAmp Retainer Set-Platten) gesteckt und mit den MicroAmp Base-Platten befestigt. Zur Vorbereitung auf die Zellsortierung wurde in jedes der PCR-Hütchen 11,5µl Lysis-Puffer A vorgelegt. Die zu sortierenden Zellen wurden mittels Durchflusszytometer aufgenommen und mit Hilfe der ACUDU in jedes PCR-Hütchen sortiert. Die zu sortierende Zellzahl wurde mit Hilfe eines Protokollprogramms für jedes Hütchen einzeln genau definiert (3, 10, 30, 100 Zellen). Jeweils 11,5µl Lysispuffer B und Proteinase K wurden anschließend pro Ansatz zugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation im Heizblock bei 60⁰C wurde die Proteinase K inaktiviert und 25 µl 2x PCR-Mix mit Taq-Polymerase pro Probe zupipettiert. Die Platte mit den PCR-Ansätzen wurde in Thermacycler gestellt und die 1. PCR-Runde durchgeführt. (LTR Primer: TAACGCCATTTTGCAAGGCATGG, AAGTCAATCAGTCAGAGGAGACC). Ein µl der PCR Produkte wurde in 96 well Platten überführt und in eine 2. PCR-Runde eingesetzt. (Primer CCCAGATRTGGCCCAACCCTCAGC, AGGACTGGCGCSCCGAGTGARGGG) Die PCR-Bedingungen waren für die 1. Versuchsreihe : Denaturierung 95⁰C 1 min, Annealing 62 ⁰C 1,5 min, Elongation 72⁰C 1,5 min, für die zweite Versuchsreihe: Denaturierung 95⁰C 1 min, Annealing 60 ⁰C 60 2 min, Elongation 72⁰C 2 min. Wegen der kleinen Größe des Amplifikates (193 bp) wurden die Produkte der „nested“ PCR in einem 2%igen Agarosegel analysiert.

2.4.4. Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten bzw. von Plasmid-DNA mit einer Länge von mehr als 0,5 kb werden native Agarosegele eingesetzt. Die Agarosekonzentration richtet sich nach den zu erwartenden Fragmentgrößen, d.h. je höherprozentig das Gel, desto kleinere Fragmente können aufgetrennt werden. DNA-Fragmente sind aufgrund ihres Phosphatrückgrades negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller wandern als große.

Material: 50x TAE-Elektrophoresepuffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, 2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA pH 8,3). Vor Gebrauch 1:50 (v/v) mit H₂O auf 1xTAE verdünnt.
1% bis 2%ige TAE-Agarose-Lösung.
Probenauftragspuffer: 50% (v/v) Glycerin, 0,2% (w/v) SDS, 0,05% (w/v).
Bromphenolblau, 0,05%(w/v) Xylencyanol in 1xTAE-Puffer.
Ethidiumbromid (50µg/ml).
Flachbett-Gelelektrophoreseapparatur, Stromgeber, Taschenschablone.

Durchführung: Eine 100 ml TAE-Lösung mit 1 % Agarose wurde unter ständigem Rühren in der Mikrowelle aufgeköcht. Sobald die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde 1 µl Ethidiumbromid zugefügt und die Lösung in eine Flachbett-Gelapparatur mit geeigneter Taschenschablone gegossen. Die erhaltenen Gele mit Probenaschen wurden mit TAE-Puffer beschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/3 ihres Volumens an Auftragspuffer versetzt und mit einer Mikroliterpipette in die Probenasche eingebracht. Als Größenstandard wurde EcoRI/HindIII-verdaute λ-DNA verwendet (Größen: 21,5 kb; 5,2 kb; 5,1 kb; 4,3 kb; 3,6 kb; 2,0 kb; 1,9 kb; 1,6 kb; 0,95 kb; 0,83 kb; 0,56 kb; 0,13 kb). Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 100 mA konnte die DNA unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht werden. Dabei wurde die orangefarbene Fluoreszenz eines DNA/Ethidiumbromid-Komplexes beobachtet.

2.4.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines Gel-Extraktions-Kits (Quiagen). Das betreffende DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel getrennt und mit 3 Gelvolumen QG-Puffer versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 50°C für 10 min, währenddessen der Ansatz alle 2-3 min gevortext wurde. Anschließend wurde die Probe mit einem Gelvolumen Isopropanol versetzt und durchmischt. Nachfolgend wurde der Ansatz in eine QIAquick-Säule überführt, die vorher auf ein 2 ml Sammelgefäß aufgesetzt worden war. Nach Zentrifugation für 1 min in einer Eppendorffzentrifuge wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 0,5 ml QG-Puffer versetzt und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 0,75 ml PE-Puffer versetzt und für 1 min zentrifugiert.

Anschließend wurde die Säule noch einmal für 1 min zentrifugiert und dann auf ein leeres Eppendorfgefäß überführt. Zum Eluieren der DNA wurde die Säule mit 50 µl TE bzw. H₂O beladen und für 1 min zentrifugiert.

2.4.6 Klonierung des Amplifikates im Plasmid Bluescript (pBS)

Nach der Isolierung eines ca 1,4 kb großen Amplifikates stellte sich die Aufgabe, seine vollständige Sequenz zu ermitteln. Für diesen Zweck wurde eine Klonierung in EcoRV verdaulichem pBluescript SK (pBS) durchgeführt. Diese Restriktionsendonuklease führt zur Produktion von glatten Enden.

2.4.6.1. DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren spezifische, meist palindromische DNA-Sequenzen. An den Schnittstellen entstehen 3'Hydroxyl- und 5'Phosphatgruppen. Die Enzymaktivität ist so definiert, dass bei 37°C 1 U die Restriktionsendonuklease 1 µg cDNA in 1 h vollständig schneidet. Zum Reaktionsansatz wurde der für die Restriktionsendonuklease spezifische 10 x Puffer gegeben, in dem die Enzymaktivität maximal ist. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C war der Verdau abgeschlossen.

2.4.6.2. Dephosphorylierung des Vektors pBS

Beim Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen entstehen 5'Phosphatenden, die durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestine alkaline phosphatase“, CIP) hydrolysiert werden können. Dadurch kann eine höhere Klonierungseffizienz erreicht werden. Die von der T4-DNA-Ligase katalysierte Ligation, das Knüpfen einer Phosphodiester-Bindung zwischen dem 5'Phosphat- und dem 3'Hydroxyl-Ende, kann beim Verwenden eines dephosphorylierten Vektors nur noch zwischen dem Vektor und der angebotenen Fremd-DNA stattfinden, eine Religation des Vektors ist nicht mehr möglich.

Durchführung: Die Dephosphorylierung wurde nach vollständigem Verdau durch Versetzen des gesamten Restriktionsansatzes mit 0,1 Volumen 10 x Dephosphorylierungspuffer, 0,1 U CIP und 30 min Inkubation bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde das ganze Volumen auf einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Bande wie beschrieben präpariert (s. 2.4.5.).

2.4.6.3. Phosphorylierung der PCR-Produkte

Die Ligation zweier DNA-Moleküle erfolgt zwischen 5'-Phosphat- und 3'-OH-Ende. Bei einem dephosphorylierten Vektor ist die Phosphorylierung der zu klonierenden DNA erforderlich. Hierfür wird in einer durch das Enzym T-Polynucleotidkinase katalysierte Reaktion die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe der DNA übertragen. Das Enzym wurde aus Phagen-T4-infizierten *E. coli*-Zellen isoliert.

Durchführung: Die nach der PCR-isolierte DNA (15 μ l) wurde mit 2 μ l 10x Polynucleotidkinase PNK-Puffer MBI, 2 μ l ATP 10 mM und 2 μ l T4PNK-Enzym MBI, versetzt, für 45 min bei 37°C inkubiert und für 20 min bei 65°C inaktiviert.

2.4.6.4. Ligation

Der nach der Dephosphorylierung präparierte Vektor (1 μ l) wurde mit 10 μ l phosphorylierten DNA-Fragmenten, 5x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (BioLabs) ad 20 μ l dH₂O versetzt und 16 h bei 14°C inkubiert.

2.4.6.5. Transformation kompetenter *E. coli*-Stämme

Mit Hilfe der Transformation wird Vektor-DNA in prokaryontische Zellen eingeführt. Die Bakterien müssen in bestimmter Weise behandelt werden, um sie aufnahmefähig (kompetent) für Fremd-DNA zu machen. Bei der hier verwendeten CaCl₂-Methode (Mandel and Higa 1970) wird die Kompetenz der Bakterien durch Behandlung mit Magnesium- und Calciumsalzen erreicht. Es wird angenommen, dass die divalenten Kationen die Aufnahme der negativ geladenen DNA durch die ebenfalls negativ geladene Lipopolysaccharid-Oberfläche der Bakterien erleichtern, indem sie die Abstoßungskräfte zwischen beiden vermindern. Die CaCl₂-kompetenten *E. coli* Stämme CMK 603 (Variante von C 600), HB 101 und Top 10 wurden zur Verfügung gestellt.

Durchführung: Es wurden 50 µl kompetenter E. coli-Zellen mit 5 -10 µl eines Ligationsansatzes versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit lagerte sich die DNA an der Oberfläche der Bakterien an. Dann erfolgte für 5 min eine Hitzeschockbehandlung bei 37°C, während der die angebotene DNA von den Zellen aufgenommen wurde. Zu dem Transformationsansatz gab man 400 µl LB-Medium und ließ 1 h bei 37°C inkubieren. In dieser Zeit konnte sich die von der Fremd-DNA kodierte Antibiotikaresistenz ausbilden. Jetzt konnte auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert werden. Hier konnten nur Bakterien wachsen, die Fremd-DNA aufgenommen hatten. Die Kolonien wurden nach Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37°C im Brutschrank sichtbar und konnten analysiert werden.

2.4.6.6. DNA-Mini-Präparation

Die DNA-Mini-Präparation dient dazu, von positiv rekombinanten Bakterienkolonien möglichst schnell genügend Plasmid-DNA zu gewinnen, um in einem Restriktionsverdau die Richtigkeit der klonierten Plasmide überprüfen zu können. Bei dieser Methode liegt die Ausbeute an Plasmid-DNA in der Größenordnung von 20 µg.

Material: Qiagen Plasmid Purifikation Kit (Midi Kit).

P1 Puffer (Resuspensionspuffer): 50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA;
100 µg/ ml Rnase A.

P2 Puffer (Lysispuffer): 200 mM NaOH, 1% SDS.

P3 Puffer (Neutralisationspuffer) 3 M Kaliumazetat pH 5,5.

Durchführung: Für die Mini-Präparation wurden 2 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (100 µg/ml) mit jeweils einer Bakterienkolonie von LB-Ampicillin-Platten mit Hilfe eines autoklavierten Holzzahnstochers angeimpft. Die angeimpften Kulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag zur Plasmid-DNA Gewinnung eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl eines eiskalten Glukose-Puffers (P1) aufgenommen und gut resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 200 µl einer frischen NaOH (0,2M)/SDS (1 %) Lösung (P2) zugegeben und vorsichtig vermischt. Es wurde 5 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden 150 µl einer eiskalten Kaliumacetat-Lösung (P3) zugegeben, wiederum 5 min auf Eis inkubiert und abschließend 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform versetzt, gemischt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA befand sich in der oberen wässrigen Phase. Diese wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit dem doppelten Volumen an absolutem Ethanol versetzt und 2 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde durch 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde vakuumgetrocknet und in 20 µl TE- Puffer, der DNase freie RNase (20 µg/ml) enthielt, aufgenommen. Hiervon wurden 2 µl für den anschließenden Testverdau eingesetzt.

2.4.6.7. Testverdau

Die Prüfung der ampicillinresistenten Klone erfolgte mittels EcoRI und HindIII Restriktionsansätze. Für diese Restriktionsendonukleasen sind einzelne Schnittstellen im pBS verfügbar. Von einem Klon mit einer einzelnen ca. 1,4 kb großen Insertion wurde eine DNA-Maxi-Präparation durchgeführt.

2.4.6.8. DNA-Maxi-Präparation

Zur schnellen Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurde die DNA-Isolierung und Aufreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Hierzu wurden kommerziell erhältliche Säulen (QIAGEN-tip 500) der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Qiagen-Säulen sind Anionen-Austauscher auf Silicagelbasis. Die Elution der an die hochgeladene Oberfläche des modifizierten Silicagels gebundenen, doppelsträngigen Plasmid-DNA erfolgt bei hoher Salzkonzentration (1,25 M), während Proteine schon bei niedriger Salzkonzentration (1,0 M) eluiert werden.

Material: Qiagen Plasmid Purifikation Kit (Maxi Kit) (s. 2.4.6.6.).
P1 Resuspensionspuffer, P2 Lysispuffer, P3 Neutralisationspuffer .
QBT-Puffer: 750mM NaCl; 50mM MOPS, pH 7.0; 15% Isopropanol; 0,15% Triton® X-100.
QC-Puffer: 1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Isopropanol.
QF-Puffer: 1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, ph 8.5; 15% Isopropanol.

Durchführung: Für die Maxi-Präparation wurden 250 ml ampicillinhaltiges LB Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 5 ml einer 6 h Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Bakterienpellet wurde durch 10 min Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C gewonnen. Das Pellet wurde in 10 ml P1 Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 10 ml P2 Puffer zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml P3 Puffer zugegeben, vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 30 min Zentrifugation bei 12000 g und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen, erneut bei 12000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert und auf eine mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte QIAGEN-Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und anschließend das Plasmid mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und 30 min bei 10000 g und 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

2.4.6 9. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger durchgeführt (Sanger, Nicklen et al. 1977). Bei dieser Methode ist von Nutzen, dass die DNA-Polymerase zur Synthese eines DNA Stranges eine 3' Hydroxylgruppe benötigt. Ist diese OH-Gruppe nicht vorhanden, bricht die Polymerisation der DNA ab. Die DNA-Synthese beginnt an einem Primer, der sich an die denaturierte DNA angelagert hat. Durch die DNA-Polymerase wird die Synthese des neuen DNA-Stranges bei der dNTPs eingebaut werden, katalysiert. Durch den zufälligen Einbau von ddNTPs wird die Elongation statistisch nach jeder Base abgebrochen. Da jedes der vier Didesoxynukleotide mit einem anderen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, kann nach der elektrophoretischen Auftrennung der Sequenzierreaktion und der Detektion der Fluoreszenz die Sequenz ermittelt werden.

Material: „Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit“ ABI PRISM™ Dye Terminator (Perkin Elmer) beinhaltet „Terminator Ready Reactions Mix“ (DT)-Mix; AmpliTaq® DNA-Polymerase.

Durchführung: Mit der zu sequenzierenden DNA wurde in Anwesenheit pBS-spezifischer Primer (T3): AATTAACCCTCACTAAAGGG, (T7): CGGGATATCACTCAGCATAATG), mit den im Reaktionsmix enthaltenen dNTPs, markierten ddNTPs und der Ampli-Taq DNA-Polymerase eine PCR durchgeführt, die als „cycle sequencing“ bezeichnet wird. Da nur ein Primer vorhanden war, konnte nur die eingesetzte DNA als Matrize dienen, nicht die neu synthetisierte DNA, so dass die Fehlerrate nicht anstieg. Durch die sich wiederholenden Denaturierungs-, Anlagerungs- und Elongationsschritte konnten aber aus einem Molekül DNA-Matrize mehrere spezifisch terminierte Fragmente entstehen. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem beschriebenen Sequenzierungs-Kit im Personal Cycler von Biometra durchgeführt. Für den Sequenzierungs-Ansatz wurden 500 ng DNA-Matrize, 5 pmol Primer, 8 µl DT-Reaktionsmix ad 20 µl dH₂O zusammenpipettiert. Die Reaktionsbedingungen waren 96°C für 30 sec, 50°C für 15 sec und 60°C für 4 min. Es wurden insgesamt 25 Zyklen durchgeführt. Nach der Sequenzierreaktion wurde die DNA aufgereinigt, indem jeder Reaktionsansatz in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 50 µl absolutem Ethanol und 2 µl Natriumacetat-Lösung (3M, pH 5,5) vermischt wurde. Das Gemisch wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Gelelektrophoresen wurden im Servicelabor am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Hamburg, auf einem „373A DNA Sequencer“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenzierung zeigte ein 1350 bp großes Amplifikat mit einem offenen Leserahmen von 313 Aminosäuren. Nach dem Vergleich des Amplifikates mit Nukleotidsequenzen der Gendatenbank ergab sich eine Homologie von 95% auf Aminosäurebasis zu dem -COOH Terminus eines humanen „Guanine Exchange Proteins“ (GEP).

2.4.7. Klonierung des GEP-Fragmentes in einen retroviralen Expressionsvektor

Für die Produktion eines rekombinanten Proteins stehen zahlreiche Expressionssysteme zur Verfügung. Die Bestimmung der jeweils besten Kombination aus Wirtszelle und Expressionsvektor richtet sich nach verschiedenen Faktoren. Bei der Auswahl des Expressionvektors ist ein starker Promotor, der die Herstellung großer Mengen mRNA des interessierten Gens steuert, ein entscheidender Gesichtspunkt. Für die Expression eines DNA-Fragments in Säugerzellen und die Produktion eines funktionellen Proteins sind Voraussetzungen wie posttranslatorische Modifikationen, Proteinprozessierung sowie intakte Sekretionsmechanismen erforderlich.

Um eine stabile Expression der transfizierten DNA zu erreichen, ist die Integration in das Wirtsgenom notwendig. Hierzu stellt die Transfektion mit rekombinanten Retroviren ein sehr effizientes System dar. Ein weit verbreitetes Selektionssystem ist die Neomycin/Geneticinresistenz, die durch die von *neo*-Resistenzgen kodierte Aminoglykosid-Phosphotransferase vermittelt wird (Colbere-Garapin, Horodniceanu et al. 1981). Im Anschluss an die Transfektion können transformierte Zellen nach einer Selektion von 2-3 Wochen isoliert werden.

Material: pM5*neo* retroviraler Expressionsvektor (R74) mit klassischen SD Spleißdonor und SA Spleißakzeptor Stellen in pBR322 (Breuer, et al. 1993).

Durchführung: Das in pBS klonierte GEP-Fragment wurde mit HincII (glatte Enden) und EcoRI verdaut und durch eine präparative Gelelektrophorese isoliert. Das Plasmid pM5*neo* wurde mit BamHI geschnitten, durch Klenow-Reaktion (s. 2.4.7.1) aufgefüllt und anschließend mit EcoRI verdaut. Durch eine präparative Gelelektrophorese erfolgte die Isolierung des geschnittenen Plasmides. Somit sind sowohl bei dem Vektor als auch bei dem GEP-Fragment glatte und EcoRI Enden entstanden. Nach der Dephosphorylierung wurde der restriktierte PM5*neo* mit dem GEP-Fragment wie beschrieben ligiert (s. 2.4.6.4.). Alle Klone wurden durch BamHI/EcoRI-Testverdau auf ihre Orientierung hinüberprüft. Das klonierte Gen verfügte über eine am Amino-Terminus naheliegende BamhI-Restriktionsstelle, wodurch war die Prüfung der Richtigkeit der Orientierung möglich.

2.4.7.1. Glätten überstehender DNA-Enden

Überstehende, einzelsträngige DNA-Enden können mit Hilfe der Klenow-Polymerase geglättet werden. In Abwesenheit von Nukleotiden besitzt das Enzym eine 3'-5' Exonuklease Aktivität, so dass 3'überstehende Enden abgebaut werden können. Sind Nukleotide vorhanden, so überwiegt die 5'-3' Polymerase Aktivität, mit deren Hilfe 5'überstehende Enden aufgefüllt werden.

Durchführung: Um die 5'überstehenden Enden aufzufüllen, wurden die Plasmid-DNA 30 min mit 0,1 Volumen 10x Klenow-Puffer, 1 U Klenow-Polymerase (GIBCO, Eggenstein) und 1µl dNTPs (2mM Quiagen) inkubiert. Anschließend wurde das ganze Volumen auf einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Bande wie beschrieben (s. 2.4.5.) präpariert.

2.4.7.2. Infektion von Jurkat-Zellen mit pM5neo-GEP

Durchführung: Für die Expression des GEP-Fragments in Jurkat-Zellen wurde der retrovirale pM5neo-GEP-Vektor in einem Amphi/VSV-Retrovirus wie beschrieben verpackt (s. 2.3.1.2.). Nachdem die Jurkat-Zellen mit diesem Vektor transduziert wurden (s. 2.3.1.3.2.), erfolgte die G418-Selektion einer Massenkultur für zwei Wochen. Durch MLV/(LCMV)lacZ-Transduktion wurden die Jurkat-Zellen auf LCMV-Rezeptor-Expression getestet. Die Integration des GEP-Vektors in der genomischen DNA wurde mittels PCR nachgewiesen. Für die Amplifikation wurden die beschriebenen (s. 2.4.2.) Primer und die Standard PCR-Bedingungen verwendet. Anschließend erfolgte eine analytische Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel. Die mRNA Expression des transduzierten GEP-Fragments in Jurkat-Zellen wurde mittels RT-PCR (s. 2.5.3) bestätigt. Für diesen Zweck wurden GEP-spezifische (KT5) 5'GATGCAGAGATCCACATCGGA und (KT6) 3'GATGTTCTACAGAACCACAG Primer eingesetzt und ein 631 bp großer GEP-mRNA-Abschnitt amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde die mRNA von nicht transduzierten Jurkat-Zellen verwendet.

2.5. Analyse der α -Dystroglykan-Expression

2.5.1. Testung mittels FACS-Analyse.

Material: Maus monoklonaler anti α -DG Antikörper (VIA4-1), Immunogen: Kaninchen-Muskelmembranpräparation (upstate biotechnology, Lake Placid NY).
Maus IgG Antikörper Isotypkontrolle (Pharmigen.).
FITC gekoppelter Ziege anti-Maus Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark).
FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg).

Durchführung: Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 5×10^5 Zellen pelletiert und in 50 μ l einer 1:40-Verdünnung von monoklonalem VIA4-1 anti- α -DG-Mausantikörper bzw. Isotypkontrolle-Antikörper (1 μ g Antikörper pro Ansatz in PBS gelöst) resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min) und dann für weitere 20 min in 50 μ l einer 1:80-Verdünnung von FITC-gekoppeltem Ziege anti-Maus Antikörper (Endkonzentration 1 μ g pro Ansatz in PBS gelöst) auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.5.2. Nachweis des α -Dystroglykan-Proteins mittels Western-Blot

2.5.2.1. Zellextrakte

Material: Lysispuffer (50 mM HEPES pH 7,6, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 10% (v/v) Glycerin und 1,0% (v/v) 1% Triton[®]X-100).
Proteaseinhibitoren: PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride) 1mM, Pepstatin A (Biomol) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Aprotinin 200 U/ml und E-64 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Durchführung: Die Herstellung von Gesamtzell-Proteinlysaten wurde nach dem Protokoll von „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1987) durchgeführt. Zuerst wurden die Proteaseinhibitoren mit der beschriebenen Endkonzentration im Lysispuffer versetzt. Zur Herstellung der Lysate wurden 10^7 Zellen einer gut wachsenden Suspensionskultur durch Zentrifugation geerntet (1000 rpm, 5 min, Beckmann-Zentrifuge). Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Zellpellet in 1 ml kaltem PBS resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt und erneut pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 1 ml Lysispuffer-Proteaseinhibitoren-Lösung durch Pipettieren auf Eis lysiert. Adhärente Zelllinien wurden in einer 9 cm Kulturschale am Vorversuchstag ausgesät. Vor der Durchführung des Experiments wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit 1ml Lysispuffer-Proteaseinhibitoren-Lösung für 30 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysat wurde mit Gummispatel vom Boden der Schale abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurden die Lysate der Suspensions- bzw. adhären Zellen zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 10 min, Eppendorf-Tischzentrifuge), der Überstand abgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Verwendung wurden die Zelllysate bei -70°C gelagert.

2.5.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde die Methode nach Bradford angewendet, die auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine beruht (Bradford 1976).

Material: Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Biorad).

Durchführung: Zur Durchführung der Konzentrationsbestimmung wurde das „Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ nach den Angaben des Herstellers benutzt. Die Proteinlysate wurden in einer Verdünnung von 1:20 bis 1:100 eingesetzt. Als Standard diente das Rinderserumalbumin BSA (Boehringer) in einer Konzentrationsreihe von 10 µg/ml - 100 µg/ml. Den BSA-Standardwerten wurde der jeweilige Proteinlysispuffer, in entsprechender Verdünnung der Proben, zugesetzt. Es wurde ein Volumen von je 100 µl vorgelegt und je 1 ml einer 1:5 Verdünnung des Farbstoffkonzentrates in Wasser zugesetzt. Von den Proteinproben wurden jeweils Doppel- oder Dreifachbestimmungen, von der Standardreihe jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Referenz wurde gegen Wasser gemessen (H₂O statt BSA). Mittels des mathematischen Verfahrens der linearen Regression der Standardmesswerte wurden die Konzentrationen der Proteinproben dann rechnerisch ermittelt.

2.5.2.3. Western-Blot-Analysen (Burnette 1981)

Beim Protein-Blotting werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung gelektrophoretisch getrennt, auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für bestimmte Proteine der getrennten Mischung spezifisch ist oder sein soll. Je nach Aufbau des Experiments erhält man dabei entweder eine Information über die tatsächliche Spezifität der Nachweißreaktion oder eine Aussage über die elektrophoretischen Eigenschaften eines Proteins, das auf einen bestimmten spezifischen Nachweis reagiert.

2.5.2.3.1. Vorbereitung der Proben-SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet sich an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Ladung der Aminosäurereste des Polypeptides braucht aufgrund der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle nicht berücksichtigt zu werden. Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit der von bekannten Proteinen.

Material: Laemmli-Proben-Puffer: Tris/HCl pH 6,8, 62,5 mM, Glycerin 25 %, SDS 2 %, Bromphenol Blau 0,01 % kurz vor Gebrauch 1 µl beta-Mercaptoethanol pro 49 µl Proben Puffer zugeben.
10 x Laufpufferkonzentrat: Tris 250 mM, Glycin 1,92 M, SDS 1 %.
Marker: „Prestained SDS Molecular Weight Markers“
(27- 180 kDa; Sigma Saint Louis, Missouri USA).

Durchführung: Die Proteine wurden mit dH₂O so weit verdünnt, dass eine Konzentration von 10 µg/10 µl vorlag. Zu der verdünnten Probe (je 50 µl) wurden 100 µl Laemmli-Proben-Puffer, der mit 2% beta-Mercaptoethanol versetzt wurde, pipettiert. Die Proteinproben wurden anschließend in einem 100°C-Wasserbad inkubiert und dabei denaturiert; danach wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (2 min, 10.000 rpm). Der Molekulargewichtsmarker (Prestained broad range Marker, BIO-RAD) wurde 1 min auf 40°C erwärmt. Die Gelelektrophoresen wurden in Protean II Gelkammern der Firma Biorad durchgeführt. Die in diesen Gelkammern gegossenen Gele hatten eine Größe von 8 x 5 cm² (Minigele). In eine durch einen Gummifuß abgedichtete Kammer wurde die Mischung für zwei Trenngele (10 %) gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde die Oberfläche des Gels mit Wasser gespült, die Sammelgel-Mischung hineingegeben und zum Ausbilden der Probenfächer ein Kamm hineingesteckt. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebaut und mit 1 x Laufpuffer (30 ml Tris/Glycin/SDS-10x Laufpufferkonzentrat 1:10 mit H₂O bidest verdünnt) überschichtet. Die Probenfächer wurden nach dem Ziehen des Kamms mit Laufpuffer gespült, um nicht polymerisiertes Material zu entfernen. Die Proben wurden mittels Hamilton-Spritze aufgetragen; sie durchliefen das Sammelgel mit 60 mA und das Trenngel mit 90 mA. Die Molmassenbestimmung erfolgte parallel durch Auftragen eines Molmassenstandards in eine der Taschen.

2.5.2.3.2. Coomassie-Färbung

Material: Coomassie-Blue-Färbelösung: PhastGel Blue R (Pharmacia) enthält Coomassie R 350 stain (1 Tablette), Methanol abs.40 %, Eisessig 10 %, H₂O bidest 50 % (vor Gebrauch wurde die Färbelösung zur Abtrennung unlöslicher Farbstoffanteile filtriert).
Entfärbelösung: Methanol abs.40 %, Eisessig 10 %, Entfärbebeutel (MoBiTec).

Durchführung: Die Gele wurden durch 20-minütiges Schwenken in Coomassiefärbelösung bei 60°C gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte durch Schwenken der Gele in Entfärbelösung. Diese wurde so oft gewechselt, bis der Hintergrund der Gele farblos war. Das Gel wurde dann in Aqua bidest überführt und dort über mehrere Wochen gelagert.

2.5.2.3.3. Blotting

Unmittelbar nach Abschluss der Gelektrophorese erfolgte der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran.

Materialien: Nitrozellulosemembran (Amersham, Braunschweig).

Saugfähiger, dicker Cellulosefilterkarton (Whatman 3MM).

Strom- und Spannungsgeber.

Glasstab, 2 kleine Inkubationsschalen aus Polypropylen, 2 große Schalen für das Benetzen und Tränken der Membran und der Filterkartons.

Transferpuffer : 3,03 g Tris-Base (25 mM Tris), 14,4 g Glycin (192 mM Glycin), 200 ml Methanol (20% (v/v) Methanol) ad 1 L mit H₂O bidest.

Durchführung: Die Membran und die Filterkartons wurden auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten und anschließend für 15-30 min in Transferpuffer getränkt. Nach Beendigung der Gelektrophorese wurde das Gel für 15 min in Transferpuffer equilibriert.

Der Zusammenbau des Blots erfolgte durch Rollen mit einem nassen Glasstab zur Vermeidung von Luftblasenentstehung. Das Blotting-Sandwich wurde mit 3 in Transferpuffer getränkte Filterkartons aufgebaut, die auf das Schwammtuch nacheinander gelegt wurden. Das Gel wurde auf den Filterstapel gelegt. Auf das Gel wurde die mit Transferpuffer equilibrierte Membran gelegt, worauf abschließend drei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere folgten. Alle Filter und die Membran hatten die gleiche Größe wie das Gel (8 x 5 cm²). Ein zweites Schwammtuch und ein zweites Gitter wurden auf dem Filterkartonstapel platziert. Das komplette Sandwich wurde zusammengepresst und beide Gitter miteinander verriegelt. Der Puffertank der Western-Blot-Apparatur wurde mit kaltem Transferpuffer so hoch aufgefüllt, dass das Sandwich komplett mit Puffer bedeckt war. Das Sandwich wurde in die dafür vorgesehenen Halteschienen im Puffertank geschoben. Der Transfer wurde bei 4⁰ C über 2 h mit 400 mA Elektrizitätsmenge durchgeführt.

2.5.2.3.4. Immunologischer Proteinnachweis

Die transferierten Proteine wurden durch die Bindung des primären und des sekundären Antikörpers identifiziert. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase kann mit Hilfe des ECL-Systems sichtbar gemacht werden. Beim ECLTM Western Blotting handelt es sich um eine Licht emittierende, nicht radioaktive Methode, um spezifische Antigene zu detektieren. Diese werden von Antikörpern erkannt, die direkt mit Peroxidase markiert sind.

Material:

Primäre Antikörper: Maus monoklonaler anti α -DG Antikörper (VIA4-1) Immunogen:

Kaninchen-Muskelmembranpräparation (upstate biotechnology).

Kaninchen polyklonales anti α -DG-Antiserum Immunogen: rekombinantes (30-315) Maus α -DG Fragment, durch Peptid-Affinitätschromatographie aufgereinigt (A. Brancaccio).

Sekundäre Antikörper: Peroxidase gekoppelter Ziege anti-Maus Antikörper (Santa Cruz)

Peroxidase gekoppelter Ziege anti-Kaninchen Antikörper (Santa Cruz).

Blotting-Lösung: 10x TBS-Stammlösung: 80 g Natriumchlorid (1,37 M NaCl), 12 g Tris-Base ad 900 ml mit H₂O bidest; ph-Wert mit Salzsäure auf 7,3 eingestellt (100 mM Tris-HCL); ad 1 L mit dH₂O.

TBS (Tris-Buffered Saline): 100 ml 10X TBS ad 1 L mit dH₂O.

Durchführung: Die Membran wurde kurz in TBS gewaschen und anschließend 1 h mit 5 % Milchpulver in TBS/0,5 % Tween 20 bei Raumtemperatur geblockt. Der erste Antikörper wurde in 2,5 % Milchpulver in TBS/0,5 % Tween 20 verdünnt (1:500). Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C wurde die Membran mit 2,5 % Milchpulver in TBS/0,5 % Tween 20 für 15 min 3 x gewaschen. Nachfolgend wurde die Membran 1 h mit dem zweiten Antikörper (Verdünnung 1:5000) in 2,5 % Milchpulver in TBS/0,5 % Tween 20 bei Raumtemperatur inkubiert und mehrfach gewaschen (2 x 10 min mit TBS/0,5 % Tween 20; 1 x 10 min mit TBS/3 % Tween 20; 2 x 15 min mit TBS/0,5 % Tween 20; 2 x 30 min mit TBS/0,5 % Tween 20 und 2 x 30 min mit TBS). Zur Entwicklung wurden 5 ml Lösung I und 5 ml Lösung II des ECL-Kits miteinander gemischt, die Membran in dieser Lösung 1 min inkubiert, auf Whatman Papier kurz getrocknet und in eine Filmkassette gelegt. Es wurde ein Film mit den folgenden Expositionszeiten auf die Membran gelegt: 5 sec; 10 sec; 15 sec; 30 sec; 1 min; 5 min und anschließend entwickelt.

2.5.3. RT-PCR

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren. Besondere Bedeutung kommt dieser Methode zu, wenn solche Transkripte nachgewiesen und analysiert werden sollen. Im Vergleich zum RNA-Nachweisverfahren, wie der Northern-Blot-Analyse, ist die Sensitivität dieser Methode erheblich größer. Bei der RT-PCR erfolgt zuerst eine cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Matrize, darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Bei der cDNA Erststrangsynthese können verschiedene Arten von Primern für die Polymerase Kettenreaktion verwendet werden, die sich je nach der Zielsetzung des Experiments unterscheiden: a) Oligo(dT)-Primer: Mit Hilfe eines etwa 15 bis 20 bp langen Oligo(dT)-Primers, der im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende eukaryotischen mRNA hybridisiert, werden aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle (2-4% der Gesamt-DNA) umgeschrieben. b) „Random“-Hexamere sind Hexanukleotide mit einer statistischen Basenzusammensetzung. Folglich können diese Primer entsprechend ihrer individuellen Sequenz an den verschiedensten Stellen eines mRNA-Moleküles hybridisieren und damit eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der mRNA einleiten. Von Vorteil ist eine Erststrangsynthese mit Random-Hexamere immer dann, wenn Sekundärstrukturen innerhalb der Matrizen-RNA eine Amplifikation von einer definierten Startstelle aus verhindern oder ein Sequenzverlust am 5'-Ende vermieden werden soll. Ein solcher Sequenzverlust entsteht häufig durch einen vorzeitigen Abbruch der Polymerasereaktion bei einer am 5'-Ende der mRNA beginnenden cDNA-Synthese. Spezifische Primer sind von Vorteil, wenn ein Transkript mit geringer Häufigkeit amplifiziert werden soll. Das Produkt des ersten Reaktionsschrittes, ein cDNA/RNA-Doppelstrang, wird schließlich in einer PCR als Matrize verwendet.

2.5.3.1. Herstellung der mRNA

Materialien: Umschreibe-Kit Poly AT Tract System 1000 (Promega):
GTC Extraktionspuffer EB; Dilutionspuffer DB.
 β -Mercapto-Ethanol 48,7% (ME).
Biotynilierte Oligo d(T)-Probe (50 pmol/ μ l).
Streptavidin-paramagnetische Partikel (SA PMP).
SSC 0,5x Lösung; Nukleasefreies Wasser.
Magnetischer Ständer für Eppendorf-Hütchen.

Durchführung: Die Extraktion der mRNA erfolgte laut Empfehlungen des Herstellers (Promega). Die Zellen (10⁶ pro Zelllinie) wurden in Eppendorf-Hütchen pelletiert und mit kaltem PBS gewaschen. Mit 40 µl Extraktionspuffer (EB mit 1,64 µl Mercapto-Ethanol ME versetzt) wurden die Pellets resuspendiert und anschließend 80 µl „dilution“ Puffer (DB plus 1,64 µl ME plus 5pmol Oligo(dT)) zugegeben. Die Hybridisierung der mRNA mit den Oligo(dT) erfolgte bei 70°C für 5 min Protein und Zelldebris wurden durch Zentrifugation (12000 rpm für 10 min) pelletiert, der Überstand wurde vollständig abgenommen und zu den 3x mit SSC im Magnetständer gewaschenen paramagnetischen Partikeln (60 µl) pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT sind die biotynilierten mRNA-Moleküle an die paramagnetischen Partikel gebunden und können im Magnetständer pelletiert werden. Anschließend wurde die gebundene mRNA 3x mit SSC gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in 30 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Die mRNA-Lösung wurde dann direkt für die cDNA-Synthese eingesetzt.

2.5.3.2. cDNA Synthese (Erststrangsynthese)

Materialien: 5 X konzentrierter Reaktionspuffer (Promega).
Oligo(dT)-Primer p(dT)₁₅ (Boehringer).
dNTP-Mix je 10 mM, (Qiagen).
rRNasin[®] Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl, Promega).
Natriumpyrophosphat (40 mM) auf 42°C vorgewärmt.
AMV-RT (30 U/µl, Promega).

Durchführung: Zur cDNA-Erststrangsynthese wurden Oligo(dT)-Primer und die AMV-Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt (Krug and Berger 1987). Für die Durchführung wurde das entsprechende Protokoll des Herstellers der AMV-RT verwendet. Dazu wurden je 2,0 µg zelluläre Gesamt-RNA und 100 pmol Oligo(dT)-Primer in einem Volumen von 15,0 µl für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach der schnellen Abkühlung der Proben auf Eis wurde laut Maßgabe des Herstellers je 5,0 µl AMV-RT Reaktionspuffer, 2,5 µl dNTP-Mix, 1,0 µl rRNasin[®] Ribonuklease-Inhibitor, 2,5 µl Natriumpyrophosphat und 3,0 µl AMV-RT dazugegeben. Die Reaktionsansätze wurden anschließend 60 min lang bei 42°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden je 120 µl dH₂O zugegeben und die Reaktionsansätze 5 min bei 100°C gekocht. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.5.3.3. Quantifizierung der α -Dystroglycan-mRNA-Expression

Material: PCR-Kit von Qiagen

Primer: α -Dystroglycan (543 bp) (KT 1): 5' AGGAGGAGCGAACACCTGC,

(KT 2): 3' GCACACCCTTATCAGTGTC

“nested” α -Dystroglycan (416 bp) (WB 10): 5'GGAGCAGGTGTGCAGAGGG

(WB 11): 3' AAGATGGCAAAGCCTCTTTCCCTG

β -Aktin (618 bp) (CS 21): 5' CGCTGCGCTGGTCGTCGACA

(CS 37): 3' GTCTCGCTCGATTTCCCGCT

“nested” β -Aktin (239 bp): (CS 157): 5' TGGGTCAGAAGGATTCCTAT,

(CS 158): 3' AGGTCTCAAACATGATCTGG

Durchführung: Für die Amplifikation der α -Dystroglycan cDNA wurden jeweils 10 μ l vom Umschreibungsansatz und ein Primerpaar eingesetzt, das mit 5'- und 3'-Sequenzen der bekannten Intronstelle hybridisiert. Hiermit wurde die Vermehrung von Verunreinigungen durch genomische DNA vermieden. Als Kontrolle wurde ein Abschnitt des β -Aktins amplifiziert. Die beschriebenen Standard PCR-Bedingungen (2. 2.4.2.) wurden durchgeführt und die PCR-Produkte mit einer präparativen Gelelektrophorese isoliert. Anschließend wurde die aufgereinigte DNA in 100 μ l dH₂O eluiert und seriell mit Faktor 10 verdünnt. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte durch eine zweite “nested” PCR-Runde. Zu diesem Zweck wurden 1 μ l der Verdünnungsreihe 10⁻⁴ bis 10⁻¹² und “nested” Primer benutzt. Nach 27 Amplifikationszyklen wurden 20 μ l von jedem Verdünnungsansatz in einer analytischen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3. Ergebnisse

3.1. LCMV-Infektion von eukaryotischen Zelllinien.

Für die Untersuchung des Tropismus von LCMV wurden vorwiegend humane und murine Zelllinien ausgewählt. Die Virusreplikation wurde mittels Plaque-Tests, Immunfluoreszenz und Bindungsanalysen untersucht.

3.1.1. Nachweis der LCMV-Vermehrung mittels Plaque-Tests

Erstes Ziel war es, den Tropismus des LCMV in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen und die Kinetik der Virusreplikation zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde der bereits etablierte Plaque-Test auf L 929 (murine Fibroblasten) eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine Methode zur Titration von virushaltigen Überständen (Lehmann-Grube and Ambrassat 1977). Für die Untersuchung der Virusvermehrung wurden Zelllinien ausgewählt, die für die Gentherapie interessant sind. Die Infektion erfolgte jeweils mit drei unterschiedlichen *moi* „multiplicity of infection“ (von 0,01, 0,1 und 1). Die Medium-Überstände vom 1., 2., und 3. Tag wurden anschließend auf L 929 Zellen titriert.

L 929-Zellen, BHK (baby hamster kidney-Zellen), HUH 7 (humane Hepatoma-Zellen) und K 562 (humane Erythroleukämie Zellen) waren alle gut infizierbar (Abb. 6). Die Kinetik der Virusproduktion war von der *moi* abhängig. Bei einer *moi* von 0,01 erreichte die Virusproduktion von L 929- und BHK-Zellen am 2. Tag einen Höhepunkt und ließ am 3. Tag nach. Eine Infektion mit einer *moi* von 1 führte bei L-929- und K 562- Zellen bereits am ersten Tag zu einer maximalen Virusfreisetzung im Überstand. Am 2. und 3. Tag war in diesem Fall eine Verringerung der Virusproduktion zu beobachten. Der höchste Virustiter wurde in L 929- und BHK-Zellen am 2. Tag nach einer Infektion mit einer *moi* von 0,01 erreicht. Die LCMV Produktion von HUH 7 und K 562 Zellen war im Vergleich zu L 929- und BHK-Zelllinien 10- bis 100-fach niedriger. Andere untersuchte Zelllinien ließen sich mit LCMV vergleichbar gut infizieren (Tab. 1). FDC Pmix murine hämatopoetische Stammzellen und MO7e humane Vorläuferzellen waren auch mit *moi* von 10 und unabhängig von dem Zeitpunkt nach der Infektion, schlecht infizierbar (weniger als 10^3 PFU/ml). Humane hämatopoetische CD34+ Stammzellen waren mit einer *moi* unter 10 gegenüber der LCMV Infektion resistent. Murine (EL-4) Lymphozyten waren nur mit einer *moi* über 10 infizierbar.

Die Virusproduktion betrug bei einer moi von 100 am 5. Tag nach der Infektion 2×10^7 PFU/ml.

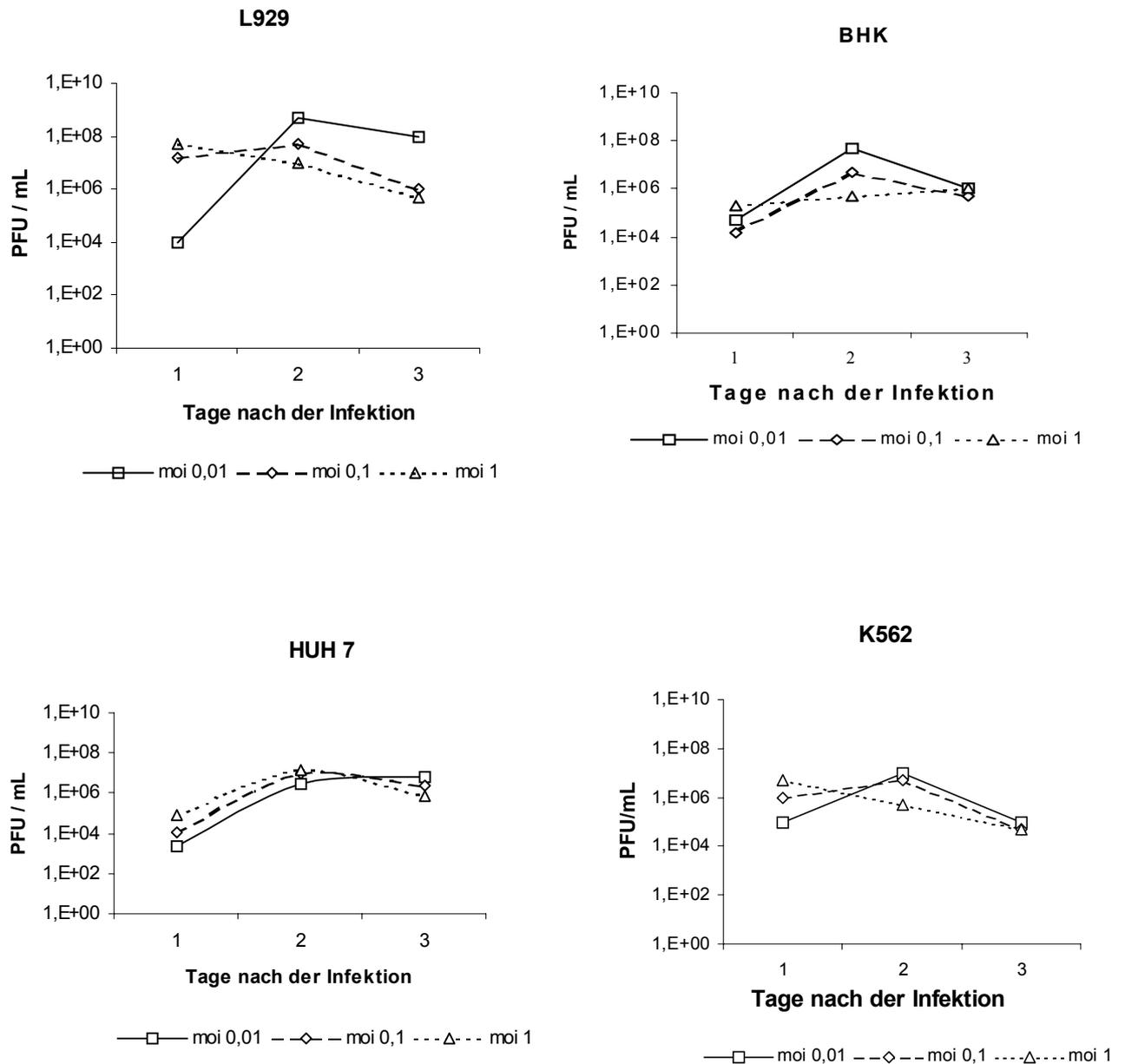


Abbildung 6: LCMV Vermehrungskinetik in vier verschiedenen eukaryotischen Zelllinien.

Die Zelllinien wurden mit LCMV und drei unterschiedlichen moi (0,01, 0,1, und 1) infiziert. Medium-Überstände vom ersten, zweiten und dritten Tag nach der Infektion wurden mittels Plaque-Tests auf L 929 Zellen titriert. Der Titer wurde als Mittelwert von jeweils drei zeitlich getrennten Ansätzen in PFU/ml berechnet.

Tabelle 1: LCMV-Vermehrung in verschiedenen humanen und murinen Zelllinien.

Fibroblasten, Stroma- und epitheliale Zellen wurden mit einer moi von 0,01 infiziert. Die Virusproduktion wurde am 2. Tag nach der Infektion untersucht. Murine Lymphozyten wurden mit einer moi von 100 mit LCMV infiziert. Die LCMV-Replikation wurde in diesem Fall am 5. Tag der Infektion gemessen. Der Mittelwert von zwei zeitlich getrennten Ansätzen wurde als PFU/ml angegeben.

Zelllinie	Herkunft	Tag nach der Infektion	moi	Titer PFU/ml
Te 671	Humane Fibroblasten	2	0,01	2x10e8
293	Humane Nieren- Epithelien	2	0,01	8x10e7
SC-1	Murine Fibroblasten	2	0,01	9x10e7
MS-5	Murine Stromazellen	2	0,01	5x10e7
EL-4	Murine Lymphzyten	5	100	2x10e7

Die LCMV-Infektion von Jurkat-Zellen war nur mit einer moi über 0,1 möglich. Die Titration der Überstände mittels Plaque-Tests ergab die folgenden Resultate (Abb. 7)

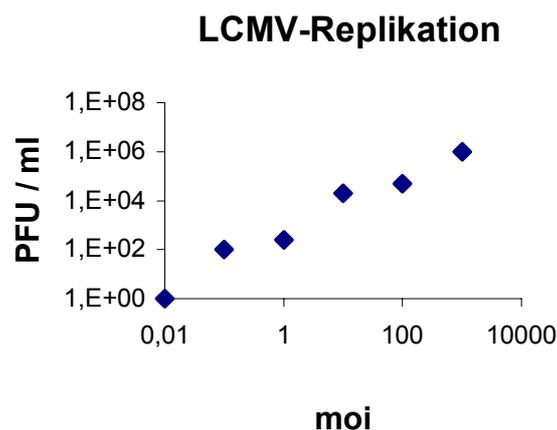


Abbildung 7: LCMV Replikation in Jurkat-Zellen.

Ansätze mit moi von 0,01, 0,1, 1, 10, 100 und 1000 wurden am 3. Tag der Infektion nach Virusproduktion analysiert. Der Mittelwert von drei zeitlich getrennten Ansätzen wurde als PFU/ml angegeben.

3.1.2. Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien mit LCMV

Im Weiteren wurde untersucht, weshalb in resistenten Zelllinien die Virus-Replikation gehemmt ist. Der Anteil infizierbarer Zellen wurde für verschiedene Zelllinien gemessen. Die Expression der viralen Proteine von infizierten Zellen wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz und einem polyklonalen anti-LCMV-Serum analysiert. Mit dieser Methode wurde der Anteil positiver Zellen bestimmt.

Die im früheren Arbeitsabschnitt beschriebenen LCMV empfänglichen Zelllinien zeigten am 3. Tag der Infektion eine Infektionsrate von über 90% (Tab. 2). K 562-Zellen zeigten nur eine mäßige Infektionsrate, die entsprechend zu einer niedrigen Virusproduktion führte (10 bis 100fach weniger im Vergleich zu Fibroblasten). Bei einer moi von 1 waren die humanen T-Lymphozyten Jurkat nur um 0,01% infizierbar. Bei einer moi von 100 bzw. 1000 stieg die Infektionsrate von Jurkat auf 5 bzw. 24% an. Die anderen hämatopoetischen Zelllinien waren gegenüber der LCMV Infektion resistent.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz korrelierten mit jenen der Virusvermehrung. Bei den hämatopoetischen Zelllinien, die keine LCMV Replikation mittels Plaque-Test zeigten, wurde mit der Immunfluoreszenz und einer moi unter 10 auch keine Expression viraler Proteine festgestellt. Bei Jurkat-Zellen war die Infektion mit einer moi über 10 durchaus möglich (Abb. 8). Die Virusproduktion und die Infizierbarkeit der anderen resistenten hämatopoetischen Zelllinien wurden mit einer moi über 10 nicht getestet.

Tabelle 2 : Nachweis der Expression von LCMV-Proteinen in infizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz.

Die Infektionsrate wurde als Anteil der intrazellulär angefärbten Zellen berechnet. Die Anfärbung wurde mit einem polyklonalem anti-LCMV-Serum auf fixierten Zellen am 3. Tag der Infektion durchgeführt. Der Prozentsatz der immunreaktiven von jeweils 200 ausgezählten Zellen ist als Mittelwert von drei Ansätzen angegeben.

Zelllinie	Te 671	L 929	293	BHK	K 562	Jurkat	FDC-Pmix	MO 7e	CD 34+
moi	0,01	0,01	0,01	0,01	0,1	1	100	1000	10	10	10
% pos.	99	95	92	98	20	0,01	5	24	0	0	0

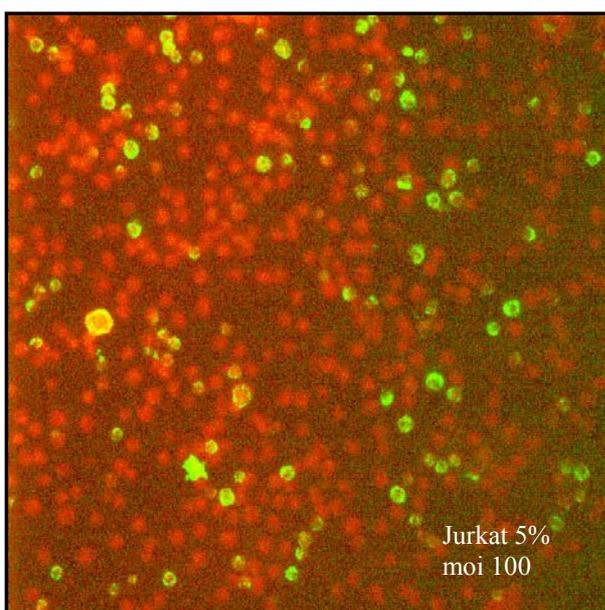
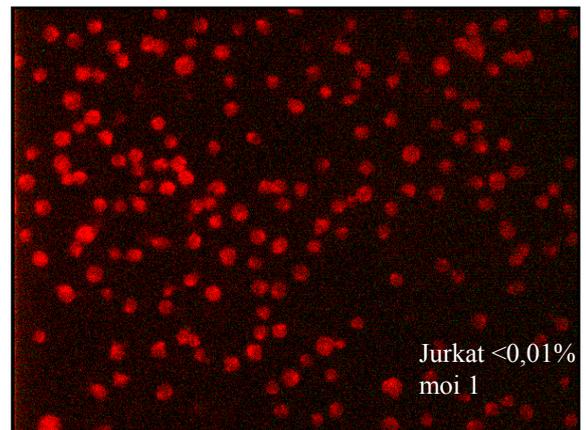
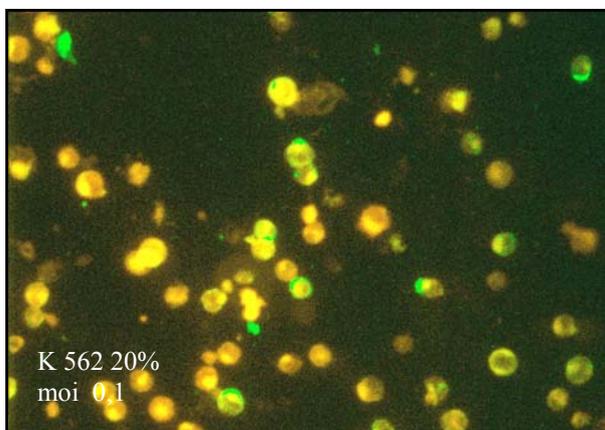
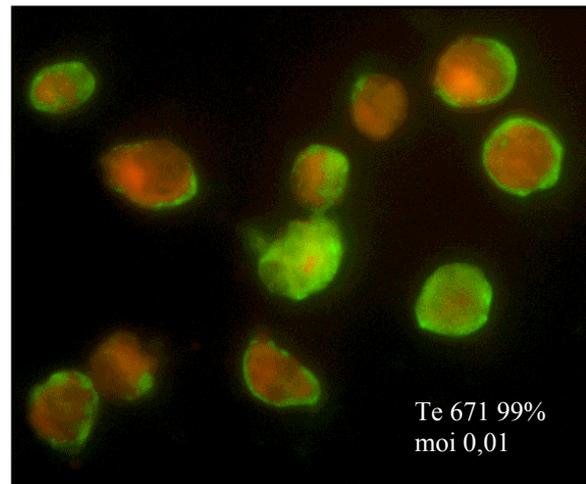
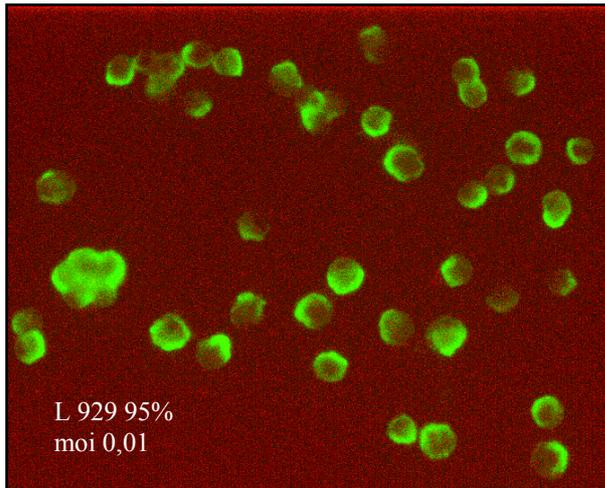


Abbildung 8: Immunfluoreszenzbilder. Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien mit LCMV am 3. Tag der Infektion. Infizierte Zellen wurden auf einen Objekt-Träger fixiert und mit Kaninchen anti-LCMV-Serum inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC gekoppelter Ziege anti Kaninchen Antikörper verwendet. Die infizierten Zellen erschienen nach der Anregung mit UV-Licht im Zytoplasma stark hellgrünleuchtend. Zur Betonung des Hintergrundes wurde eine Kontrastfärbung mit Evans blue durchgeführt. Somit sind die nicht infizierten Zellen nur rot angefärbt. Die Präparate sind mit FITC/ Texas-Red-Filter (bis auf die L-929) wie beschrieben ausgewertet.

3.1.3. LCMV Bindung

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Resistenz von humanen lymphoiden Zellen wie Jurkat und anderen hämatopoetischen Zellen, wie den CD34+ Stammzellen, gegenüber der LCMV-Infektion auf einem Mangel an Virusrezeptoren auf der Zelloberfläche beruht. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente war der LCMV-Rezeptor noch nicht identifiziert. Es war jedoch bekannt, dass es sich um einen Proteinrezeptor handelt, der in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich expremiert ist (Borrow and Oldstone 1992). Die Bindung des Virus an verschiedene Zelllinien wurde als Maß für die Expression des Rezeptors gemessen. Der Nachweis des gebundenen Virus erfolgte mittels eines monoklonalen anti-LCMV-GP-1 Antikörpers und einer anschließenden Inkubation mit einem Fluorescein-gekoppelten sekundären Antikörper.

Mit dieser Methode konnte zunächst die Bindung des LCMV an humane Fibroblasten (Te 671) nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde das für den Nachweis der Bindung optimale Verhältnis von Zellen zu Viruspartikeln ermittelt. Es zeigte sich eine dosisabhängige Bindung. Der Sättigungsbereich wurde auch mit einer moi von 1000 nicht erreicht (Abb. 9). Eine höhere moi war allerdings bei Verwendung von unkonzentrierten Virusüberständen nicht praktikabel.

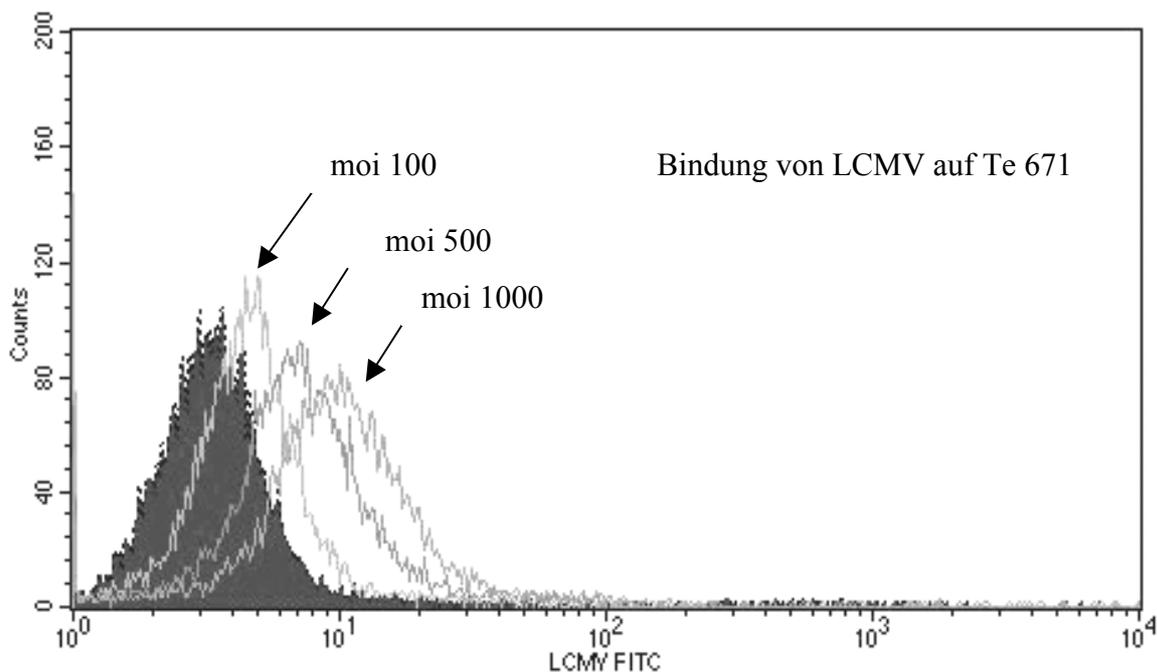


Abbildung 8. Dosisabhängige Bindung von LCMV an humane Fibroblasten. Titration des für den Nachweis der Bindung erforderlichen Viruspartikel/Zellen-Verhältnisses.

Im Weiteren wurden Bindungsanalysen mit hochkonzentriertem LCMV-Überstand durchgeführt. Der Sättigungsbereich wurde, bei einem erneuten Ansatz, mit einer moi von 5000 erreicht. Verschiedene Zelllinien wurden getestet. Te 671 (humane Fibroblasten) und 293 (epitheliale Zellen) zeigten ein stark positives Signal (über 90%). K562-Zellen zeigten ein schwächeres Signal (15% positiv). An der Zellmembran von Jurkat und CD34+ konnte kein gebundenes Virus nachgewiesen werden. L 929-Zellen zeigten trotz der Empfänglichkeit für LCMV nur eine schwache Bindung (1%) (Abb 10).

Mit Ausnahme von L 929 Zellen wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Infizierbarkeit und der Intensität des durchflusszytometrischen Signals festgestellt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Eintritt von LCMV in die Zielzelle in Jurkat und CD34+ möglicherweise blockiert ist. Um die Infektionsblockade auf der Bindungsebene zu beweisen, wurden Transduktionsversuche mit retroviralen LCMV-Pseudotypen durchgeführt. Pseudotyp-Viren tragen in der Hülle das Glykoprotein eines fremden Virus. Das Nukleokapsid der MLV(LCMV) Pseudotyp-Partikeln stammt vom Moloney Murine Leukämie Virus (MLV) ab (Genom und Nukleoprotein) und ist in LCMV-Hüllprotein verpackt.

3.1.4. MLV(LCMV)*lacZ* Transduktion von Jurkat- und CD 34+ Stammzellen

Zur Klärung der Ursache der Resistenz von Jurkat- und CD34+ Stamm-Zellen sollten als nächster Schritt Transduktionsversuche mit MLV(LCMV)*lacZ*-Pseudotyp durchgeführt werden. Der Eintritt des Pseudotyps in die Zielzelle wird nur durch das LCMV-Hüllprotein vermittelt. Alle intrazellulären Schritte der retroviralen Replikation erfolgen durch die retroviralen Nukleokapsidproteine. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Schritte in der Replikation von MLV in allen untersuchten Zellen gleich effizient stattfinden (von Laer, Thomsen et al. 1998). Eine Resistenz der Zielzellen gegenüber der Transduktion mit MLV(LCMV)*lacZ* wäre der direkte Beweis für eine Blockade auf Rezeptorebene. Die Herstellung des Pseudotyps erfolgte durch LCMV-Infektion einer von humanen Fibroblasten abstammenden TelCeb Verpackungslinie (Abb. 11). Diese ist eine *env*-freie Verpackungslinie, die die *gag* und *pol* Gene von MLV stabil expremiert. Ein Reporter gen (*LacZ*) wird durch einen retroviralen Vektor stabil expremiert.

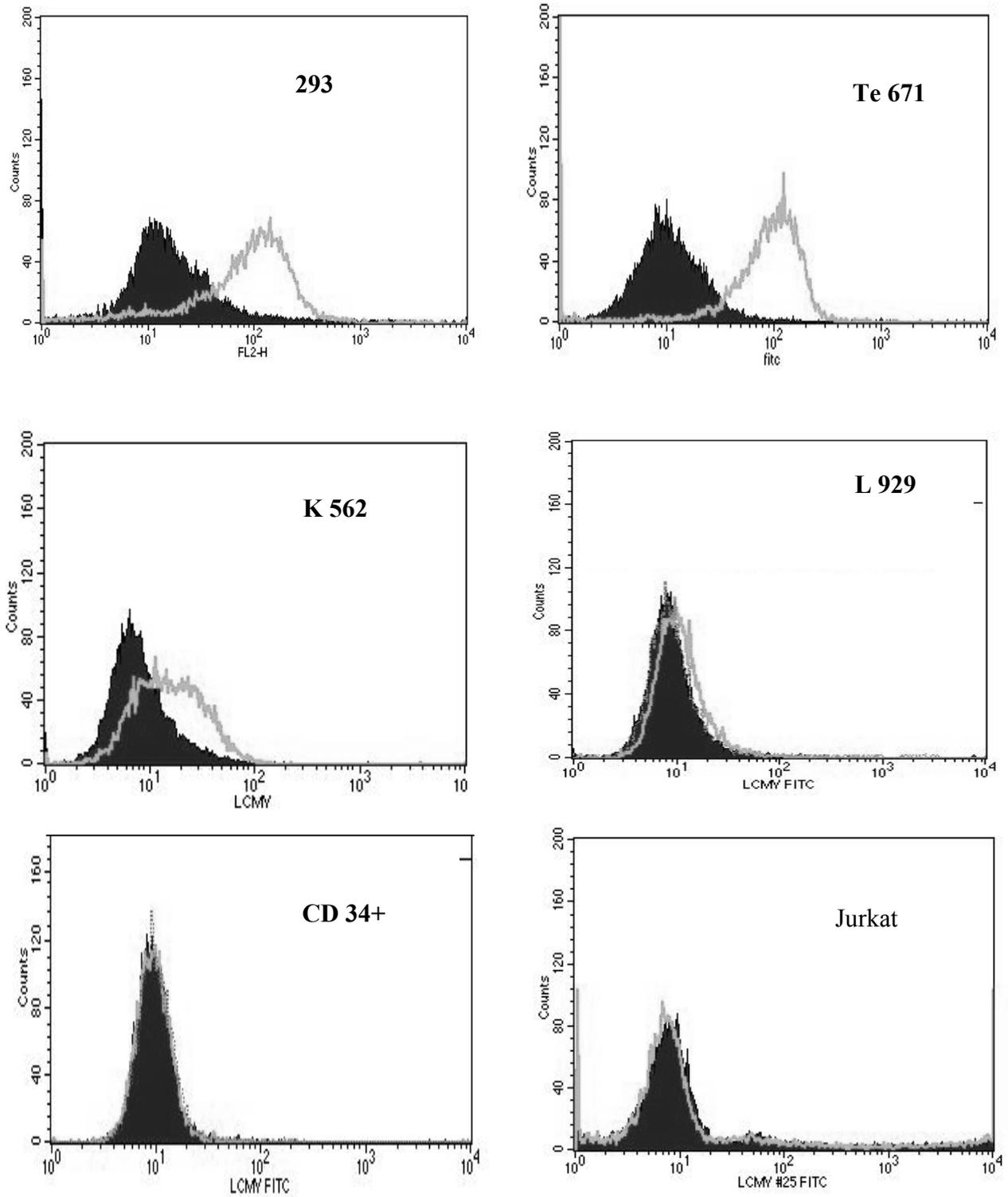


Abbildung 10 : Nachweis der LCMV-Bindung an die Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie. Für diesen Versuch wurde eine moi von 5000 und ein monoklonaler anti- LCMV-GP Antikörper verwendet. LCMV-empfindliche Zelllinien wie Te 671 und 293 zeigten ein starkes Signal. Mäßig infizierbare Zellen wie K 562 waren nur schwach positiv. L-929 Mausfibroblasten waren trotz der guten Infizierbarkeit nur schwach positiv. Die LCMV-resistenten Zelllinien wie Jurkat und CD 34+ Stammzellen waren negativ.

Durch die Infektion mit einem LCMV-Helfervirus werden Partikel freigesetzt, die ein MLV-Nukleocapsid aber ein LCMV-Hüllprotein haben (Miletic et al. 1999). Nach der Infektion der Verpackungslinie mit LCMV werden sowohl diese MLV(LCMV)lacZ Pseudotypen als auch LCMV Wildvirus-Partikel freigesetzt. Das Verhältnis zwischen Pseudotyp- und Wildtyp-Partikeln ist ca. 1:1000. Da LCMV-GP nicht stabil expremiert werden konnte, war die Herstellung einer rekombinanten Verpackungslinie (Helfervirus-frei) nicht möglich.

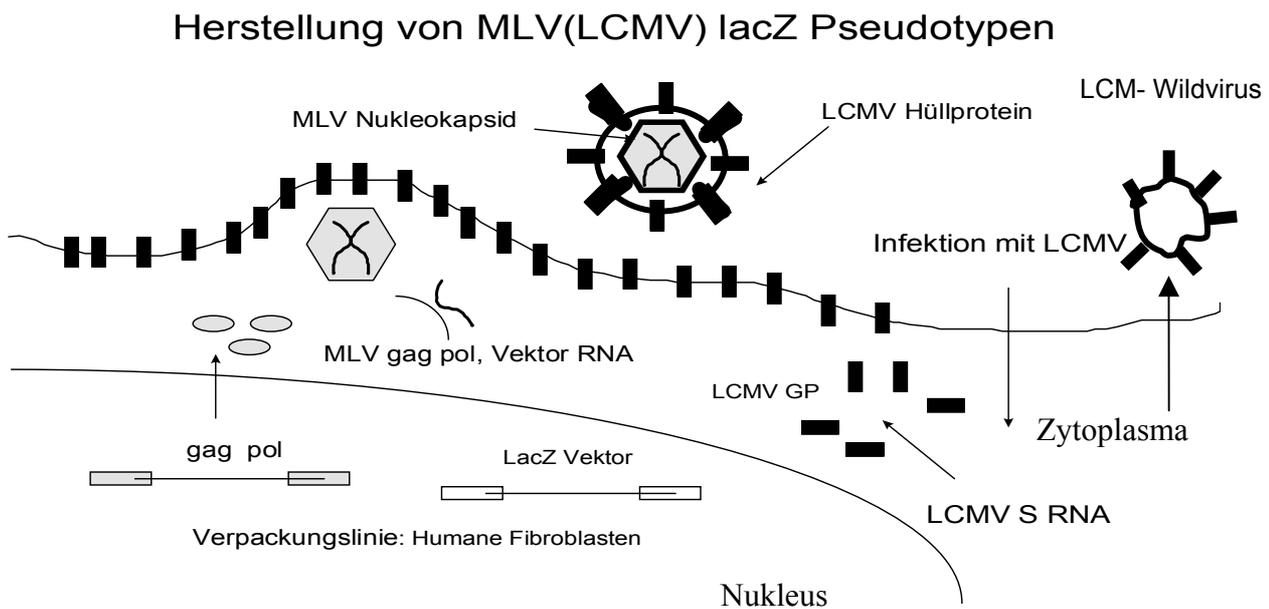


Abbildung 11 : Verpackungslinie zur Herstellung des MLV(LCMV)lacZ Pseudotyps.

Die *env*-negative, *gag pol* stabil expremierende TelCeb Zelllinie wurde mit LCMV infiziert. Dies führt zur Freisetzung von Partikeln, die das LacZ Gen tragen und in LCMV-Hüllprotein verpackt sind.

Der Tropismus dieses Pseudotyps für verschiedene Zelllinien wurde getestet. Als positive Kontrolle wurde die Verpackungslinie TelCeb mit amphotropem MLV infiziert und MLV lacZ-Überstände hergestellt (Munk, Lohler et al. 1997). Unterschiedliche Zelllinien wurden mit Pseudotyp-Überstand infiziert. Zwei Tage später wurden nach einer LacZ-Färbung alle beta-Galaktosidase expremierenden Zellkolonien gezählt (MacGregor and Caskey 1989). Der Titer des Virusüberstandes wurde als „LacZ transfer units“ (LTU) / ml angegeben. Als Positivkontrolle für die Expression des MLV-Genoms in Jurkat-Zellen wurde parallel eine Infektion mit amphotropem MLVlacZ durchgeführt.

Mit Ausnahme von L929 Zellen waren alle für LCMV empfänglichen Zelllinien auch durch MLV(LVMC)lacZ gut transduzierbar (Titer 3×10^4 LTU/mL). Der Titer auf L929 und K562 war eine Größenordnung niedriger (Titer 3×10^3 LTU/mL). Jurkat und CD34+ waren gegenüber der Infektion mit MLV(LCMV)lacZ absolut resistent. Te 671 und Jurkat-Zellen exprimieren den amphotropen MLV-Rezeptor und sind mit MLV infizierbar (Tabelle 3).

Der Eintritt des MLV(LCMV) Pseudotyps in die Zielzelle wird durch das LCMV-Hüllprotein und dessen Bindung an den LCMV-Rezeptor vermittelt. Die Resistenz von Jurkat und CD 34+ Stammzellen gegenüber der Infektion mit MLV(LCMV) ist ein direkter Beweis, dass die Infektionsblockade auf Rezeptorebene liegt. Dieses Ergebnis zeigt, dass Jurkat-Zellen geeignet sind, um mittels Expressionsklonierung den LCMV-Rezeptor zu identifizieren.

Tabelle 3 : Transduktion von LCMV-empfindlichen und -resistenten Zelllinien mit MLV(LCMV) lacZ Pseudotyp. Eine LacZ-Färbung wurde am 1. Tag nach der Transduktion durchgeführt. Der Titer wurde als Mittelwert von zwei zeitlich getrennten Ansätzen als „LacZ transfer units“ (LTU) / ml Überstand angegeben. (NN: nicht nachweisbar NG: nicht gemacht).

	Zelllinie	Te 671	MS-5	L929	K 562	Jurkat	CD 34+
LTU/ml	Ampho MLVlacZ	5×10^4	NG	NG	NG	2×10^3	NG
	MLV(LCMV) lacZ	3×10^4	4×10^4	3×10^3	2×10^3	NN	NN

3.2. Versuch der Identifikation des LCMV-Rezeptors mittels Expressionsklonierung

Die Expressionsklonierung ist eine Methode bei der eine cDNA-Bank in einer für einen bestimmten Phänotyp negativen Zelllinie exprimiert wird. Die cDNA-Bank wird aus einer phänotypisch positiven Zelle isoliert. Dadurch wird die Expression des fehlenden Proteins und die Rekonstruktion des bestimmten Phänotyps erzielt. Mit dieser Methode erfolgt die Isolierung von Genen, die für einen bekannten, idealerweise selektierbaren Phänotyp kodieren (Abb. 12). Zur Klonierung des LCMV-Rezeptors in Jurkat wurde eine aus der für LCMV empfänglichen Maus-Zelllinie MS-5 stammende retrovirale cDNA Bank verwendet. Diese wurde in einem Retrovirus verpackt und in Jurkat-Zellen transduziert. Die Selektion erfolgte durch einen retroviralen MLV/LCMV *neo*-Pseudotyp, der nur LCMV-Rezeptor-exprimierende Jurkat-Zellen infizieren kann.

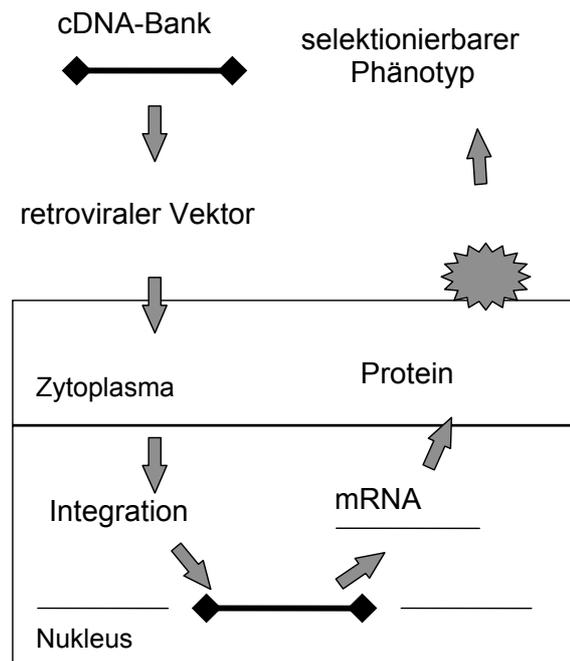


Abbildung 12 : Schematische Darstellung einer Expressionsklonierung.

3.2.1. Vorversuche

Zur Klonierung des LCMV-Rezeptors wurden die humanen Jurkat T Lymphozyten ausgewählt. Es wurde bisher gezeigt, dass die Resistenz dieser Zelllinie gegenüber der LCMV-Infektion, auf Rezeptorebene liegt. Die Ursache dieser Resistenz könnte ein Mangel bzw. eine niedrige Expression des LCMV-Rezeptors sein, oder es handelt sich um eine Funktionsblockade des Rezeptors, wie z.B. durch eine für die Bindung ungünstige Prozessierung. Um einen funktionellen LCMV-Rezeptor zu exprimieren, wurde eine Expressionsklonierung durchgeführt.

Für die optimale Durchführung des Experiments waren folgende Vorversuche erforderlich:

- a) Bestimmung der Klonierungseffizienz von Jurkat, b) Hintergrund-Bestimmung,
- c) Etablierung eines Protokolls für die Verpackung der retroviralen cDNA und die Transduktion von Jurkat, d) Herstellung eines geeigneten Selektionsvektors.

3.2.1.1. Bestimmung der Klonierungseffizienz von Jurkat

Ein Klon ist eine Zellpopulation, die aus einer einzelnen Zelle stammt. Ziel einer Zellklonierung ist die endogene genetische bzw. phänotypische Variabilität in einer Zellpopulation zu minimieren. Dies erfolgt durch die Isolierung und Züchtung von einzelnen Zellen unter geeigneten Bedingungen. Die Züchtung bei einer geringen Dichte führt zu einem Mangel an Wachstumsfaktoren, die von den Zellen freigesetzt werden und für die Zellteilung erforderlich sind. Nur ein Anteil der Zellpopulation kann aus diesem Grunde die Klonierung überleben. Die Klonierungseffizienz ist vom Zelltyp und den Klonierungsbedingungen abhängig. Die Züchtung der Zellen in einem festen bzw. halbfesten Wachstumsmedium kann die Homogenität der Klone gewährleisten.

Für die Bestimmung der Klonierungseffizienz wurden die Jurkat-Zellen in halbfestem Medium kultiviert. Serielle Verdünnungen von Jurkat-Zellen wurden in 0,9 % Methylzellulose und 0,3 % Agar kloniert. Die Auszählung der Klone nach 2 Wochen bei 37⁰C und die Berechnung der Mittelwerte ergab die folgenden Ergebnisse: Klonierungseffizienz in Agar 17,6 %, in Methylzellulose 19,9 %. Da der Unterschied statistisch nicht signifikant war, wurde das Experiment mit der weniger aufwendigen Methode im Methylzellulose-Wachstumsmedium durchgeführt (Tab.4).

Tabelle 4: Bestimmung der Klonierungseffizienz von Jurkat-Zellen. Verschiedene Zellverdünnungen bei 37⁰C über zwei Wochen in 0,3% Agar bzw. 0,9% Methylzellulose. Der Mittelwert von drei Ansätzen wurde berechnet. Bei einer initialen Zellzahl von 3000 waren die Kolonien sehr dicht aneinander gewachsen und konnten deswegen nicht gezählt werden.

Ausgangs- Zellzahl	Zahl der Jurkat-Kolonien (3 Ansätze)					
	Agar			Methylzellulose		
3	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	3	6	4
300	45	54	60	64	53	62
3000	Nicht messbar					

3.2.1.2. Hintergrundsbestimmung

Durch die Expressionsklonierung sollten Jurkat Zellklone selektiert werden, die mit LCMV infizierbar sind. Diese Klone entstehen durch die Bindung und den Eintritt des MLV(LCMV)*neo* Selektionsvektors in Jurkat-Zellen, die a) nativ für LCMV empfänglich sind (Hintergrund) oder b) die LCMV-Rezeptor-cDNA exprimieren. Um ein sehr aufwendiges „screening“ der selektierten Klone zu vermeiden, sollte das Verhältnis der mit der gesuchten cDNA transduzierten Klone zu den Hintergrundklonen nicht zu niedrig sein.

Die Anzahl der als Hintergrund erwarteten Klone wurde mit der folgenden Formel berechnet: Klonierungseffizienz von Jurkat-Zellen x Anteil infizierbarer Jurkat-Zellen bei einer moi von 3 x ursprüngliche Zellzahl.

Die Infizierbarkeit ist von der moi abhängig und wurde mit der Immunfluoreszenz als Anteil infizierter Zellen gemessen. Im früheren Arbeitsabschnitt wurde gezeigt, dass ein geringer Anteil der Jurkat-Zellen mit LCMV infizierbar ist. Bei einer moi von 3 sind am 1. Tag der LCMV-Infektion weniger als 0,01% der Jurkat-Zellen infiziert (s. 3.1.2.)

Die Bindung des Selektionsvektors wird vom LCMV-Hüllprotein vermittelt. Für die Infektion mit dem Selektionsvektor wurde eine moi von 3 eingesetzt. Mit dieser moi wurde ein optimales Verhältnis zwischen Sensitivität und Spezifität des Selektionverfahrens erzielt. Eine niedrigere moi bei der Infektion mit dem Selektionsvektor würde zu einem Verlust von transduzierten Klonen führen. Eine höhere moi würde die Spezifität der Bindung an die Jurkat reduzieren und die Zahl der entstehenden Klone erhöhen.

Es wären deshalb bei einer Ausgangszellzahl von 10^6 Jurkat, einer Klonierungseffizienz in Methylzellulose von 19,9 % und einem 0,01 % infizierbaren Jurkat-Zellen maximal 20 G418 resistente Klone zu erwarten.

3.2.1.3. Protokoll für die Verpackung der cDNA-Bank und die Transduktion von Jurkat

Die konventionellen Transfektionsmethoden, wie zum Beispiel Calciumphosphat- oder Liposomen-Transfektion bzw. Elektroporation, sind für Jurkat ineffizient. Die Transduktionsrate ist in diesem Fall niedriger als 10 %. Um einen effizienteren Gentransfer zu erreichen, wurde eine retrovirale cDNA-Expressionsbank in Jurkat-Zellen transduziert. Mit diesem retroviralen Transduktionssystem ist in hämatopoetischen Zelllinien eine hohe Transduktionseffizienz (10-100%) zu erreichen. Im Gegensatz zu den episomalen DNA-Vektoren ermöglichen die retroviralen Vektoren eine stabile Integration und Expression des Transgens in Zielzellen (Kitamura 1998).

Für die Transduktion der Jurkat-Zellen wurde eine retrovirale cDNA-Bank in einer Phoenix-Ampho Zelllinie transient verpackt. Die Verpackung erfolgte mittels Calciumphosphat-Transfektion. Um den Titer der verpackten cDNA zu erhöhen, wurde das VSV-G-Hüllprotein parallel transfiziert. Die Verpackung mit VSV-G- zusätzlich zu dem amphotropen-Hüllprotein erleichtert den Eintritt in die Zielzelle und führt dadurch zu einem Anstieg des Titers und der Transduktionsrate. Für die transiente Verpackung wurde die vom Hersteller der cDNA empfohlene Menge von 1µl verwendet. Um multiple Insertionen wie bei einer hohen Transduktionsrate zu vermeiden, wurde eine Transduktionsrate von 30 % angestrebt. Eine niedrigere Transduktionseffizienz würde zu einem Verlust an transduzierten Genen führen. Mit dieser Transduktionsrate wurden auch Gene identifiziert, die schwach expremiert werden und deshalb wenig in einer cDNA repräsentiert sind (Kitamura, Onishi et al. 1995). Zunächst wurden die Bedingungen der retroviralen Transduktion von Jurkat etabliert. Da die verfügbare cDNA-Bank kein Merkgene enthielt, wurde parallel ein Kontrollvektor verpackt. Der Titer des *EGFP*-Vektors war auf Te 671 3×10^5 /ml und auf Jurkat-Zellen 10^5 /ml. Es wurde gezeigt, dass im Vergleich zu Te 671-Zellen die Infizierbarkeit von Jurkat-Zellen mit dem Ampho-VSV-Retrovirus um den Faktor 3 schlechter ist.

Die Transduktionseffizienz der Jurkat-Zellen betrug bei einer moi von 2, mit diesem Überstand 28 %. Es wurde angenommen, dass die parallel verpackte retrovirale cDNA-Bank den gleichen Titer hat wie der Kontrollvektor mit *EGFP*. Aus diesem Grunde wurde bei der Transduktion der verpackten cDNA-Bank in Jurkat eine moi von 2 (Titer auf Te671 berechnet) erzielt.

3.2.1.4. Verpackung des Selektionsvektors

Die Selektion der Jurkat-Zellen, die nach der retroviralen cDNA Transduktion den LCMV-Rezeptor exprimieren, wurde durch die Verwendung eines MLV/(LCMV) Pseudotyp-Vektors erreicht. Zu diesem Zweck wurde ein MLV/(LCMV)*neo*-Vektor hergestellt.

Die Verpackung dieses Vektors erfolgte in zwei Schritten: a) eine *env* freie Phoenix *gag, pol* Verpackungszelllinie wurde mit LCMV infiziert b) ein retroviraler MP1 *neo* Vektor wurde in dieser Zelllinie mittels Calciumphosphat transfiziert (Eckert, Stockschrader et al. 1996). Da diese Zelllinie kein *env* Protein exprimiert, werden die Viruspartikel mit dem LCMV-GP-Hüllprotein verpackt. Der Eintritt in die Zielzelle wird nur durch das LCMV-GP vermittelt. Diese Verpackung ist analog der in TelCeb-Zellen beschriebenen Verpackung des LacZ-Vektors.

Um einen hohen Titer des Selektionsvektors zu erreichen, wurde der optimale zeitliche Abstand zwischen LCMV-Infektion und Transfektion des MP1*neo*-Vektors bestimmt. Zu diesem Zweck wurde ein retroviraler *EGFP*-Vektor unter den selben Bedingungen verpackt. Mit dieser Methode war kein *neo* Selektionsverfahren erforderlich und deswegen war die Optimierung der Pseudotypproduktion weniger arbeitsaufwendig. Die Überstände von zwei zeitlich unterschiedlichen Ansätzen wurden mittels FACS-Analyse titriert (Abb. 13). Der höchste Virustiter wurde nach einer synchronen Infektion/Transfektion festgestellt. Die Virusproduktion erreichte 56 Stunden nach der Infektion den Maximalwert von 2×10^5 /ml.

Des Weiteren wurde der retrovirale MP1*neo*-Vektor unter den oben beschriebenen optimierten Bedingungen verpackt (von Laer, Thomsen et al. 1998). Der Titer auf Te 671-Zellen war 5×10^4 GTU/ml und mit Faktor 4 schlechter als der Titer des *EGFP*-Vektors. Zweihundert ml Überstände des MLV(LCMV)*neo*-Vektors wurden gesammelt und mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Nach der Ultrazentrifugation und der Aufnahme in 10 ml Wachstumsmedium war der Titer auf Te 671-Zellen 9×10^5 GTU/ml. Um sämtliche cDNA-Klone zu selektieren, die den LCMV-Rezeptor exprimieren, war für die Infektion der Jurkat-Zellen eine *moi* von 3 erforderlich. Die *moi* von 3 ist laut des Gesetzes der Poisson-Verteilung das geringste Verhältnis von Viren zu Zellen, das für die Infektion sämtlicher Zellen einer Zellpopulation notwendig ist.

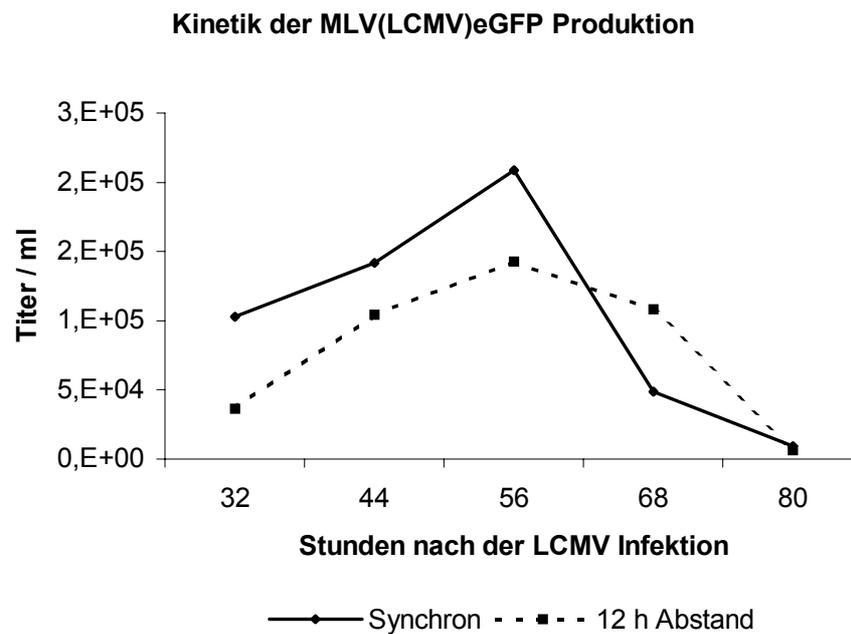


Abbildung 13: FACS-Analyse. Kinetik der MLV(LCMV)EGFP Produktion. Die Verpackungslinie Phoenix GP wurde mit LCMV infiziert und mit einem retroviralen EGFP-Vektor transfiziert. Dies führte zur Freisetzung von MLV(LCMV)EGFP Partikeln. Der optimale zeitliche Abstand zwischen Infektion und Transfektion wurde analysiert. Zwei Ansätze a) mit einer zeitgleichen Infektion und Transfektion und b) mit einem zeitlichen Abstand von 12 Stunden (zuerst die Infektion) wurden durchgeführt. Die Überstände von unterschiedlichen Zeitpunkten wurden auf Te 671-Zellen titriert. Die Transduktionseffizienz wurde nach Infektion von 5×10^5 Zellen mit $500 \mu\text{l}$ des Virusüberstandes gemessen. Der Titer lag bei $2 \times 10^5/\text{ml}$.

3.2.2. Durchführung der Expressionsklonierung

Die Expressionsklonierung wurde in folgenden Arbeitsschritten durchgeführt:

Tag 0 : Infektion von 8×10^5 Jurkat-Zellen mit 5,5 ml der verpackten cDNA-Bank (moi 2)

Tag 1 : Untersuchung der Transduktionseffizienz mittels Einzelzell-PCR

Tag 2 : Infektion von 3×10^6 Jurkat mit 10ml MLV(LCMV)*neo* Selektionsvektor (moi 3)

Tag 3 : Beginn der Selektion in G418-haltigem Methylzellulose-Wachstumsmedium

Tag 17: Isolierung und Züchtung der *neo*-resistenten Klone

Tag 30: Testung für die Expression des LCMV-Rezeptors mittels MLV(LCMV)*lacZ*

Tag 40: Isolierung der genomischen DNA und PCR zum "Rescue" des transduzierten Gens

Die Bestimmung der Transduktionseffizienz, welche am 1. Tag erfolgen sollte, gelang technisch nicht und wurde zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Insgesamt 100 G-418 resistente Klone konnten isoliert werden, wobei 90 davon das Anwachsen im Selektions-Wachstumsmedium überlebten. Nach dem Abschluss der Selektion wurde die Expression des LCMV-Rezeptors bei den resistenten Klonen untersucht. Um die Klone, die den LCMV-Rezeptor exprimieren, zu identifizieren, wurde ein Screeningverfahren mit dem MLV(LCMV) lacZ Pseudotyp durchgeführt.

Es wurde festgestellt, dass 70 % der Expressionsklone um 1- 2 Größenordnungen besser transduzierbar waren als native Jurkat. Der Titer variierte zwischen 10 LTU/ml und 10^3 LTU/ml (Tab. 5). Eine hohe Transduktionseffizienz ließ sich bei den selben Klonen in zwei zeitlich getrennten Ansätzen reproduzieren. Das Gleiche galt sowohl für die negativen als auch für die schwach positiven Klone. Als Positivkontrolle wurden Te 671-Zellen mit dem Pseudotyp transduziert. Der Titer war auf dieser Zelllinie 4×10^4 LTU/ml.

Als Negativkontrolle wurden native Jurkat-Zellen verwendet. Der Titer lag bei dieser Zelllinie unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze.

Tabelle 5 : Screening der Zellklone mittels MLV(LCMV)lacZ (NN: nicht nachweisbar).

Native Jurkat (LTU/ml)		NN			
Klone (LTU / ml)		NN	10-50	51-100	101-1000
Anzahl der Klone	Erstes Screening	24	46	13	7
	Zweites Screening	27	46	12	5

3.2.2.1. Versuch zur Identifizierung der cDNA in transduzierten Klone

Als Nächstes erfolgte die Isolierung der genomischen DNA und die Optimierung der PCR-Bedingungen zur Identifikation von cDNA in transduzierten Klonen. Klone, die für den LacZ-Pseudotyp besonders empfänglich waren, wurden mittels PCR analysiert. Trotz wiederholter Versuche unter verschiedenen PCR Bedingungen (Mg²⁺ Konzentration, Annealing Temperatur und Primer) konnte nur ein cDNA-transduzierter Klon, von insgesamt 32 getesteten, identifiziert werden. Ein ca. 1,4 Kb Amplifikat wurde isoliert und charakterisiert.

Für die Amplifikation wurden die von dem Hersteller der retroviralen cDNA-Bank empfohlenen Primer benutzt (Kitamura 1998). Um die Richtigkeit dieser Primer zu überprüfen, wurde ein Abschnitt des in einem pMX Kontrollvektor klonierten EGFP Gens amplifiziert (Abb. 14). Die Expressionsbank war ebenso in einem pMX-Vektor kloniert.

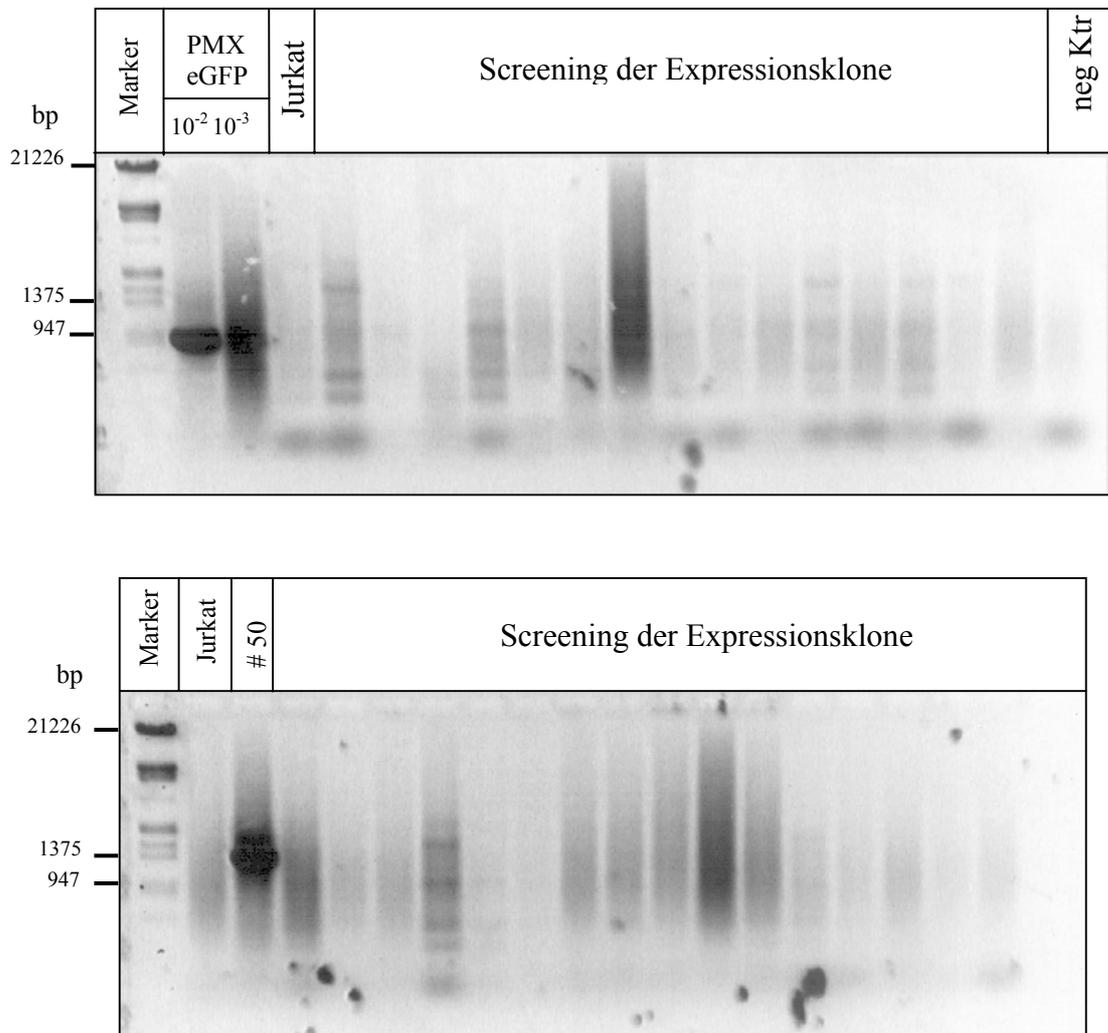


Abbildung 9: Screening der Expressionsklone mittels PCR. Nach der Isolierung der genomischen DNA erfolgte die Austestung der Klone mittels PCR. Die Klone wurden mit den Primer des pMX-Vektors auf ektope cDNAs untersucht. In der ersten Spur oben und unten links wurde mit EcoRI+HindIII verdaute λ -Phagen-DNA als Größenstandard aufgetragen. In der 2. und 3. Spur oben links wurden die Amplifikate von zwei Verdünnungen des pMX EGFP Kontrollvektors aufgetragen (ursprüngliche Konzentration 1 μ g/ μ l). Genomische DNA von nativen Jurkat wurde in der 3. Spur oben und in der 2. unten aufgetragen. Als negative Kontrolle wurde ein PCR-Ansatz ohne DNA in der letzten Spur oben aufgetragen. Alle anderen Spuren sind mit Expressionsklonen belegt. Es konnte nur ein transduzierter Klon (#50) nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigten a) einen unerwartet hohen Hintergrund in Kombination mit b) einer niedrigen Transduktionseffizienz.

- a) Der Hintergrund war um den Faktor 4,5 (90 statt 20 Klone) höher als erwartet. Dies wurde im Rahmen einer normalen Schwankung interpretiert. Das Screeningverfahren wurde dadurch erheblich erschwert.
- b) Die Transduktionseffizienz der Expressionsklone mit der retroviralen cDNA-Bank war mindestens um den Faktor 10 niedriger als für eine optimale Expressionsklonierung notwendig wäre. Es konnte nur ein positiver Klon (von 32) identifiziert werden, d.h. die Transduktionsrate bei den isolierten Klonen betrug 3 %.

Um die Ursache der niedrigen Transduktionseffizienz zu identifizieren, wurde der Titer der verpackten Expressionsbank auf Te 671-Zellen und Jurkat-Zellen mittels Einzelzell PCR gemessen.

3.2.2.2. Bestimmung des Titers der verpackten Expressionsbank mittels Einzelzell-PCR

Der retrovirale pMX-Vektor der cDNA-Bank beinhaltet kein Markergen. Dies führt einerseits zu einer effizienteren Verpackung (höherem Titer), die Titration des retroviralen Überstandes wird jedoch dadurch erheblich erschwert. Um den Titer der verpackten Expressionbank zu bestimmen, wurde eine Einzelzell-PCR eingesetzt. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung des Anteils transduzierter Zellen nach einer retroviralen Transduktion. Die Sensitivität und Spezifität ist über 95 % (Bertram, Hufert et al. 1995).

Die Methode erfolgt in folgenden Arbeitsabschnitten: a) die transduzierten Zellen werden mittels fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierung in verschiedenen Verdünnungen in geeigneten PCR-Gefäßen ausgesät, b) der Anteil positiver Ansätze pro Zellverdünnung wird anschließend mittels "nested PCR" bestimmt, c) für jede Verdünnungsreihe ergibt sich aus der Formel der Poissonsverteilung die Transduktionseffizienz $P = 1/n \times \ln 1/(1-r)$.

P: Transduktionseffizienz pro Zellverdünnung, n: Anzahl der sortierten Zellen pro Hütchen, r: Zahl der positiven Zellen pro Hütchen durch die Zellzahl insgesamt, d) die Transduktionseffizienz für die gesamte Population wird dann als Mittelwert der Zellverdünnungen berechnet. Verdünnungen mit einer Transduktionsrate von 100 % bzw. 0 % werden nicht berücksichtigt (Bertram, Hufert et al. 1995).

Eine Zellpopulation von 4×10^4 Te 671-Zellen und Jurkat-Zellen wurde jeweils mit 250 μ l Überstand der verpackten Expressionsbank transduziert. Das Verhältnis zwischen der Zellzahl und der Menge des Überstandes wurde wie bei der Expressionklonierung gehalten (1ml Überstand für ca. $1,5 \times 10^5$ Zellen). Anschließend konnte der Anteil der transduzierten Zellen pro Zellverdünnung mit der oben beschriebenen Methode ausgerechnet werden. Der Mittelwert der Transduktionseffizienz war für Te 671-Zellen 6,2 % und für Jurkat-Zellen um den Faktor 3 niedriger (2,2 %). Der Titer war auf Te 671-Zellen $1,2 \times 10^4$ /ml und auf Jurkat-Zellen 4×10^3 /ml. Der niedrige Titer führte bei Jurkat zu einer niedrigen Transduktionseffizienz von 2,2 % statt der erwünschten 30 %. Es wurde gezeigt, dass die Expressionsklonierung mit einer sehr niedrigen m_{oi} von 0,08 statt mit der angestrebten m_{oi} von 2 (siehe 3.2.1.3) durchgeführt wurde (Tabelle 6).

Bei den Expressionsklonen war die Transduktionseffizienz nicht höher als bei der gesamten Population von Jurkat. Dies wies darauf hin, dass auch der einzige transduzierte Klon höchstwahrscheinlich eine zufällige Insertion hatte, die nicht eine höhere Infizierbarkeit der Jurkat-Zellen bewirkt. Um diese Hypothese zu beweisen, wurde eine Klonierung, Sequenzierung und anschließend die Reexpression des Amplifikates in Jurkat durchgeführt.

Tabelle 6: Bestimmung des Titers der verpackten Expressionsbank mittels Einzelzell PCR. Für die Berechnung des Titers auf A) Te-671 und B) Jurkat-Zellen wurde die Formel der Poissonsverteilung eingesetzt.

A)

Te 671 Ausgangs-Zellzahl (n)	% pos Zellen (r)	Transduktions- effizienz (%) (P)	Mittelwert (%)	Titer cDNA/ml
30	100	nicht zu berechnen	6,2	$1,2 \times 10^4$
10	25	2,9		
3	25	9,6		

B)

Jurkat Ausgangs-Zellzahl (n)	% pos Zellen (r)	Transduktions- effizienz (%) (P)	Mittelwert (%)	Titer cDNA/ml
30	62,5	3,2	2,2	4×10^3
10	12,5	1,3		
3	0	0		

3.2.2.3. Expression des GEP-Homologs in Jurkat

Das Amplifikat bei der Agarosegelelektrophorese war ca. 1,4 kb groß. Nach der Auftrennung, Isolierung und Aufreinigung des Insertes erfolgte die Klonierung in einem pBluescript Plasmid. Die Sequenzierung zeigte eine Länge von 1350bp und einen offenen Leserahmen von 313 Aminosäuren. Eine Homologie auf Aminosäurebasis von 95% zu dem -COOH Terminus eines humanen „Guanine Exchange Proteins“ (GEP) wurde festgestellt.

Es handelt sich um ein regulatorisches Protein, das zu einer Aktivierung von ADP-Ribosylierungs-Faktoren (ARFs) führt. ARFs sind ca. 20-kDa GTPasen und werden von GEPs durch den Austausch von gebundenen GDP durch GTP aktiviert (Guanin-5'-diphosphat und Guanin-5'-triphosphat). Die aktivierten ARFs regulieren den intrazellulären Proteintransport zwischen Zellmembran, Golgi und ER (Sata, Donaldson et al. 1998).

Um die Hypothese zu prüfen, ob die Expression des GEP-Homologs in Jurkat einen Einfluss auf die Lokalisation bzw. Prozessierung des LCMV-Rezeptors hat, wurde das GEP-Amplifikat in Jurkat expremiert. Für die Expression wurde das Amplifikat in einem retroviralen PM5*neo* Expressionsvektor mit klassischen Spleißdonor (SD) und Spleißakzeptor (SA) Stellen kloniert (Breuer, Steuer et al. 1993). Nach Prüfung der Orientierung mittels Restriktionsanalysen erfolgte die Verpackung in einem Ampho-VSV-Retrovirus und die Transduktion von Jurkat. Die Jurkat-Zellen wurden selektioniert und mit MLV/(LCMV) *lacZ* auf Rezeptor-Expression getestet.

Es wurden keine LacZ expremierenden Jurkat-Zellen festgestellt. Die Integration des GEP-Vektors in der genomischen DNA wurde mittels PCR nachgewiesen. Die mRNA Expression des transduzierten GEP-Fragments in Jurkat-Zellen wurde mittels RT-PCR bestätigt. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Expression des GEP-Fragments in Jurkat keinen Einfluss auf die Infizierbarkeit von Jurkat-Zellen hat.

3.3. Dystroglykan Expression in eukaryotischen Zelllinien

In der Zeit der Durchführung meiner Expressionsklonierung wurde ein zellulärer Rezeptor für LCMV identifiziert (Cao, Henry et al. 1998). Es handelt sich hierbei um das α -Dystroglykan, ein Protein der extrazellulären Matrix, das in vielen Spezies expremiert wird. Die Expression betrifft viele verschiedene unreife und ausdifferenzierte Zelltypen. Die Proteinsequenz von α -Dystroglykan hat bei Mensch, Maus und Kaninchen eine Homologie von 93 bis 94 %. Ein vielfältiges Glykosylierungsmuster wurde beschrieben, das von Zelltyp, Zelldifferenzierung und Organismus abhängig ist. Zur Klärung der Resistenz von Jurkat und anderen hämatopoetischen Zelllinien gegenüber der LCMV-Infektion wurde die Expression von α -Dystroglykan in diesen Zelllinien durch FACS, Western-Blot und RT-PCR analysiert.

3.3.1. Nachweis der α -DG Expression mittels Durchflusszytometrie

Das Dystroglykan-Protein besteht aus α - und β - Einheiten, die nicht kovalent aneinander gebunden sind. Das β -DG hat eine intrazelluläre, transmembrane und extrazelluläre Domäne, während sich das α -DG ausschließlich extrazellulär befindet und die Bindungsstelle für LCMV trägt . Zum Nachweis der α -DG -Expression auf der Membran der Zielzellen wurde ein monoklonaler anti- α -DG-Mausantikörper (VIA4-1) benutzt. Der Antikörper wurde mit einer Kaninchen-Muskelmembranpräparation als Immunogen hergestellt. Laut Hersteller (upstate biotechnology) wird von dem Antikörper α -DG aus verschiedenen Organismen erkannt. Ansätze mit entsprechenden Isotyp-Kontrollen wurden parallel durchgeführt.

Durchflusszytometrische Analysen mit dem VIA4-1 monoklonalen Antikörper zeigten ein sehr starkes Signal bei murinen und humanen Fibroblasten (Te 671, SC 1) und nur ein mäßiges bei den erythroleukämie-Zellen (K562). Die humane T-Zelllinie (Jurkat) lag mit einem sehr schwachen Signal von weniger als 1 % an der Grenze der Sensitivität der Methode. CD34+Stammzellen zeigten keine Bindung des VIA4-1 (Abb. 15). Diese Ergebnisse korrelieren mit den früheren Daten über die LCMV-Infizierbarkeit der getesteten Zelllinien. Die Hypothese, dass die Infektionsblockade von Jurkat auf einer niedrigen Expression des Rezeptors an der Zellmembran beruht, wurde durch die Oberflächenfärbung und die FACS-Analysen gestützt. Des Weiteren wurde das Protein in Zelllysaten mittels Western-Blot untersucht.

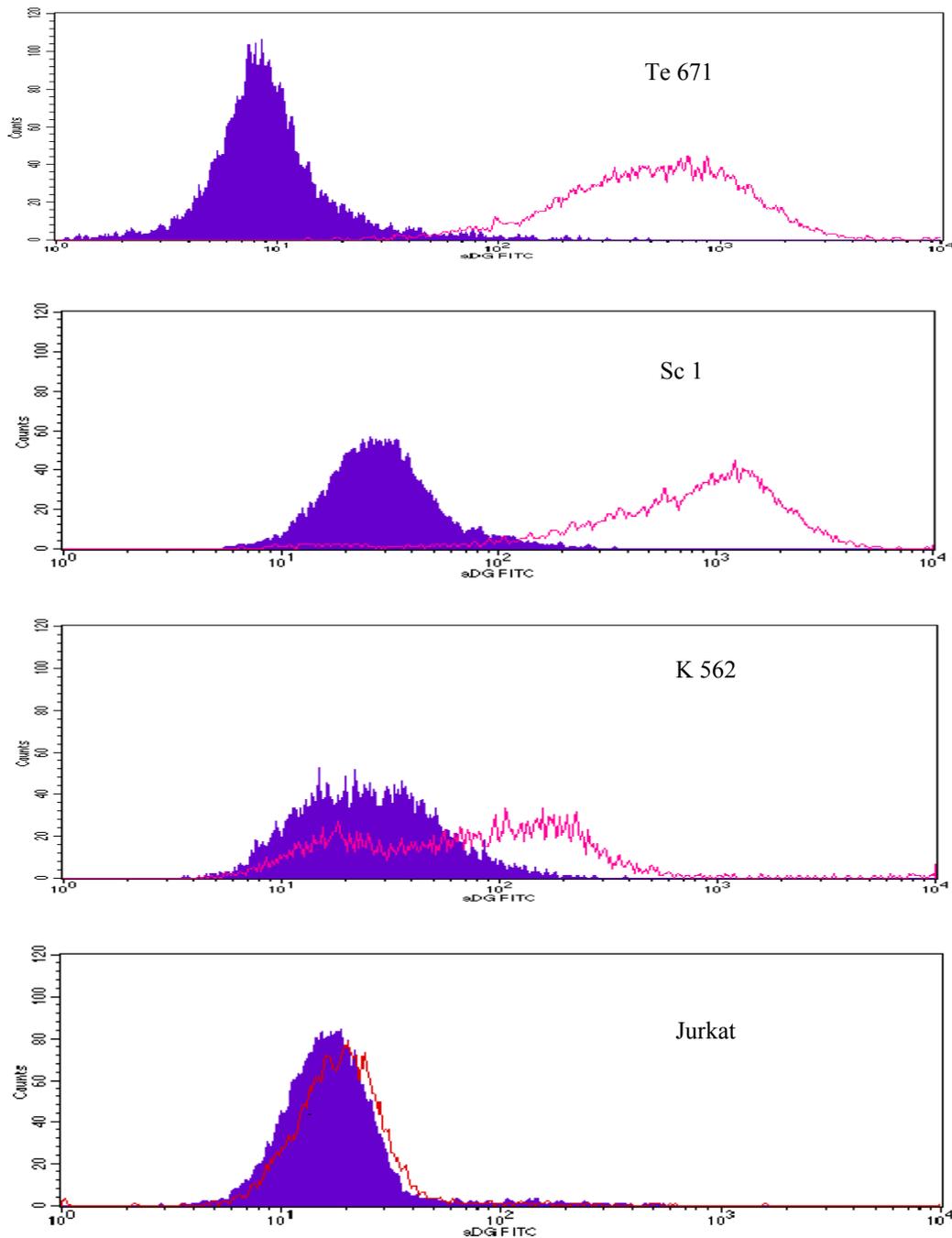


Abbildung 15: FACS-Analyse. Nachweis der α -DG Expression auf der Zelloberfläche verschiedener Zelllinien mittels eines monoklonalen anti- α -DG-Mausantikörpers (VIA4-1) in der Durchflusszytometrie. Es wurden drei Ansätze für jede Zelllinie durchgeführt. Die Ansätze (10^6 Zellen jeweils) wurden a) mit $1 \mu\text{g}$ VIA4-1 Antikörper oder b) mit $1 \mu\text{g}$ unspezifischen Maus IgG Antikörper (Isotyp-Kontrolle) bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Kopplung des FITC-markierten sekundären Antikörpers und die FACS-Analyse. Im schattierten Bereich wurde die Isotypkontrolle dargestellt. Die Ansätze mit dem VIA4-1 wurden durch den nicht schattierten Bereich dargestellt.

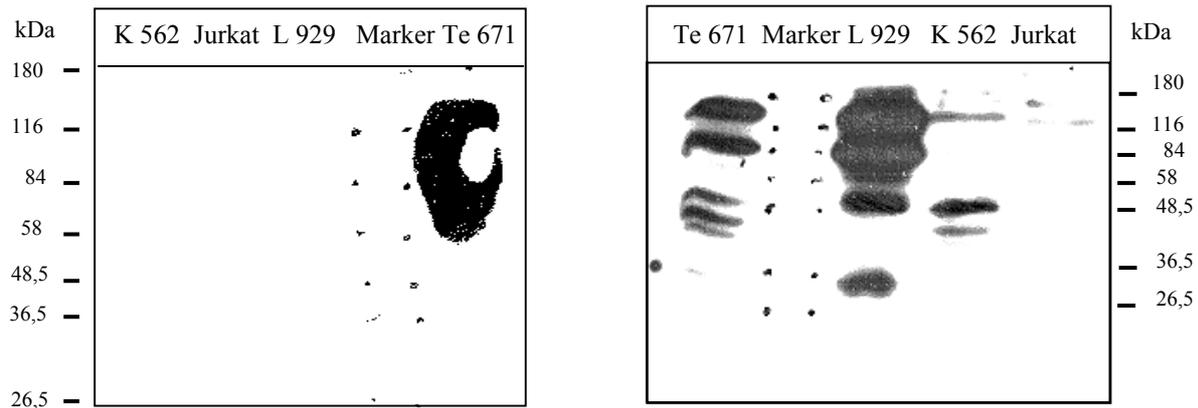
3.3.2. Nachweis des α -DG Proteins mittels Western-Blot

Die FACS-Analyse zeigte wenig bzw. kein α -DG Protein an der Zelloberfläche von Jurkat-Zellen. Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei dieser Zelllinie um eine Transport- bzw. Expressions-Blockade des α -DG Proteins handelt, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Te 671, L 929, K 562 und Jurkat-Zelllinien wurden lysiert und in zwei Ansätzen jeweils mit einem monoklonalen Antikörper (VIA4-1) und einem polyklonalen anti- α -DG-Kaninchenserum getestet. Für die Herstellung des polyklonalen Antikörpers wurde als Immunogen ein rekombinantes (30-315) α -DG-Peptid verwendet (A. Brancaccio).

Bei Te 671-Zellen zeigte sich mit dem monoklonalen (VIA4-1) Antikörper eine sehr breite Bande im Bereich von 84 bis 116 kDa. Dieses breite Muster ist für α -DG charakteristisch und reflektiert eine variable Glykosylierung. Alle andere Zelllinien zeigten keine Bindung des monoklonalen Antikörpers im erwarteten Bereich des α -Dystroglykans. Bei der für LCMV-Infektion empfänglichen L 929 Zelllinie wurde das Dystroglycan nicht erkannt. Möglicherweise handelt es sich bei dieser murinen Zelllinie um ein Glykosylierungsmuster, das die Bindung des VIA4-1 verhindert.

Mit dem polyklonalen Antikörper zeigte sich bei Te 671 und L 929-Zellen ein doppeltes Signal. Die größere Bande befand sich im Bereich von 160 kDa. Die zweite Bande bewegte sich zwischen 84 und 116 kDa. Die zwei Banden bei diesen Zelllinien repräsentiert möglicherweise die prozessierte und nicht prozessierte Form von jeweils α und α/β Dystroglykan (Holt, Crosbie et al. 2000). Das Dystroglykan wird in einer vorläufigen Form von 160 kDa translatiert und anschließend in zwei Untereinheiten α - und β - gespalten. Bei Jurkat und K 562-Zellen zeigte sich nur eine schwache Bindung des polyklonalen Antikörpers im Bereich des α -DG Proteins. Jurkat-Zellen zeigten mit diesem Antikörper keine (bzw. nach längerer Exposition des Films sehr niedrige) α -DG-Expression.

Der Hintergrund durch den polyklonalen Antikörper war eindeutig höher im Vergleich zu VIA4-1. Laut Angabe des Herstellers (persönliche Mitteilung von A. Brancaccio) entsteht die Bande im Bereich von 50 kDa durch unspezifische Antikörperbindung an ein unbekanntes Protein und wurde bislang in den meisten getesteten Zelllinien beobachtet. (Abb. 16).



Monoklonaler VIA4 Antikörper

Anti- α -DG-Serum

Abbildung 16: Western Blot. Nachweis des α -DG-Proteins in Te 671 und L929-Zellen. Zwei Ansätze von Jukat-, K 562- und Te 671-Zellen (jeweils mit 20 μ g Zelllysate) wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde in zwei Teile geschnitten und jeweils mit dem monoklonalen VIA4-1 bzw. polyklonalen Antikörpers inkubiert. Nach der Inkubation mit Peroxidase gekoppeltem sekundären Antikörper und der anschließenden Behandlung mit ECL-Lösung erfolgte die Exposition für 5 s und die Entwicklung des lichtempfindlichen Films.

3.3.3. Quantifizierung der α -DG-mRNA-Expression in Jurkat

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Resistenz von Jurkat gegenüber der LCMV Infektion auf einem Mangel bzw. einer niedrigen Expression des Rezeptors beruht. Die Expression eines Proteins wird auf verschiedenen Ebenen reguliert, wie zum Beispiel Transkription des Gens, Prozessierung und Stabilität der mRNA, Transport der mRNA vom Kern zum Zytoplasma, Translation und Reifung des Proteins und Proteintransport. Um eine mögliche Ursache dieser Blockade auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hiermit wurde versucht, die α -DG-mRNA-Expression in Jurkat-Zellen zu quantifizieren. Bei dieser Methode wird die Umschreibung einer RNA-Matrize mittels reverse Transkriptase und die Polymerase-Ketten-Reaktion kombiniert. Die Methode verfügt über eine sehr hohe Sensitivität und somit können auch mRNA-Kopien amplifiziert werden, die in einer cDNA relativ selten repräsentiert sind. Für die Quantifizierung wurden die cDNA-Kopien seriell verdünnt und mittels PCR amplifiziert.

Die α -Dystroglykan-RT-PCR führte bei der Jurkat-cDNA bereits nach dem ersten Verdünnungsschritt (1:5) nicht mehr zu einem Amplifikat, da die Nachweisbarkeitgrenze der Methode erreicht wurde. Als Alternative wurden daher die PCR-Produkte in einer zweiten PCR-Runde (nested PCR) analysiert.

Das Dystroglykan-Protein besteht aus zwei nicht kovalent aneinander gebundenen Untereinheiten. Beide Untereinheiten des Dystroglykans werden von einer gemeinsamen 5,8 kb mRNA translatiert. Das humane Dystroglykan-Gen (DAG-1) besteht aus zwei gut charakterisierten Exons (jeweils 285 und 2400 b.p.) und einem langen Intron, das bislang nicht komplett sequenziert ist. Als Erstes wurde die mRNA aus den Zelllinien Te 671 und Jurkat isoliert. Anschließend erfolgte die Umschreibung der mRNA in cDNA und die Amplifizierung eines Abschnittes der α -DG-cDNA-Matrize mittels PCR. Um Verunreinigungen durch genomische DNA zu vermeiden, wurde ein 543 bp Abschnitt des Aminoterminus der α -DG-cDNA amplifiziert, der das Intron beinhaltet. Parallel wurde ein 618 bp Abschnitt des β -Aktin-Gens als Kontrolle vermehrt. Die humanen Fibroblasten Te-671 zeigten eine starke α -DG Expression. Bei Jurkat-Zellen war die Intensität des Amplifikates wesentlich schwächer (Abb. 17).

Um die Amplifikatmenge aus der PCR zu quantifizieren, wurden die PCR-Produkte isoliert, gereinigt und seriell verdünnt. Anschließend erfolgte eine zweite PCR-Runde mit 1 μ l von jedem Verdünnungsansatz. Für die zweite „nested“ PCR-Runde wurden neue Primer angesetzt. Die mit den neuen Primer erwartete Größe der Amplifikate betrug 416 (α -DG) und 239 (β -Aktin) bp. Das Verhältnis des α -DG zum β -Aktin PCR-Produkt bei Jurkat und Te-671 wurde gemessen. Jurkat-Zellen zeigten eine um den Faktor 100 niedrigere Konzentration an α -DG-Amplifikat im Vergleich zu Te 671-Zellen (Abb. 18 und Tab. 7). Die Ergebnisse konnten in zwei zeitlich getrennten Ansätzen reproduziert werden.

Tabelle 7: Bestimmung des α -DG / β -Aktin Verhältnisses in Jurkat- und Te 671-Zellen.

	aDG	β -Aktin	a-DG / β -Aktin
Jurkat	10e6	10e9	10e-3
Te 671	10e9	10e10	10e-1
Jurkat/Te 671	10e-3	10e-1	10e-2

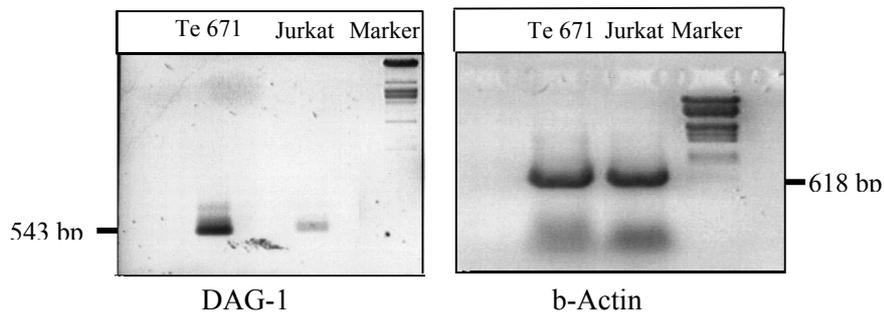


Abbildung 17 : Expression von α -DG-mRNA in Jurkat- und Te 671-Zellen. Zehn μ l der cDNA wurden für jeden PCR-Ansatz verwendet. Die RT-PCR-Produkte von DAG-1 und β -Aktin wurden in einem 2% Agarosegel über 3 h langsam aufgetrennt. Die Produkte wurden anschließend isoliert, gereinigt, in 100 μ l Endvolumen eluiert, seriell verdünnt und mittels einer nested PCR reamplifiziert. In beiden Spuren rechts wurde mit EcoRI und HindIII verdaute λ -Phage DNA aufgetragen.

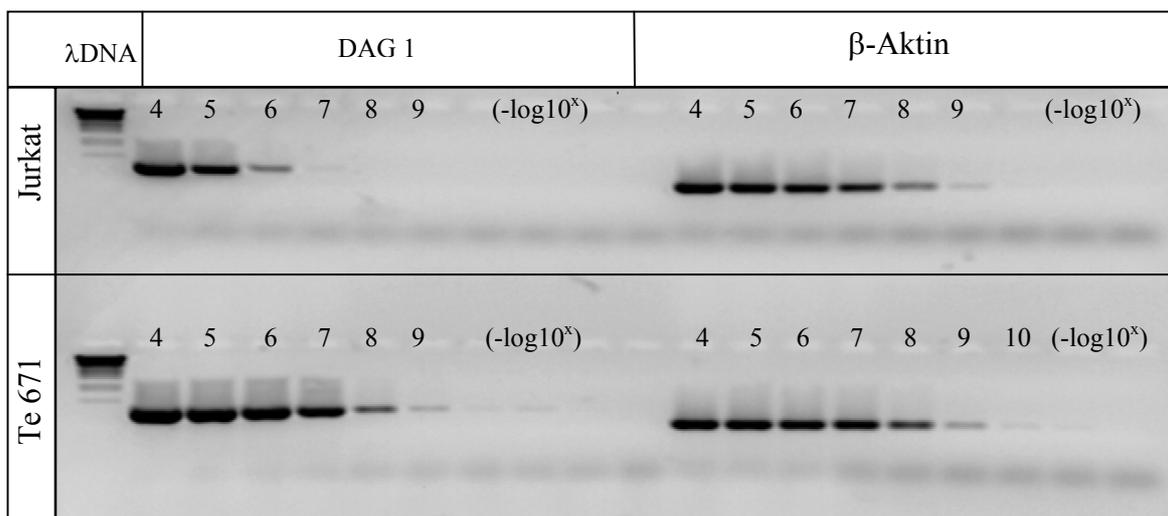


Abbildung 18 : Semiquantitative RT-PCR. Bestimmung der Expression von α -DG-mRNA in Jurkat-Zellen. Mit 10 μ l der oben beschriebenen isolierten und gereinigten Amplifikate wurde eine zehner Verdünnungsreihe angesetzt. Für die zweite PCR-Runde wurden 1 μ l von jeder Verdünnung und “nested” Primer benutzt. Nach 27 Amplifikationszyklen wurden 20 μ l von jedem Verdünnungsansatz in der Agarosegelelektrophorese aufgetragen. Das Verhältnis zwischen α -DG- und β -Aktin-RT-PCR-Produkt bei Jurkat- und Te 671-Zellen wurde gemessen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Resistenz von humanen T-Lymphozyten gegenüber der LCMV Infektion mit einer niedrigen Expression des LCMV Rezeptors einhergeht. Die LCMV Infektion beginnt mit der Bindung des LCMV-GP1 an den Protein-Rezeptor in der zellulären Membran, dem α -Dystroglykan. (Burns and Buchmeier 1991; Borrow and Oldstone 1992; Cao, Henry et al. 1998). Die Bindung löst eine Reihe von Ereignissen aus, um den Eintritt des Virus in die Zielzelle zu ermöglichen. Dieser Prozess erfolgt durch Endozytose und führt nach einer pH abhängigen Fusion zur Freisetzung des Nukleokapsids im Zytoplasma, wo die Transkription und die Replikation des LCMV-Genoms stattfindet (Borrow and Oldstone 1994; Di Simone, Zandonatti et al. 1994; Glushakova and Lukashevich 1989).

Der breite Tropismus vom LCMV korreliert mit der verbreiteten Expression des Rezeptors; Henry and Campbell 1996). Das Dystroglykan ist ein Protein des Dystrophin Glykoprotein Komplexes (DGC), das das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbindet (Suzuki, Yoshida et al. 1994). Störungen dieses Proteinkomplexes sind für die Erkrankung muskuläre Dystrophie verantwortlich (Campbell 1995). Nach der initialen Isolierung aus Muskelmembran wurde die Expression von Dystroglykan in den meisten untersuchten Geweben und Zell-Typen nachgewiesen (Durbeej, Henry et al. 1998). Die Funktion dieses Proteins ist gewebespezifisch und im Detail wenig bekannt (Hemler 1999). Wichtig ist das Dystroglykan für die Stabilisierung der Muskelmembran, die Synaptogenese, die Organisation der extrazellulären Matrix (ECM), die Adhäsion von Epithelial-Zellen an Basalmembranen und als Komponente der Reichert's-Membran für die Embryogenese (Jacobson, Montanaro et al. 1998; Montanaro, Gee et al. 1998; Williamson, Henry et al. 1997; Shimizu, Hosokawa et al. 1999). Arenaviren (Lassa Fieber Virus, Oliveros und Mobala) sowie das Mykobakterium *leprae* benutzen das Dystroglycan als Bindungsrezeptor (Rambukkana, Yamada et al. 1998). Die hohe Konservierung des α -Dystroglykans von Mensch, Maus und Kaninchen erklärt das breite Wirts-Spektrum des LCMV (Ibraghimov-Beskrovnaya, Milatovich et al. 1993; Ibraghimov-Beskrovnaya, Ervasti et al. 1992; Gorecki, Derry et al. 1994). Trotz des breiten Tropismus und des Wirts-Spektrums von LCMV sind Lymphozyten und ausdifferenzierte Neuronen von LCMV-empfindlichen Organismen schlecht infizierbar (Borrow, Tishon et al. 1991; de la Torre, Rall et al. 1993).

In diesem Projekt wurde versucht die Ursache der Resistenz von Jurkat-Zellen gegenüber der LCMV-Infektion zu klären und in weiteren Schritten zu überwinden. Zu diesem Zweck wurde der LCMV-Tropismus ausführlich analysiert und die Klonierung des LCMV-Rezeptors in Jurkat-Zellen angestrebt.

4.1. Charakterisierung des LCMV-Tropismus

Zuerst wurde die Kinetik der LCMV Replikation in verschiedenen Zelllinien analysiert. Für die Replikation eines Virus in einer Zelle sind nach dem Eintritt die folgenden Schritte erforderlich: a) Entlassung des Nukleokapsids in das Zytoplasma der Zelle, b) Synthese des viralen Genoms und Expression der viralen Proteine, c) Verpackung, Reifung und Freisetzung der neuen Partikel (Roizman 1990). Die Ausbreitung des Virus in einer Zellkultur findet durch wiederholte Replikationszyklen statt. LCMV replizierte in den meisten der getesteten Zelllinien. Humane Fibroblasten, epitheliale Zellen, Hepatozyten, Erythroleukämie-Zellen und murine Fibroblasten waren gut infizierbar. Der Replikationszyklus beginnt nach einer synchronen LCMV-Infektion wie bei den meisten Viren, mit einer „eclipse“ Phase (Synthese der viralen Proteine), verläuft durch eine Reifungsphase (logarithmischer Anstieg der Virusproduktion) und erreicht schließlich eine Inaktivierungsphase während derer defekte, nicht infektiöse Partikel entstehen (Southern 1996). Die Dauer eines Replikationszyklus ist vom Virus und zum Teil vom Zelltyp abhängig.

Ein entscheidender Faktor für die Kinetik der Virusproduktion war die Multiplizität der Infektion (moi). In gut infizierbaren Zelllinien wurde nach einer Infektion mit einer ursprünglich niedrigen moi bereits am 2. Tag eine maximale Virusproduktion festgestellt. Dies geschieht durch die Freisetzung von LCMV-Partikeln nach der Ausbreitung der Infektion innerhalb der gesamten Zellpopulation. Die Untersuchungen der Kinetik zeigten, dass mindestens der 2. LCMV-Replikationszyklus in empfänglichen eukaryotischen Zellen am 2. Tag der Infektion abgeschlossen sein muß (>90% der Zellen sind infiziert). Es werden 100 bis 1000 „Plaque Forming Units“ pro Zelle freigesetzt. Die Virusproduktion in diesen Zelllinien erreicht dann ein Plateau und läßt schließlich am 3. Tag nach. Dieser Rückgang der Virusproduktion wurde bei der Infektion mit einer moi von 1 deutlicher beobachtet. Die Ursache dieses Phänomens ist eine Wirts-Zelle-abhängige homologe Interferenz (Bruns, Gessner et al. 1988). Es wird postuliert, dass die Hyperexpression der LCMV-Nukleoproteine die Expression der LCMV-Glykoproteine hemmt (Bruns, Kratzberg et al. 1990).

Dadurch entstehen defekte, nicht infektiöse Partikel, die möglicherweise die Infektiosität des Standard-Virus negativ beeinflussen (Popescu, Schaefer et al. 1976). Solche Partikel sind von persistent LCMV-infizierten L 929-Zellen isoliert und charakterisiert worden (Stocker, Martinez Peralta et al. 1994). Der genaue Mechanismus der Hemmung der LCMV-GP-Expression in infizierten Zellen, der vermutlich *in vivo* eine wichtige Rolle für den Übergang einer akuten in eine persistente LCMV-Infektion spielt, ist bislang nicht geklärt (Oldstone and Buchmeier 1982).

4.2. Infektionsblock auf Rezeptorebene

Mit den Tropismusuntersuchungen wurden einige gegenüber der LCMV-Infektion resistente humane hämatopoetische Zelllinien (Jurkat, CD34+ Stammzellen) identifiziert. Diese Ergebnisse korrelierten mit der Infizierbarkeit von murinen hämatopoetischen Zelllinien. Nur um 2-4 % muriner CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten binden und replizieren das LCMV (Tishon, Southern et al. 1988; Borrow, Tishon et al. 1991). Murine primäre Makrophagen und B-Lymphozyten sind nur minimal für LCMV empfänglich (um 1% bei einer moi von 5) (King, de Fries et al. 1990). Primäre murine hämatopoetische Vorläufer-Zellen der erythroiden bzw. myeloiden Reihe sind mit LCMV schlecht infizierbar (<0,5 %) (Binder, Fehr et al. 1997). Der Infektionsblock von Jurkat-Zellen wurde auf Replikations- und Bindungsebene analysiert.

4.2.1. LCMV-Protein-Expression in Jurkat-Zellen

Die Hypothese, dass bei resistenten Zelllinien die Expression der viralen Proteine bzw. die Verpackung und Freisetzung der Partikel blockiert ist, wurde zuerst analysiert. Ein solcher Replikationsblock ist durch eine Transkriptionshemmung in ausdifferenzierten Neuronen beschrieben (de la Torre, Rall et al. 1993). Alle empfänglichen Zelllinien waren in der Immunfluoreszenz über 90% positiv (K 562-Zellen nur um 20 %). Jurkat-Zellen waren nach einer Infektion mit moi von 1 nur um 0,01% infiziert und somit weitestgehend resistent. Unklar war, ob dieser Anteil infizierbarer Jurkat-Zellen eine bestimmte Subpopulation von besonders empfänglichen Lymphozyten darstellt, wie für die Maus beschrieben (Oldstone, Salvato et al. 1988). Diese letztere Möglichkeit wurde durch eine Zellklonierung und die Testung der Klone ausgeschlossen. Sämtliche Klone waren mit dieser moi weniger als 0,01% infizierbar.

Nach einer Infektion der Jurkat-Zellen mit einer *moi* von 1000 wurde ein Anteil infizierter Zellen von 25% gemessen. Unter diesen Bedingungen werden von Jurkat-Zellen ebenso viele infektiöse Viruspartikel wie von K562-zellen produziert. Dies ist ein Hinweis, dass die LCMV-Replikation in Jurkat-Zellen nicht gehemmt ist und der Infektionsblock auf Rezeptorebene liegt, im Sinne einer niedrigen Rezeptorexpression bzw. Expression eines Rezeptors mit niedriger Affinität für das LCMV-GP1. Derzeit war der LCMV-Rezeptor allerdings noch nicht bekannt und somit eine Analyse seiner Expression nur indirekt möglich (Bindungsstudien, Transduktion mit dem Pseudotyp).

4.2.2. Transduktionsversuche mit dem MLV(LCMV) Pseudotyp, Bindungsanalysen

Weitere Hinweise auf einen Mangel an funktionellem Rezeptor bei Jurkat-Zellen ergaben sich durch die Testung der Zelllinien mit dem MLV(LCMV)-Pseudotyp. Die Infizierbarkeit der verschiedenen Zelllinien mit dem MLV (LCMV GP) Pseudotyp korrelierte eng mit der Infizierbarkeit durch das LCM Wildvirus (Tab. 8). Die Transduktionsversuche mit dem Pseudotyp waren jedoch durch den Überschuss von LCM- Wildvirus im Überstand und eine mögliche daraus für die Bindungsstellen resultierende Interferenz erschwert. Dieser Interferenzmechanismus würde vorwiegend auf Zelllinien wie Jurkat- und andere hämatopoetische Zellen einwirken, die eventuell wenig Rezeptor exprimieren. Derzeit war die Herstellung eines wildtypfreien Pseudotyp-Überstandes nicht praktikabel, da die Expression des LCMV-Hüllproteins durch eine „missense“ Mutation der Standard LCMV-GP-cDNA blockiert war. Diese Mutation führte zu einem Austausch (Leucin gegen Prolin) an der Position 110 der Aminosäuresequenz, der für die Stabilität des LCMV-GP nach der Translation entscheidend ist. Nach der Einführung der richtigen Aminosäure (P110L) in die LCMV-GP-cDNA konnte eine hohe Expression des Hüllproteins erreicht werden (Beyer, von Laer J. Virol. 2000 in press). Derzeit war dies noch nicht bekannt und deswegen wurde die Herstellung des Pseudotyps durch Infektion der Verpackungslinie mit LCMV durchgeführt (Miletic, Bruns et al. 1999).

Die Bindung des Virus an verschiedene Zelllinien wurde als Maß für die Expression des Rezeptors gemessen. An der Zellmembran von Jurkat und CD34+ konnte kein gebundenes Virus nachgewiesen werden. Die Bindung des LCMV an eine empfängliche L 929 Zelllinie war jedoch in wiederholten Versuchen kaum nachweisbar. Somit kann eine negative-Zelllinie bei den Bindungsanalysen trotzdem einen funktionellen Rezeptor tragen.

Daher wurde die die Klonierung des LCMV Rezeptors mittels Expressions-Klonierung in Jurkat-Zellen initial angestrebt und nach der Identifizierung des Rezeptors von Cao et al. 1998 die Expression des Rezeptors mittels Western-Blot und RT-PCR auf dieser Zelllinie analysiert.

4.3. Expressionsklonierung

Ein Versuch, den LCMV-Rezeptor in Jurkat-Zellen durch Expressionsklonierung zu identifizieren und somit deren Resistenz zu überwinden, war nicht erfolgreich. Um neue funktionelle Proteine zu identifizieren, ist „Expression cloning“ ein effizientes Werkzeug. Die ersten Klonierungen von Proteinen durch ihre Funktion wurden von Harada, Takahashi et al. 1987 sowie Seed und Aruffo 1987 beschrieben. Eine große Zahl von cDNAs sind seitdem in eukaryotischen Zellen mit dieser Methode isoliert (Seed 1995). Verschiedene Membran-Proteine wie CD2, CD63 und Liganden wie GM-CSF, CD27, Fas sowie Rezeptoren für Erythropoietin, GM-CSF, γ - Interferon, Interleukin, TGF, Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Transporter, Virusrezeptoren z. B. Hepatitis A, xenotropic und polytropic MLV, HSV, HIV-Korezeptor wurden durch diese Methode kloniert (Kitamura, Sato et al. 1991; Whitehead, Kirk et al. 1995; Taylor, Nouri et al. 1999; Ashida and Hamada 1997; Berson, Long et al. 1996; Montgomery, Warner et al. 1996; Kaplan, Totsuka et al. 1996; Warner, Geraghty et al. 1998).

Voraussetzungen für die Klonierung einer cDNA, die für ein bestimmtes Protein kodiert, sind: a) die Identifikation einer Zelllinie, die das Protein nicht exprimiert b) die effiziente Expression der cDNA-Bank in dieser Zelllinie und c) eine Selektions- bzw. Screening-Strategie, um die Expression bzw. Funktion dieses Proteins nachzuweisen (Simonsen and Lodish 1994). Als Besonders effizient ist das retrovirale Expressionssystem. Dieses System bietet durch die Integration der cDNA ins Wirts-Zelle-Genom eine stabile Expression der cDNA. Außerdem infizieren Retroviren ein breites Spektrum von Zelllinien, die mit konventionellen Methoden nicht effizient transfizierbar sind. Im Vergleich zu stabilen retroviralen cDNA-Expressionssystemen ist der Titer nach einer transienten Verpackung wesentlich höher (Wong, Chen et al. 1994; Rayner and Gonda 1994). Um die gesamte Komplexität einer menschlichen bzw. murinen cDNA-Bank in einem retroviralen Expressionssystem vollständig zu repräsentieren, ist ein Virustiter von mindestens 10^5 /ml erforderlich.

Aus diesem Grunde wurde für die Expressionsklonierung eine transiente Verpackung ausgewählt (Kitamura, Onishi et al. 1995). Die Verpackung erfolgte in einem amphotropen VSV-G Retrovirus. Es wurde eine effiziente Transduktion (30%) der Jurkat-Zellen angestrebt.

Die Expressionklonierung könnte aus den folgenden Gründen fehlgeschlagen sein: Die Voraussetzungen von einem Titer höher als 10^5 Viren / ml und einer Transduktionseffizienz von 10 bis 30 % wurden in unserem Versuch nicht erfüllt. Der Titer ($1,2 \times 10^4$ /ml) und daher die Transduktionseffizienz (2,2%) waren deutlich niedriger als geplant. Eine Titration vor bzw. nach der Verpackung war nicht möglich, da die retrovirale cDNA-Bank kein Markergen beinhaltete. Um einen hohen Titer zu erreichen wurde die retrovirale cDNA-Bank in einem monocistronischen Vektor kloniert (Kitamura 1998). Bicistronische Vektoren werden in der Regel wegen Promotoreninterferenz, bzw. struktureller Komplikationen (große DNA-Menge), schlechter verpackt (Miller, Trauber et al. 1986). Um eine indirekte Titration zu ermöglichen, wurde ein EGFP Kontrollvektor mit analogen Bedingungen transient verpackt. Der mit Einzelzell-PCR gemessene Titer der verpackten retroviralen cDNA war jedoch um den Faktor 12 niedriger als der Titer des Kontrollvektors. Außerdem war der Hintergrund (: nativ nicht transduzierte LCMV empfängliche Jurkat-Klone) um den Faktor 4,5 höher als erwartet (90 statt 20 Klone). Die Bestimmung des Hintergrunds erfolgte durch die Immunfluoreszenz-Analyse von infizierten Jurkat-Zellen. Die Sensitivität dieser Methode ist sehr hoch jedoch bei einem solchen niedrigen Anteil von infizierten Zellen ($1:10^4$) wurde die Sensitivitätsgrenze erreicht.

4.4. Expression des α -Dystroglykans

Die Charakterisierung des LCMV-Rezeptors eröffnete neue Möglichkeiten für die Klärung der Resistenz von Jurkat und anderen hämatopoetischen Zelllinien. Die Expression des α -Dystroglykans auf Protein- und mRNA-Ebene wurde analysiert. Weder als intaktes Protein auf der Zelloberfläche (FACS) noch unter reduzierenden Bedingungen (Western-Blot) war der LCMV-Rezeptor in Jurkat-Zellen nachweisbar. Mit der RT-PCR wurde gezeigt, dass die niedrige Proteinexpression in Jurkat-Zellen mit einer niedrigen mRNA-Expression einhergeht. Bei allen getesteten Zelllinien wurde eine signifikante Korrelation zwischen LCMV-Infizierbarkeit und α -Dystroglykan-Expression festgestellt (Tabelle 8). So sind Te 671 humane Fibroblasten mit LCMV sehr gut infizierbar, da sie einen funktionellen Rezeptor stark exprimieren.

Die Ursache der mäßigen Infizierbarkeit von K 562 Erythroleukämie-Zellen wurde durch die geringe α -DG-Proteinexpression geklärt. K 562-Zellen zeigten im Vergleich zu murinen (SC-1) und humanen (Te 671) Fibroblasten in der Durchflusszytometrie ein schwächeres Signal. Im Western-Blot war nur mit dem polyklonalen Antikörper eine geringe Expression des α -DG-Proteins nachweisbar. Humane hämatopoetische CD 34+ Stammzellen zeigten mittels FACS-Analyse keine α -DG-Protein-Expression.

Tabelle 8 Korrelation zwischen LCMV-Infizierbarkeit und α -Dystroglykan-Expression.

(DG: α -Dystroglykan, NG: nicht gemacht).

Zelllinie	Tropismus LCMV und MLV(LCMV)				Dystroglykan (DG) Expression		
	Replikation	Infizierbarkeit	Bindung	Pseudotyp	DG FACS	DG Blot	DG mRNA
Te 671	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K 562	++	++	+	++	++	±	NG
Jurkat	+	± (moi>1000)	keine	keine	±(<1%)	keine	±
CD 34 +	keine	keine	keine	keine	keine	NG	NG

Die Bindung des LCMV an L 929-Zellen war nicht nachweisbar obwohl dieser Zelllinie sehr gut infizierbar ist. Dieses Phänomen wurde nicht weiter untersucht, da eine starke α -DG Expression in dieser Zelllinie mit einem polyklonalen Antikörper im Western-Blot nachgewiesen wurde. Interessanterweise konnte der monoklonale Antikörper (VIA4-1) im Western-Blot das α -Dystroglykan bei diesen murinen Fibroblasten nicht erkennen. Bei anderen murinen Fibroblasten (SC-1) wurde jedoch eine sehr starkes Signal mit diesem Antikörper beobachtet. Die Erklärung dafür könnte eine Blockade des Bindungsepitops für VIA4-1 durch Glykosylierung sein, da das Dystroglykan ein stark und in verschiedenen Zelltypen bzw. Entwicklungsstadien eines Organismus unterschiedlich glykosyliertes Protein ist (Durbeej and Campbell 1999).

Auf welcher Ebene die Regulation der α -DG mRNA-Expression in Jurkat und anderen Zelllinien stattfindet, ist nicht bekannt. Bislang ist nur das hoch konservierte Dystroglykogen in Säugetieren identifiziert. Dieses Gen kodiert für eine mRNA, die zu einem unreifen Vorläufer-Protein translatiert wird. Ein Hinweis für ein alternatives Spleißen des DG ergab sich bisher nicht (Ibraghimov-Beskrovnya, Milatovich et al. 1993). Durch Glykosylierung und Spaltung erfolgt die Prozessierung des Vorläufer-Proteins zu der reifen Form, die aus zwei nicht kovalent gebunden Untereinheiten besteht. Die N-Glykosylierung ist für die Spaltung des Dystroglykans in α - und β - Untereinheit nicht erforderlich. Die Untersuchung der Biosynthese und der Prozessierung des $\alpha\beta$ -DG in einem heterologen Expressionssystem zeigte eine deutliche Auswirkung der N-Glykosylierung auf die Proteinlokalisierung (Holt, Crosbie et al. 2000).

Um zu beweisen, dass die niedrige α -DG-mRNA-Expression die einzige Ursache der Resistenz von Jurkat und möglicherweise anderer hämatopoetischen Zelllinien ist, wäre die Reexpression der α -DG-cDNA in Jurkat-Zellen notwendig. Dies ist uns im Rahmen dieses Projektes leider nicht gelungen. Für diesen Zweck wurde ein Expressionssystem mit einem episomalen Vektor verwendet. Die Transduktionseffizienz von Jurkat-Zellen mit solchen Vektoren ist jedoch sehr niedrig. Die Umklonierung in einen retroviralen Vektor und die stabile Expression in Jurkat ist ein wichtiger Schritt, um mögliche zusätzliche Ursachen der Resistenz von Jurkat auszuschließen. So könnten zum Beispiel die Glykosylierung, die Prozessierung und andere posttranslatorische Modifikationen (Aktivierung bzw. Deaktivierung) des Rezeptors einen Einfluss auf die Bindung von LCMV haben.

Das variable Glykosylierungsmuster des α -DG in LCMV-empfindlichen Zellen hat keinen bisher bekannten direkten Einfluß auf die Bindung von LCMV (Borrow and Oldstone 1992). Dies wurde durch die Behandlung von Membran-Präparationen mit verschiedenen Glykosidasen und anschließend mittels Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) gezeigt. Für den Transport des reifen α -DG-Proteins auf die Zellmembran ist die N-Glykosylierung notwendig.

Ob dieser für die Expression eines funktionellen Rezeptors notwendiger Schritt in Jurkat-Zellen blockiert ist, sollte durch die Reexpression der α -DG-cDNA in dieser Zelllinie zukünftig untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Das Lymphozytäre Choriomeningitisvirus (LCMV) infiziert ein sehr breites Spektrum von Zelllinien verschiedener Spezies über die Bindung seines Hüllproteins GP-1 an den Rezeptor alpha-Dystroglykan auf der Zelloberfläche. Die Hüllproteine von LCMV GP-1/-2 werden sehr effizient in die Virushülle vom murinen Leukämieviren (MLV) eingebaut. Es entstehen sogenannte MLV(LCMV GP)-Pseudotypen. Virale Vektoren, die sich von MLV ableiten, und ein LCMV GP Hüllprotein tragen haben mehrere Vorteile gegenüber herkömmlichen retroviralen Vektoren. Diese sind Stabilität, hohe Titer und keine Zelltoxizität für Verpackungslinien und Zielzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zelltropismus dieser MLV(LCMV GP) Pseudotypen und des LCM Wildvirus sowie die Expression des LCMV-Rezeptors auf verschiedenen Zielzellen näher analysiert. Für die Gentherapie wichtige humane Zelltypen, wie T-Lymphozyten (Jurkat) und primäre CD34+ Stammzellen waren sowohl gegenüber der Infektion mit LCMV als auch für die Transduktion mit dem MLV(LCMV)-Pseudotyp resistent. Andere Zellen wie die humane hämatopoetische Vorläuferzelllinie K562 hatten eine mittlere Infizierbarkeit, während Fibroblasten und epitheliale Zellen hochgradig empfänglich für LCMV waren. Da die Infizierbarkeit der verschiedenen Zelllinien mit dem MLV (LCMV GP) Pseudotyp eng mit der Infizierbarkeit durch das LCM Wildvirus korrelierte, nahmen wir an, dass der Rezeptor vermittelte Eintritt in die Zielzelle ein limitierender Faktor in einigen Zellarten ist. Daher wurde die Expression des Rezeptors mittels Virus-Bindungsanalysen, Westernblot und RT-PCR auf den verschiedenen Zelllinien untersucht. Es konnte ein enger Zusammenhang zwischen der Infizierbarkeit der untersuchten Zelllinien und der Expression des Rezeptors gefunden werden. Für Jurkat konnte insbesondere gezeigt werden, dass auch die LCMV Rezeptor mRNA deutlich vermindert ist.

Das zweite Ziel der Promotion war die Klonierung des LCMV Rezeptors mittels Expressions-Klonierung in Jurkat-Zellen, die weitestgehend gegenüber der LCMV-Infektion resistent sind. Dieses gelang im ersten Versuch wegen dem hohen Hintergrund (0,05 % der Jurkat waren infizierbar) und dem niedrigen Titer der retroviralen cDNA Bank nicht. Da im Verlauf dieses Versuches der Rezeptor von LCMV von einer anderen Gruppe kloniert werden konnte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

6. Literaturverzeichnis

- Ashida, M. and C. Hamada (1997). "Molecular cloning of the hepatitis A virus receptor from a simian cell line." J Gen Virol **78**(Pt 7): 1565-9.
- Avanzi, G. C., P. Porcu, et al. (1991). "Interleukin 3-dependent proliferation of the human Mo-7e cell line is supported by discrete activation of late G1 genes." Cancer Res **51**(6): 1741-3.
- Baum, C., S. Hegewisch-Becker, et al. (1995). "Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells." J Virol **69**(12): 7541-7.
- Berson, J. F., D. Long, et al. (1996). "A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T- cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains." J Virol **70**(9): 6288-95.
- Bertram, S., F. T. Hufert, et al. (1995). "Detection of DNA in single cells using an automated cell deposition unit and PCR." Biotechniques **19**(4): 616-20.
- Beyer Winfried, H. M., Wolfram Ostertag, Dorothee von Laer (2000). "Recombinant Expression of the Lymphocytic Choriomeningitis Virus (WE) Glycoproteins: A Single Amino Acid Makes the Difference." J. Virology.
- Binder, D., J. Fehr, et al. (1997). "Virus-induced transient bone marrow aplasia: major role of interferon- alpha/beta during acute infection with the noncytopathic lymphocytic choriomeningitis virus." J Exp Med **185**(3): 517-30.
- Blau, H. and P. Khavari (1997). "Gene therapy: progress, problems, prospects [news]." Nat Med **3**(6): 612-3.
- Boettiger, D. and T. M. Dexter (1984). "Long-term marrow cultures in the analysis of viral leukaemogenesis." Clin Haematol **13**(2): 349-70.
- Borrow, P., C. F. Evans, et al. (1995). "Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression." J Virol **69**(2): 1059-70.
- Borrow, P. and M. B. Oldstone (1992). "Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus." J Virol **66**(12): 7270-81.
- Borrow, P. and M. B. Oldstone (1994). "Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells." Virology **198**(1): 1-9.

- Borrow, P., A. Tishon, et al. (1991). "Infection of lymphocytes by a virus that aborts cytotoxic T lymphocyte activity and establishes persistent infection." J Exp Med **174**(1): 203-12.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Breuer, B., B. Steuer, et al. (1993). "Genomic rearrangements of retroviral vectors carrying two genes in F9 EC cells." Virus Genes **7**(1): 53-65.
- Bruns, M., J. Cihak, et al. (1983). "Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization." Virology **130**(1): 247-51.
- Bruns, M., A. Gessner, et al. (1988). "Host cell-dependent homologous interference in lymphocytic choriomeningitis virus infection." Virology **166**(1): 133-9.
- Bruns, M., T. Kratzberg, et al. (1990). "Mode of replication of lymphocytic choriomeningitis virus in persistently infected cultivated mouse L cells." Virology **177**(2): 615-24.
- Buchsacher, G. L., Jr. and F. Wong-Staal (2000). "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases." Blood **95**(8): 2499-504.
- 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 A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Burns, J. W. and M. J. Buchmeier (1991). "Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus." Virology **183**(2): 620-9.
- Campbell, K. P. (1995). "Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage." Cell **80**(5): 675-9.
- Cao, W., M. D. Henry, et al. (1998). "Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus [see comments]." Science **282**(5396): 2079-81.
- Colbere-Garapin, F., F. Horodniceanu, et al. (1981). "A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells." J Mol Biol **150**(1): 1-14.
- Cosset, F. L., Y. Takeuchi, et al. (1995). "High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum." J Virol **69**(12): 7430-6.
- de la Torre, J. C., G. Rall, et al. (1993). "Replication of lymphocytic choriomeningitis virus is restricted in terminally differentiated neurons." J Virol **67**(12): 7350-9.

- Di Simone, C., M. A. Zandonatti, et al. (1994). "Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike." *Virology* **198**(2): 455-65.
- Durbeej, M. and K. P. Campbell (1999). "Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex." *J Biol Chem* **274**(37): 26609-16.
- Durbeej, M., M. D. Henry, et al. (1998). "Dystroglycan in development and disease." *Curr Opin Cell Biol* **10**(5): 594-601.
- Eckert, H. G., M. Stockschlader, et al. (1996). "High-dose multidrug resistance in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors." *Blood* **88**(9): 3407-15.
- Glushakova, S. E. and I. S. Lukashevich (1989). "Early events in arenavirus replication are sensitive to lysosomotropic compounds." *Arch Virol* **104**(1-2): 157-61.
- Gorecki, D. C., J. M. Derry, et al. (1994). "Dystroglycan: brain localisation and chromosome mapping in the mouse." *Hum Mol Genet* **3**(9): 1589-97.
- Griffin, J. D., S. A. Cannistra, et al. (1990). "The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor." *Int J Cell Cloning* **8 Suppl 1**: 35-44; discussion 44-5.
- Hara, T. and A. Miyajima (1992). "Two distinct functional high affinity receptors for mouse interleukin-3 (IL-3)." *Embo J* **11**(5): 1875-84.
- Harada, Y., T. Takahashi, et al. (1987). "Expression of two different tachykinin receptors in *Xenopus* oocytes by exogenous mRNAs." *J Neurosci* **7**(10): 3265-73.
- Hemler, M. E. (1999). "Dystroglycan versatility." *Cell* **97**(5): 543-6.
- Henry, M. D. and K. P. Campbell (1996). "Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton." *Curr Opin Cell Biol* **8**(5): 625-31.
- Higuchi, R., B. Krummel, et al. (1988). "A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions." *Nucleic Acids Res* **16**(15): 7351-67.
- Holland, J., K. Spindler, et al. (1982). "Rapid evolution of RNA genomes." *Science* **215**(4540): 1577-85.
- Holt, K. H., R. H. Crosbie, et al. (2000). "Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide." *FEBS Lett* **468**(1): 79-83.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., J. M. Ervasti, et al. (1992). "Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix." *Nature* **355**(6362): 696-702.

- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., A. Milatovich, et al. (1993). "Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization." Hum Mol Genet **2**(10): 1651-7.
- Jacobson, C., F. Montanaro, et al. (1998). "alpha-Dystroglycan functions in acetylcholine receptor aggregation but is not a coreceptor for agrin-MuSK signaling." J Neurosci **18**(16): 6340-8.
- Kaplan, G., A. Totsuka, et al. (1996). "Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus." Embo J **15**(16): 4282-96.
- King, C. C., R. de Fries, et al. (1990). "In vivo selection of lymphocyte-tropic and macrophage-tropic variants of lymphocytic choriomeningitis virus during persistent infection." J Virol **64**(11): 5611-6.
- Kitamura, T. (1998). "New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening." Int J Hematol **67**(4): 351-9.
- Kitamura, T., M. Onishi, et al. (1995). "Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9146-50.
- Kitamura, T., N. Sato, et al. (1991). "Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors." Cell **66**(6): 1165-74.
- Klavinskis, L. S. and M. B. Oldstone (1987). "Lymphocytic choriomeningitis virus can persistently infect thyroid epithelial cells and perturb thyroid hormone production." J Gen Virol **68**(Pt 7): 1867-73.
- Klimatcheva, E., J. D. Rosenblatt, et al. (1999). "Lentiviral vectors and gene therapy." Front Biosci **4**: D481-96.
- Krug, M. S. and S. L. Berger (1987). "First-strand cDNA synthesis primed with oligo(dT)." Methods Enzymol **152**: 316-25.
- Larochelle, A., J. Vormoor, et al. (1996). "Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy." Nat Med **2**(12): 1329-37.
- Lee, K. J., I. S. Novella, et al. (2000). "NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs." J Virol **74**(8): 3470-7.
- Lehmann-Grube, F. and J. Ambrassat (1977). "A new method to detect lymphocytic choriomeningitis virus-specific antibody in human sera." J Gen Virol **37**(1): 85-92.

- MacGregor, G. R. and C. T. Caskey (1989). "Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells." Nucleic Acids Res **17**(6): 2365.
- Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol **53**(1): 159-62.
- Matloubian, M., S. R. Kolhekar, et al. (1993). "Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus." J Virol **67**(12): 7340-9.
- Miletic, H., M. Bruns, et al. (1999). "Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus." J Virol **73**(7): 6114-6.
- Miller, A. D., D. R. Trauber, et al. (1986). "Factors involved in production of helper virus-free retrovirus vectors." Somat Cell Mol Genet **12**(2): 175-83.
- Moennig, V., H. Frank, et al. (1974). "Properties of mouse leukemia viruses. VII. The major viral glycoprotein of friend leukemia virus. Isolation and physicochemical properties." Virology **61**(1): 100-11.
- Montanaro, F., S. H. Gee, et al. (1998). "Laminin and alpha-dystroglycan mediate acetylcholine receptor aggregation via a MuSK-independent pathway." J Neurosci **18**(4): 1250-60.
- Montgomery, R. I., M. S. Warner, et al. (1996). "Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family." Cell **87**(3): 427-36.
- Movassagh, M., C. Desmyter, et al. (1998). "High-level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotype retroviral vectors and an improved clinically applicable protocol." Hum Gene Ther **9**(2): 225-34.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Munk, C., J. Lohler, et al. (1997). "Amphotropic murine leukemia viruses induce spongiform encephalomyelopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(11): 5837-42.
- Oldstone, M. B. and M. J. Buchmeier (1982). "Restricted expression of viral glycoprotein in cells of persistently infected mice." Nature **300**(5890): 360-2.
- Oldstone, M. B., M. Salvato, et al. (1988). "Virus-lymphocyte interactions. III. Biologic parameters of a virus variant that fails to generate CTL and establishes persistent infection in immunocompetent hosts." Virology **164**(2): 507-16.
- Parekh, B. S. and M. J. Buchmeier (1986). "Proteins of lymphocytic choriomeningitis virus: antigenic topography of the viral glycoproteins." Virology **153**(2): 168-78.

- Pear, W. S., G. P. Nolan, et al. (1993). "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8392-6.
- Popescu, M., H. Schaefer, et al. (1976). "Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus: detection and measurement of interference focus-forming units." J Virol **20**(1): 1-8.
- Rambukkana, A., H. Yamada, et al. (1998). "Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for Mycobacterium leprae [see comments]." Science **282**(5396): 2076-9.
- Rayner, J. R. and T. J. Gonda (1994). "A simple and efficient procedure for generating stable expression libraries by cDNA cloning in a retroviral vector." Mol Cell Biol **14**(2): 880-7.
- Roizman, B. (1990). Multiplication of Viruse-An Overview. New York, D. M. Knippe et al. Raven Press, Ltd.,.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sata, M., J. G. Donaldson, et al. (1998). "Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange activity of Sec7 domain from yeast Sec7 with yeast and mammalian ADP ribosylation factors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4204-8.
- Seed, B. (1995). "Developments in expression cloning." Curr Opin Biotechnol **6**(5): 567-73.
- Seed, B. and A. Aruffo (1987). "Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(10): 3365-9.
- Shimizu, H., H. Hosokawa, et al. (1999). "Adhesion of cultured bovine aortic endothelial cells to laminin-1 mediated by dystroglycan." J Biol Chem **274**(17): 11995-2000.
- Simonsen, H. and H. F. Lodish (1994). "Cloning by function: expression cloning in mammalian cells." Trends Pharmacol Sci **15**(12): 437-41.
- Southern, P. J. (1996). Arenaviridae: The Viruses and Their Replication. Philadelphia, Raven Publishers.
- Spooncer, E., C. M. Heyworth, et al. (1986). "Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors." Differentiation **31**(2): 111-8.
- Steinhauer, D. A. and J. J. Holland (1987). "Rapid evolution of RNA viruses." Annu Rev Microbiol **41**: 409-33.

- Stocker, C., L. Martinez Peralta, et al. (1994). "Characterization of a virus variant produced by L cells persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus." J Gen Virol **75**(Pt 12): 3431-9.
- Stocking, C. and C. Baum (1997). "Gene transfer into haemopoietic cells." Baillieres Clin Haematol **10**(3): 445-65.
- Suzuki, A., M. Yoshida, et al. (1994). "Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin." Eur J Biochem **220**(2): 283-92.
- Taylor, C. S., A. Nouri, et al. (1999). "Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses [see comments]." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 927-32.
- Tishon, A., P. J. Southern, et al. (1988). "Virus-lymphocyte interactions. II. Expression of viral sequences during the course of persistent lymphocytic choriomeningitis virus infection and their localization to the L3T4 lymphocyte subset." J Immunol **140**(4): 1280-4.
- von Laer, D., S. Thomsen, et al. (1998). "Entry of amphotropic and 10A1 pseudotyped murine retroviruses is restricted in hematopoietic stem cell lines." J Virol **72**(2): 1424-30.
- Warner, M. S., R. J. Geraghty, et al. (1998). "A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus." Virology **246**(1): 179-89.
- Whitehead, I., H. Kirk, et al. (1995). "Expression cloning of oncogenes by retroviral transfer of cDNA libraries." Mol Cell Biol **15**(2): 704-10.
- Williamson, R. A., M. D. Henry, et al. (1997). "Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice." Hum Mol Genet **6**(6): 831-41.
- Wong, B. Y., H. Chen, et al. (1994). "High-efficiency identification of genes by functional analysis from a retroviral cDNA expression library." J Virol **68**(9): 5523-31.
- Yee, J. K., T. Friedmann, et al. (1994). "Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range." Methods Cell Biol **43**(Pt A): 99-112.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg, Abteilung Zellbiologie, in der Zeit von April 1998 bis Oktober 1999 mittels einer Förderung der „Werner Otto Stiftung“ angefertigt.

Ein Teilaspekt der vorliegenden Dissertation wurde bereits veröffentlicht: Miletic, H., M. Bruns, et al. (1999). “Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus.” J Virol **73**(7): 6114-6.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. D. von Laer für die Überlassung des Themas. Das Gelingen dieser Arbeit wäre ohne ihre Betreuung und ihr vorbildliches Engagement als Motivationsquelle undenkbar gewesen.

Herrn Prof. Dr. W. Ostertag möchte ich für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen danken. Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Carol Stocking und Herrn PD Dr. med. Christopher Baum für die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Winfried Beyer danke ich für die Hilfe bei dem molekularbiologischen und proteinchemischen Teil dieser Arbeit und seiner Bereitschaft, bei jeder Art von Problemen zu helfen. Für die Einweisung in das Arbeitsthema möchte ich mich bei H. Miletic und S. Thomsen bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Ulla Bergholz und Birgit Vogt für die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken bedanken. Für die Unterstützung bei proteinchemischen Fragestellungen danke ich Johann Meyer und Hannes Klump. Allen Mitgliedern des Arbeitskreises, auch den ehemaligen, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Der Werner Otto Stiftung danke ich besonders für das Stipendium „Zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses in der Medizin an der Universität Hamburg“ im Jahr 1988, die diese Arbeit finanziell ermöglicht hat.

LEBENS LAUF KONSTANTINOS TSIAKAS

Persönliche Daten:

Geburtsdatum	26. November 1966
Geburtsort	Lamia/Griechenland
Nationalität	Griechisch
Familienstand	Verheiratet, 1 Kind
Wohnort	Ottersbekallee 19, 20255 Hamburg

Ausbildung und berufliche Daten:

Nov. 1999- Dez. 2000	Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin UKE
Apr. 1998 - Okt. 1999	Dissertation an der Universität Hamburg im Heinrich-Pette Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie (Prof. W. Ostertag)
Mai 1996- Dez. 1997	Weiterbildungsassistent in einer großen Praxis für Kinderheilkunde In Hamburg (Anerkennung für 18 Monate)
Juli 1995- Apr. 1996	Erziehungsurlaub, Erlernen der deutschen Sprache im „Colon, Institut für Fremdsprachen“ in Hamburg
Juli 1994- Juni 1995	„Intern in Pediatrics“ Winthrop University Hospital, Long Island, USA (1. Jahr eines 3-Jahresprogramms der American Academy of Pediatrics)
Nov. 1993- Juni 1994	FLEX-Examen für die Approbation in den USA, Bewerbungsgespräche in verschiedenen Krankenhäusern für eine Assistenzarztstelle im NY-Gebiet, USA
Sep. 1992- Okt. 1993	AiP-Äquivalent, medizinischer öffentlicher Dienst im staatlichen Krankenhaus der Insel Kythira / Griechenland (Allgemein Medizin)
	Medizinstudium an der Universität Athen/Griechenland. Studium mit einem Begabtenstipendium der Universität Athen, Abschluß mit „sehr gut“
Okt. 1984- Sep. 1985	Militärdienst (obligatorisch in Griechenland)
1972-1984	Grundschule (6 Jahre), Gymnasium (3 Jahre) und Lyzeum (3 Jahre) in Lamia/Griechenland.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Ex vivo</i> Verfahren der somatischen Gentherapie	1
Abbildung 2: RNA-Genom und integriertes DNA-Genom eines Retrovirus	4
Abbildung 3: Herstellung rekombinanter replikationsdefekter Retroviren	6
Abbildung 4: Kodierte Regionen des S-RNA-Segments vom LCMV	11
Abbildung 5: Freisetzung von LCMV-Partikel aus infizierten Vero-Zellen	12
Abbildung 6: LCMV Vermehrungskinetik in vier verschiedenen eukaryotischen Zelllinien	52
Abbildung 7: LCMV Replikation in Jurkat-Zellen.	53
Abbildung 8: Immunofluoreszenzbilder. Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien mit LCMV	Fehler!
Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 9: Dosisabhängige Bindung von LCMV an humane Fibroblasten	56
Abbildung 10: Nachweis der LCMV-Bindung an die Zelloberfläche verschiedener Zelllinien	58
Abbildung 11: Verpackungslinie zur Herstellung des MLV(LCMV) <i>lacZ</i> -Pseudotyps	59
Abbildung 12 : Schematische Darstellung einer Expressionsklonierung	61
Abbildung 13: Kinetik der MLV(LCMV) <i>EGFP</i> Produktion-(FACS-Analyse).	66
Abbildung 14: Screening der Expressionsklone mittels PCR.	68
Abbildung 15: Nachweis der α -DG Expression auf der Zelloberfläche verschiedener Zelllinien	73
Abbildung 16: Western Blot. Nachweis des α -DG-Proteins in Te 671 und L929-Zellen	75
Abbildung 17: Expression von α -DG-mRNA in Jurkat- und Te 671-Zellen.	77
Abbildung 18: Semiquantitative RT-PCR. Bestimmung der α -DG-mRNA Expression in Jurkat	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: LCMV-Vermehrung in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien.	53
Tabelle 2: Nachweis von LCMV-Proteinen in infizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz	54
Tabelle 3: Transduktion LCMV-empfindlichen und -resistenten Zelllinien mit MLV(LCMV) <i>lacZ</i> ...	60
Tabelle 4: Bestimmung der Klonierungseffizienz von Jurkat.	62
Tabelle 5: Screening der Zellklone mittels MLV(LCMV) <i>lacZ</i>	67
Tabelle 6: Bestimmung des Titers der verpackten Expressionsbank mittels Einzelzell PCR	70
Tabelle 7: Bestimmung des α -DG / β -Aktin Verhältnisses in Jurkat- und Te 671-Zellen.	76
Tabelle 8: Korrelation zwischen LCMV-Infizierbarkeit und α -Dystroglykan-Expression	84

Abkürzungen

α -DG	α -Dystroglykan
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ACDU	"automated cell disposition unit"
ARFs	ADP-Ribosylierungs-Faktoren
AIDS	"aquired immunodeficiency syndrome"
AMV	"Avian Myeloblastosis Virus"
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BPV	Bovine Papiloma Virus
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
CD34+	"cluster of differentiation antigen 34 positiv"
CDC:	"Center for Disease Control"
cDNA	komplementäre DNA
CIP	"calf intestine alkaline phosphatase"
ddNTPs	2'3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DG	Dystroglykan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMEM	"Dulbecco's Modified Essential Medium"
DGC	Dystrophin Glykoprotein Komplex
ECL	3- Aminophthalhydrazid/unbekannter Chemilumineszenzverstärker/H ₂ O ₂
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	"E-Green Fluorescent Protein"
<i>env</i>	Gen für das retrovirale Hüllprotein "envelope"
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	"Fluorescence Activated Cell Sorter"
FCS	fötales Kälberserum "Fetal Calf Serum"
FITC	Fluorescein IsothioCyanate
G	Guanosin
<i>gag</i>	Gen für innere retrovirale Strukturproteinen
GEP	"Guanine Exchange Protein"
GaLV	"Gibbon Ape Leukämie Virus"
GP-1 und GP-2	LCMV-Glykoproteine
GP	Glykoprotein
GM-CSF	"Granulocyte Macrophage colony stimulating factor"
GTU	"Geneticin-Transfer-Unit"
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HIV	"Human Immunodeficiency Virus"
IFT	Immunofluoreszenzträger
IgG	Immunglobulin G
IL 3	Interleukin
IMDM	"Iscoves Modified Dulbecco's Medium"
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<i>lacZ</i>	beta-Galaktosidasegen

LB	Wachstumsmedium für E. coli-Zellen
L-RNA	"Large" RNA-Segment des LCMV-Genoms
LTR	"long terminal repeat"
LTU	<i>LacZ</i> Transfer Unit
LCMV	Lymphozytäre Choriomeningitis Virus
min	Minute
MEM	"Minimal Essential Medium"
moi	"Multiplicity Of Infektion "
MLV	Moloney Leukämie Virus
MPSV	"Myeloproliferative Sarcoma Virus"
mRNA	messenger RNA
MZ	Methylzellulose
<i>neo</i>	Gen für Neomycin/Geneticinresistenz
NP	Nukleoprotein
Oligo(dT)	Oligonukleotid Deoxythymidin Primer
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
pbs	primer binding site
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFU	Plaque Forming Units
PMSF	PhenylMethylSulfonylFluoride
PNK	Polynukleotidkinase
<i>pol</i>	Gen für RNA-abhängige-DNA-Polymerase, Protease und Integrase
R, r	(repeat) repetitive Nukleotidsequenzen
RNA	Ribonokleinsäure "ribonucleic acid"
RPMI	"Rosevelt Park Memorial Institute 1640 Medium"
rpm	"rounds per minute"
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SA	Spleißdonor
SD	Spleißakzeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat "Sodium Dodecyl Sulfate"
SF	"Spleen Focus Forming Virus"
S-RNA	"small" RNA-Segment des LCMV-Genoms
SCF	Stem cell factor
SV 40	"Simian Virus 40"
SSC	Natriumcitratpuffer "sodium saline citrate"
T	Thymidin
TAE	Tris Acetat EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TGF	"Transformation Growth Factor"
TE	Tris/EDTA Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U5, u5	"unique sequence" retrovirale Nukleotidsequenzen
UV	Ultraviolett
VOPBA	Virus Overlay Protein Binding Assay
VSV	"Vesicular Stomatitis Virus"
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

