

Aus dem Institut für Infektionsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Helmut Fickenscher)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Rekombinante VZV-Impfviren mit erweitertem Zielspektrum

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von
Neel Petersen
aus Eckernförde
Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Fickenscher

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Monika Brüggemann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.08.2022

gez.: Prof. Dr. Katharina Schaufler

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhalt

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Varicella-Zoster-Virus | 1 |
| 1.1.1 Morphologie..... | 1 |
| 1.1.2 Genomstruktur..... | 1 |
| 1.1.3 Varizellen als Primärinfektion | 2 |
| 1.1.4 Herpes Zoster nach Reaktivierung | 3 |
| 1.2 Masernvirus | 5 |
| 1.3 Rötelnvirus | 7 |
| 1.4 BAC-Mutagenese..... | 8 |
| 1.5 <i>en-passant</i> -Mutagenese | 9 |
| 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit | 11 |
| 2. Material und Methoden..... | 12 |
| 2.1 Materialien | 12 |
| 2.1.1 Geräte | 12 |
| 2.1.2 Software | 12 |
| 2.1.3 Labormaterialien..... | 12 |
| 2.1.4 Chemikalien, Reagenzien und Kits..... | 13 |
| 2.1.5 Puffer, Lösungen und Kulturmedien | 14 |
| 2.1.6 Enzyme und Antikörper | 15 |
| 2.1.7 Plasmide, Bakterielle artifizielle Chromosomen und Viren | 15 |
| 2.1.8 Oligonukleotide..... | 16 |
| 2.1.9 Bakterienstämme, Viren, Zelllinien | 17 |
| 2.2 Methoden | 18 |
| 2.2.1 Klonierung | 18 |
| 2.2.2 Zellbiologische Methoden..... | 23 |
| 2.2.3. Analytische Methoden | 24 |

| | |
|---|----|
| 3. Ergebnisse | 30 |
| 3.1 Klonierung der Expressionskassetten..... | 30 |
| 3.1.1 Herstellung der Insertionskassetten für MeV-H und MeV-F | 30 |
| 3.1.2 Herstellung der Insertionskassette für RuV-E2E1 | 34 |
| 3.2 Gezielte Mutagenese des vOKA-BACs..... | 37 |
| 3.2.1 Herstellung der Deletionsmutante pvOKA Δ 13..... | 37 |
| 3.2.2 Herstellung der Deletionsmutante pvOKA Δ 13/12..... | 38 |
| 3.2.3 Herstellung der Insertionsmutante pvOKA Δ 13/12-MeV-H-F..... | 39 |
| 3.2.4 Herstellung der Insertionsmutante pvOKA Δ 13-MeV-H..... | 41 |
| 3.2.5 Herstellung der RuV-E2E1-Insertionsmutanten..... | 42 |
| 3.3 Virusrekonstitution aus BAC-DNA..... | 44 |
| 3.4 Replikationskinetiken | 44 |
| 3.5 DNA-Nachweis des MeV-H-Gens in infizierten MeWo-Zellen..... | 46 |
| 3.6 Transkriptnachweis des MeV-H-Gens in infizierten MeWo-Zellen | 47 |
| 3.7 Nachweis der MeV-H-Proteinexpression in infizierten MeWo-Zellen..... | 48 |
| 3.7.1 Nachweis der Proteinexpression durch Immunfluoreszenz..... | 48 |
| 3.7.2 Nachweis der Proteinexpression durch Immunblot | 50 |
| 4. Diskussion | 51 |
| 4.1 Rekombinante Vektorimpfstoffe | 51 |
| 4.2 Varicella-Zoster-Virus als Impfvektor..... | 52 |
| 4.3 Weiterentwicklung des Varicella-Zoster-Virus als Impfvektor..... | 54 |
| 5. Zusammenfassung..... | 58 |
| 6. Summary..... | 60 |
| 7. Literaturverzeichnis | 62 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis | 68 |
| 9. Dank..... | 70 |

1. Einleitung

1.1 Varicella-Zoster-Virus

1.1.1 Morphologie

Das Varicella-Zoster-Virus (VZV) ist eines der acht humanpathogenen Herpesviren und wird in der Unterfamilie der Alphaherpesviren der Gattung Varicellovirus zugeordnet (Davison et al., 2009). Herpesviren sind umhüllte DNA-Viren. Das lineare, doppelsträngige DNA-Molekül ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, das aus 162 Kapsomeren gebildet wird (Furlong et al., 1972; Knipe & Howley, 2013). Die Membranhülle besteht aus einer Doppellipidmembran und trägt die Oberflächen-Glykoproteine. Zwischen Hülle und Kapsid liegt eine als Tegument bezeichnete Schicht aus verschiedenen für die Wirtszellregulation und Replikation wichtigen Proteine. Das Virion hat im Durchmesser etwa 150-200 nm (Almeida et al., 1962) (Abb. 1).

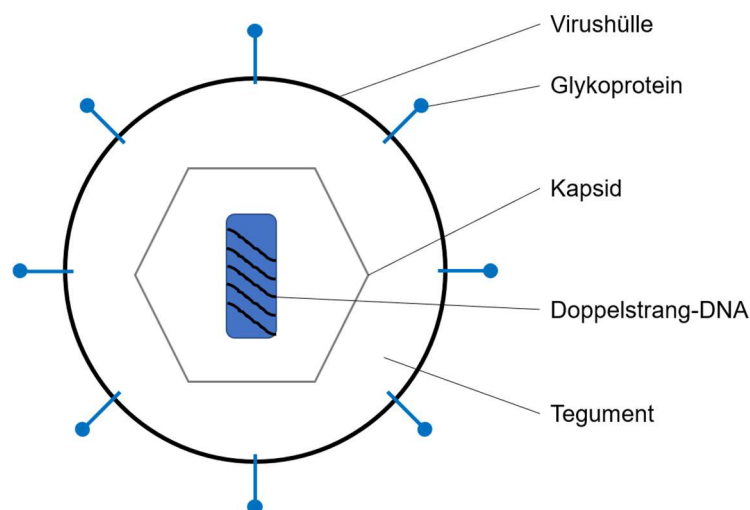


Abb. 1: Schematischer Aufbau des VZV-Partikels. Die lineare, doppelsträngige DNA ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben. Im Tegument sind verschiedene Proteine enthalten, die für die Replikation benötigt werden. Das Tegument wird von einer Doppellipidmembran umgeben, die auch die viralen Glykoproteine enthält.

1.1.2 Genomstruktur

VZV enthält ein lineares doppelsträngiges DNA-Molekül von ca. 124.000 Basenpaaren (Davison & Scott, 1986). Das Genom kann in funktionelle Bereiche unterteilt werden. Der größte Abschnitt enthält etwa 105.000 Basenpaare, wird *unique long region* genannt und von repetitiven Sequenzen flankiert. Am 5'-Ende der *unique long region* befindet sich der *terminal repeat long* und am 3'-Ende der *internal repeat long*. Die *unique short region* besteht aus etwa 5.300 Basenpaaren und liegt zwischen den repetitiven Sequenzen *internal repeat short* und *terminal repeat short*. Jeweils die letzte Base am Ende des Genoms ist ungepaart, so dass nach Eintritt in den Zellkern hierüber die Zirkularisierung des Genoms möglich ist. In zirkulärer

Form ist das Genom vor dem Abbau im Zellkern geschützt (Davison & Scott, 1986; Straus et al., 1982).

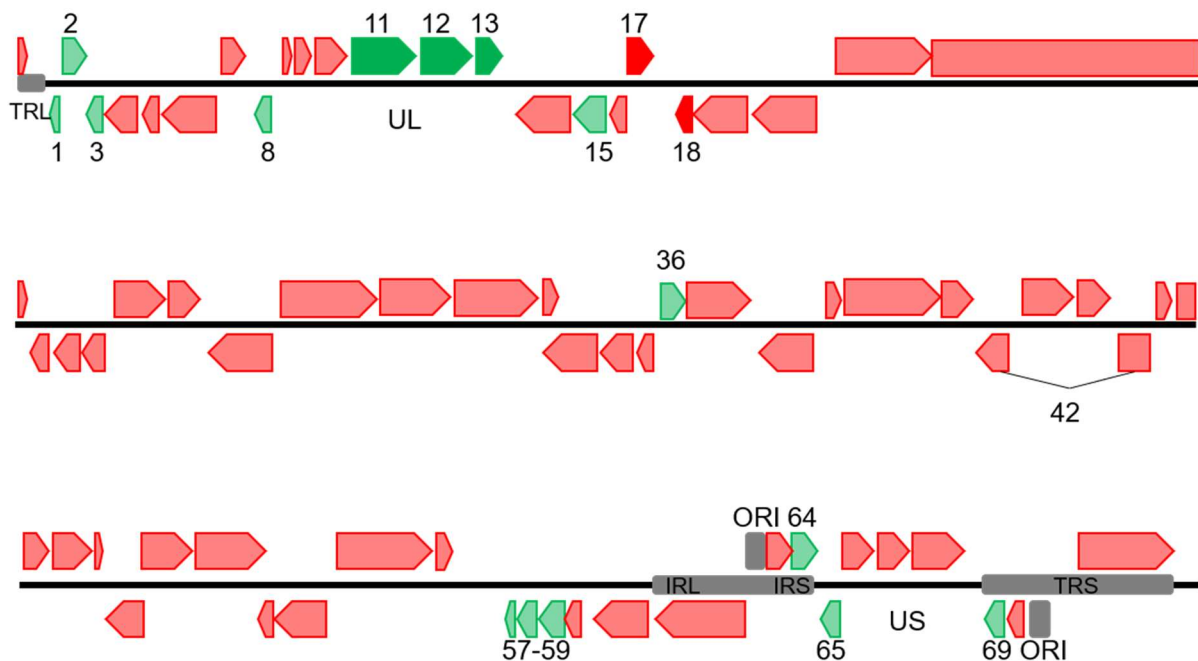


Abb. 2: Schematische Darstellung des VZV-Genoms. Das Genom wird in funktionelle Bereiche eingeteilt: Zwischen *terminal repeat long* (TRL) und *internal repeat long* (IRL) befindet sich die *unique long region* (UL). Die *unique short region* (US) wird von den repetitiven Sequenzen *internal repeat short* (IRS) und *terminal repeat short* (TRS) umschlossen. Offene Leserahmen sind als Pfeile dargestellt. Für die Virusreplikation in humanen permissiven Zellen essenzielle Leserahmen sind rot markiert, in Zellkultur nicht-essenzielle Leserahmen sind grün dargestellt und nummeriert. Für die Arbeit relevante Leserahmen sind farblich hervorgehoben (modifiziert nach Zhang et al., 2010).

In Deletionsversuchen konnte gezeigt werden, dass insgesamt 15 der 72 offenen Leserahmen (ORFs) von VZV in Zellkulturexperimenten für die Replikation nicht essenziell sind (Zhang et al., 2010) (Abb. 2). Durch Deletion dieser nicht-essenziellen ORFs könnte die Kapazität des VZV-Genoms für Fremdsequenzen erhöht werden und dennoch effektiv replikationsfähiges Virus erzeugt werden. Damit eignet sich VZV als Vektor zur Erstellung eines rekombinanten, polyvalenten Impfvirus.

1.1.3 Varizellen als Primärinfektion

Das VZV verursacht nach dem Erstkontakt die Windpocken (Varizellen) und nach der Reaktivierung latent persistierender Virus-Genome den Herpes Zoster (Gürtelrose) (Gilden et al., 1983; Hope-Simpson, 1965). Die Ansteckung bei Primärinfektion erfolgt über hochkontagiöse, virushaltige Tröpfchen, die beim Husten und Atmen ausgeschieden werden. Alternativ ist auch eine Ansteckung durch direkten Kontakt mit dem Sekret virushaltiger Bläschen möglich. Nach aktueller Vorstellung erfolgt hieraufhin zunächst eine Replikation in den Epi-

thelien des oberen Respirationstraktes und in den Rachenmandeln. Dort werden T-Zellen infiziert und es kommt etwa 4-6 d nach der Infektion zu einer ersten virämischen Phase. Eine weitere Replikation erfolgt nun in der Leber und Milz. Mit einer zweiten Virämie etwa 14 d nach der Infektion gelangt das Virus in Haut und Schleimhäute, wo es zum charakteristischen Exanthem führt (Ku et al., 2004). Die Virämie kann mit einer unspezifischen Symptomatik mit Unwohlsein, Kopf- und Gliederschmerzen einhergehen. Anschließend entwickeln die Patienten Fieber und den charakteristischen Hautausschlag. Die Effloreszenzen beginnen mit Papeln und entwickeln sich rasch zu Bläschen mit Krusten (Freer & Pistello, 2018; Gershon et al., 2015). Da die Hautveränderungen in unterschiedlichen Phasen gleichzeitig vorliegen, wird der Hautbefund als „Sternenhimmel“ bezeichnet.

In den meisten Fällen heilen die Läsionen ohne Narbenbildung ab. Durch mechanische Manipulation und bakterielle Superinfektionen können allerdings lokale Komplikationen auftreten. Als weitere Komplikationen können die VZV-Pneumonie (etwa 20 % der Erwachsenen) und seltene Manifestationen des zentralen Nervensystems (0,1 % der Erkrankten) mit meningealer Reizung oder aseptischer Meningoenzephalitis auftreten (Grahn & Studahl, 2015; Weber & Pellecchia, 1965). Nach Primärinfektion einer Schwangeren im ersten und zweiten Trimenon kann es zum fetalen Varizellensyndrom kommen, das beim Neugeborenen zu charakteristischen Hautveränderungen, neurologischen Fehlbildungen, Augenschäden und Skelettanomalien führen kann (Sauerbrei, 2014).

Die Diagnose der Windpocken wird klinisch gestellt, kann aber auch durch direkten Nachweis der Virus-DNA oder durch serologischen Nachweis VZV-spezifischer Antikörper in unklaren Fällen gestützt werden. In den meisten Fällen ist der Krankheitsverlauf unkompliziert und selbstlimitierend, so dass keine spezifische Therapie nötig ist. Bei komplizierten Verläufen und Risikopatienten kann eine antivirale Therapie z.B. mit Aciclovir durchgeführt werden (Kasper et al., 2016).

Zur Prävention der Varizellen wird seit 2004 die Varizellen-Schutzimpfung mit einem attenuierten Lebendimpfstoff für alle Kinder und Jugendliche durch die Ständige Impfkommission (STIKO) empfohlen (STIKO, 2004). Die Immunisierung erfolgt entweder durch die monovalente Variante (z.B. Varivax® oder Varilrix®) oder als Kombinationsimpfstoff mit der Mumps-, Masern- und Rötelschutzimpfung (Priorix-Tetra®). In beiden Fällen findet der oligoklonale VZV-Stamm vOKA als Impfvirus Verwendung.

1.1.4 Herpes Zoster nach Reaktivierung

Im Rahmen der Varizellen kann das Virus die Neuronen der Ganglien entweder über die distalen Nervenendigungen in der Haut und dann über den retrograden axonalen Transport

erreichen oder direkt über Infektion der Neuronen im Rahmen der Virämie (Gershon et al., 2015). Nach Ausheilung der Primärinfektion persistieren die Viren in sensorischen Spinal- bzw. Hirnnervenganglien (Gilden et al., 1983).

Durch Reaktivierung insbesondere bei immungeschwächten und älteren Menschen entwickelt sich die Gürtelrose bzw. der Herpes Zoster. Hierbei breiten sich die Viren ausgehend vom latent infizierten, sensorischen Ganglion entlang des betroffenen Nervens aus, wodurch sich die Bläschen häufig entlang eines Dermatoms entwickeln. Durch eine akute Neuritis kann es zu starken Schmerzen kommen. Besonders Reaktivierungen im Bereich der Hirnnerven können mit schweren Komplikationen einhergehen (Gilden et al., 2009). Beim Herpes Zoster ophthalmicus ist der Sehnerv durch die Reaktivierung betroffen, was von Sehbeeinträchtigung bis hin zur Erblindung führen kann. Das Ramsay-Hunt-Syndrom tritt bei Befall der Hirnnerven VII und VIII auf und kann neben den Symptomen einer peripheren Fazialisparese mit Lähmung der mimischen Gesichtsmuskulatur zu Schwerhörigkeit und Schwindelsymptomen führen (Ortiz et al., 2008). Bei Schmerzpersistenz nach Abheilung der Reaktivierung spricht man von einer postzosterischen Neuralgie (Cohen, 2013). Bei Patienten unter Immunsuppression kann es nach Reaktivierung zu lebensbedrohlichen, generalisierten Verläufen kommen (Romme-laere et al., 2012).

Nach der Diagnose eines Herpes Zoster sollte zur Verkürzung der Krankheitsdauer und zur Vermeidung neuralgischer Beschwerden neben einer analgetischen Therapie möglichst frühzeitig eine antivirale Therapie bei allen Patienten über dem Alter von 50 Jahren erfolgen. Darüber hinaus wird bei immunsupprimierten Patienten, Befall des Kopf-Hals-Bereichs und prädisponierenden Hauterkrankungen eine systemische antivirale Therapie empfohlen. Bei jüngeren Patienten ohne Hinweis auf einen komplizierten Krankheitsverlauf kann eine orale antivirale Therapie erwogen werden. Hier sollte aber eine Immundefizienz durch eine Infektion mit dem Humanen Immundefizienzvirus ausgeschlossen werden. Im Fall eines komplizierten Zosters oder einer Risikokonstellation für einen komplizierten Verlauf wird die intravenöse Therapie mit Aciclovir empfohlen. In den übrigen Fällen können unter Berücksichtigung der jeweiligen Substanz-spezifischen Nebenwirkungen Aciclovir, Valaciclovir, Famciclovir oder Brivudin oral eingesetzt werden (Gross et al., 2020).

Zur Prophylaxe des Zosters wird seit Dezember 2018 allen Personen ab dem Alter von 60 Jahren sowie Personen ab 50 Jahren mit relevanter Vorerkrankung die Schutzimpfung mit dem rekombinanten, adjuvantierten Herpes-Zoster-Subunit-(HZ/su) Totimpfstoff (Shingrix®) empfohlen (STIKO, 2018). Der Impfstoff besteht aus dem rekombinant erzeugten VZV-Glykoprotein E und wird im Abstand von zwei bis maximal sechs Monaten zweimalig intramuskulär appliziert. Darüber hinaus ist ein attenuierter Lebendimpfstoff (Zostavax®) auf Basis des vOKA seit 2006 in Deutschland zugelassen. Der Impfstoff enthält die attenuierten Impfviren

der Windpocken-Impfung in deutlich höher Dosierung, zeigte aber eine begrenzte Wirksamkeit und Wirkdauer. Zudem ist Zostavax® als Lebendimpfstoff für immunsupprimierte Patienten mit hohem Risiko für einen komplizierten Zosterverlauf nicht anwendbar, weshalb keine Empfehlung als Standardimpfung durch die STIKO erfolgte (STIKO, 2017).

VZV bietet verschiedene Vorteile bei der Anwendung als Ausgangsstamm zur Herstellung polyvalenter Impfstoffe. Mit der Technik der bakteriellen artifiziellen Chromosomen (BAC) und der *en-passant*-Mutagenese stehen effiziente Möglichkeiten zur Untersuchung und Manipulation des viralen Genoms zur Verfügung. Die Genomstruktur ermöglicht zudem eine hohe Kapazität zur Aufnahme von Fremdsequenzen. Mit dem attenuierten VZV-Impfstamm vOKA steht ein sicherer Ausgangsstamm für derartige Bestrebungen zur Verfügung.

1.2 Masernvirus

Das Masernvirus wird der Gattung Morbillivirus der Familie der Paramyxoviren zugeordnet. Das Genom besteht aus etwa 16.000 Basen, die als einzelsträngige RNA in negativer Polarität vorliegt. Nukleoproteine binden an die RNA und bilden das Nukleokapsid, das wiederum von einer Membran umhüllt ist. In die Virushülle sind die Oberflächenantigene Hämagglutinin und Fusionsprotein eingelagert (Knipe & Howley, 2013) (Abb. 3).

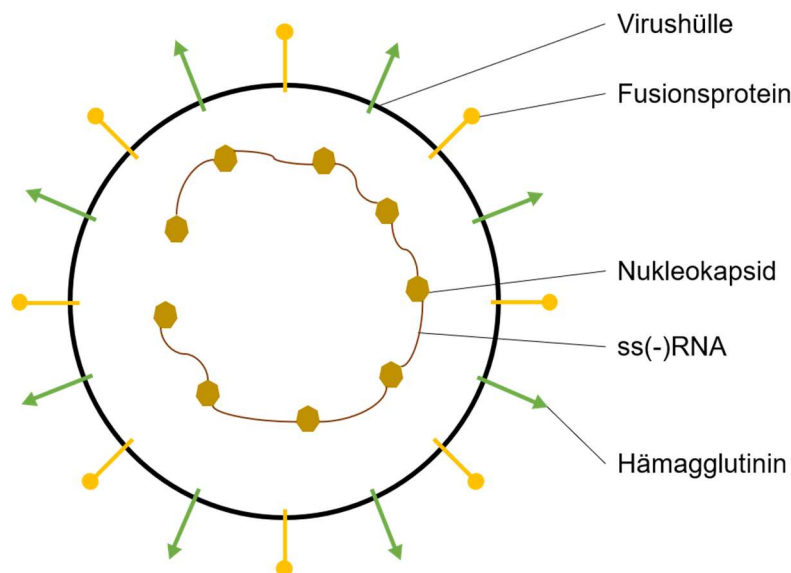


Abb. 3: Schematischer Aufbau des Masernvirus-Partikels. Das Virus enthält eine lineare einzelsträngige RNA mit negativer Polarität (ss(-)RNA), welche durch das Nukleoprotein zum Nukleokapsid zusammengefasst wird. Das Kapsid wird von einer Virusmembran umhüllt. In die Membran sind die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Fusionsprotein eingelagert.

Das Masernvirus-Genom kodiert für sechs Proteine. Neutralisierende Antikörper werden gegen die Oberflächenproteine und hier im Wesentlichen gegen das Hämagglutinin gebildet (de Swart et al., 2005). Das Molekül mit 69 kDa wird über hydrophobe Aminosäuren in der

Virusmembran verankert. Das Fusionsprotein befindet sich ebenfalls in der Virusmembran und scheint die Ausbildung einer stabilen Immunantwort zu unterstützen. Das Protein wird zunächst als Polypeptid von 60 kDa translatiert. Durch zelluläre Peptidasen wird das Signalpeptid abgespalten und das Peptid in das F2- (N-terminal) und F1-Fragment (C-Terminal) gespalten, die anschließend über eine Disulfid-Brücke verbunden sind (Plattet et al., 2016) (Abb. 4).

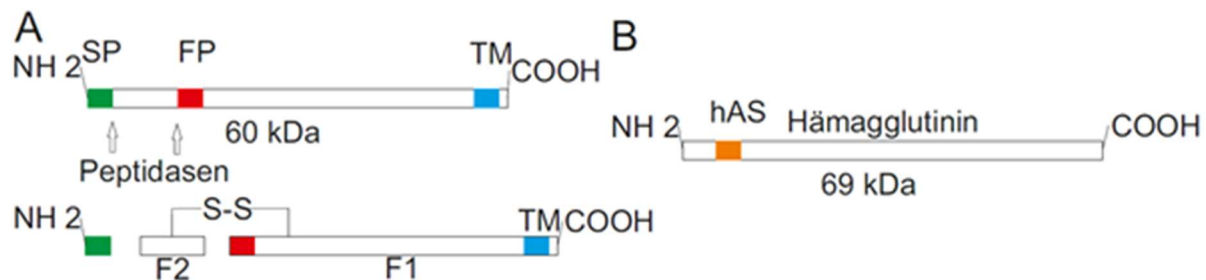


Abb. 4: Oberflächenantigene des Masernvirus. (A) Fusionsprotein nach Translation und nach Spaltung durch zelluläre Peptidasen in F1, F2 und SP. SP, Signalpeptid; FP, Fusionspeptid; TM, Transmembrandomäne; (B) Hämagglutinin. hAS, hydrophobe Aminosäuren als Membrananker (modifiziert nach Knipe & Howley, 2013).

Nach Kontakt mit virushaltigen Aerosolen werden alveoläre Makrophagen und dendritische Zellen in der respiratorischen Submukosa bzw. auch der Konjunktiva infiziert. Von hier aus wird das Virus über die infizierten Immunzellen in nachgeschaltete Immungewebe, wie Lymphknoten, Milz und bronchienassoziierte Gewebe transportiert. Hier erfolgt eine massive Replikation durch Infektion CD150-positiver Immunzellen, vor allem B- und T-Lymphozyten. Anschließend werden Epithelzellen und Keratinozyten infiziert und eine systemische Infektion nahezu sämtlicher Organsysteme folgt (Laksono et al., 2016).

Masern sind mit einem Kontagiositätsindex von fast 100 % hochansteckend. Nach Kontakt mit virushaltigen Tröpfchen kommt es nach etwa 14 d zum Ausbruch der Erkrankung, zunächst mit Fieber, Konjunktivitis und dem pathognomischen Enanthem, der sogenannten Koplik-Flecken. Erst im weiteren Verlauf bildet sich das charakteristische feinfleckige Exanthem. Die Erkrankung verläuft in der Regel selbstlimitierend, so dass keine spezifische Therapie Anwendung findet. Als Komplikation tritt eine vorübergehende Immunsuppression auf, durch die es zu sekundären Otitiden, Bronchitiden und Pneumonien kommen kann (Gremillion & Crawford, 1981). Beobachtungsstudien nach Einführung der Masernschutzimpfung zeigten einen deutlichen Rückgang der Mortalität durch andere Infektionen als Masern über etwa 2-3 Jahre, was auf eine anhaltenden Masern-induzierte Immunsuppression über diesen Zeitraum zurückzuführen war (Mina et al., 2015). Weiter relevant ist die akute, postinfektiöse Enzephalitis, die in etwa 0,1 % der Masernfälle auftritt und bei 10-20 % der Betroffenen tödlich endet. Bei weiteren 20-30 % kommt es zu bleibenden Schäden im zentralen Nervensystem (Buchanan & Bonthius, 2012; Fisher et al., 2015). Nach Jahren kann es darüber hinaus zur stets tödlich verlaufenden subakut sklerosierenden Panencephalitis kommen (Miller et al., 2004).

Durch eine Änderung des Infektionsschutzgesetzes wurde im März 2020 die Masernimpfpflicht eingeführt.

Ein effektiver, attenuierter Lebendimpfstoff steht zum Schutz vor einer Masernvirusinfektion zur Verfügung. Die STIKO empfiehlt die Verwendung des Kombinationsimpfstoffes MMR, der gleichzeitig auch gegen Röteln- und Mumpsviren immunisiert, als Standardimpfung zweimalig bis zum 24. Lebensmonat (STIKO, 2013). Der Impfstatus muss unter anderem bei Aufnahme in eine Kindertagesstätte oder bei der Einschulung nachgewiesen werden.

1.3 Rötelnvirus

Das kleine Rötelnvirus mit ca. 50-70 nm Durchmesser gehört zur Familie der Matonaviren, die mit den Togaviren nah verwandt sind. Die einzelsträngige RNA wird von einem isometrischen Nukleokapsid umgeben. In die Lipidhülle sind die Oberflächenproteine E2 und E1 eingelagert (Abb. 5). Diese liegen als Heterodimere vor und sind wesentliche Zielstrukturen für neutralisierende Antikörper (Bowden & Westaway, 1984; Cusi et al., 1988; Knipe & Howley, 2013; Mangala Prasad et al., 2017). Die Oberflächenproteine werden als ein Polyprotein translatiert und anschließend von zellulären Peptidasen in die Proteine E2 (42 kDa) und E1 (58 kDa) gespalten (Oker-Blom et al., 1984) (Abb.6).

Das Virus wird aerogen über Tröpfcheninfektion übertragen. Im lymphatischen Gewebe des oberen Respirationstraktes erfolgt die erste Replikation des Virus. Anschließend verbreitet sich das Virus systemisch über die regionalen Lymphknotenstationen. Der Wirtszellrezeptor für den Viruseintritt ist bislang noch nicht bekannt. Allerdings wird angenommen, dass ubiquitär vorkommende Moleküle wie Phospholipide und Glykolipide beteiligt sind (Lee & Bowden, 2000). Nach einer Inkubationszeit von 14-21 d kommt es zu einer Lymphadenopathie, Grippe-ähnlichen Symptomen sowie zum charakteristischen feinfleckigen, makulopapulösen Exanthem (Knuf, 2019). Die wichtigste Komplikation ist die konnatale Röteln-Embryofetopathie. Hierbei kommt es zu schweren Schäden des Fetus durch die diaplazentare Übertragung während der Schwangerschaft. Besonders schwerwiegend ist ein Infektionszeitpunkt während der ersten zwölf Schwangerschaftswochen. Das Vollbild wird unter der Gregg'schen Trias bestehend aus Defekt am Herz, Auge und Ohr zusammengefasst (Gregg, 1941; Lambert et al., 1965). Darüber hinaus können weitere Fehlbildungen sowie Spontanaborte auftreten. Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose wird ein serologischer Nachweis spezifischer IgM-Antikörper bzw. ein direkter RNA-Nachweis mit RT-PCR empfohlen. Eine virusspezifische Therapie steht nicht zur Verfügung, weshalb die Infektionsprophylaxe mit attenuiertem Lebendimpfstoff empfohlen wird. Die Standardimpfung erfolgt mit dem Kombinationsimpfstoff Priorix®, der ebenfalls einen Schutz gegen Mumps- und Maserninfektionen vermittelt (STIKO,

2019). Infolge der Masern-Impfpflicht wurde indirekt auch eine Rötelnimpfpflicht eingeführt, da der Lebendimpfstoff monovalent nicht zur Verfügung steht.

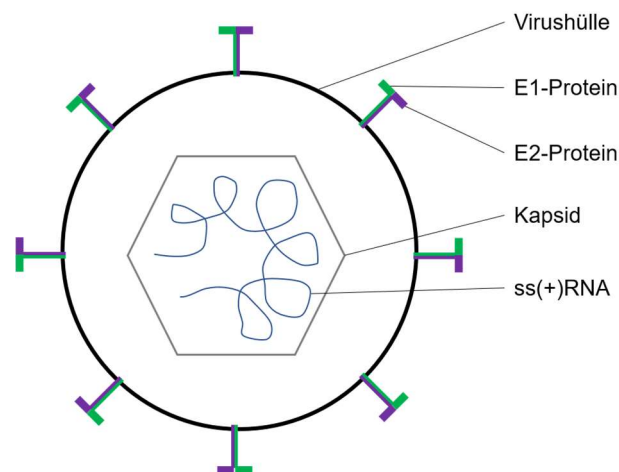


Abb. 5: Morphologischer Aufbau des Rötelnvirus-Partikels. Das Virus enthält eine lineare, einzelsträngige RNA mit positiver Polarität (ss(+)-RNA). Das isometrische Kapsid wird von einer Virusmembran umhüllt. In die Membran sind Heterodimere der Oberflächenproteine E2 und E1 eingelagert.

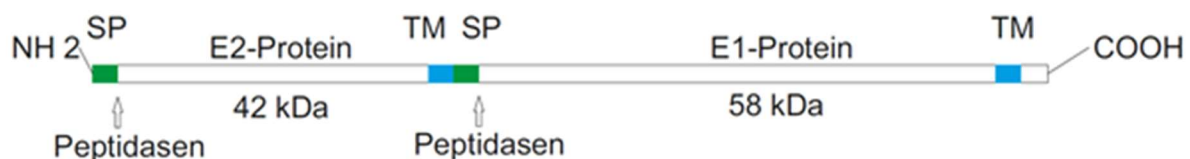


Abb. 6: Oberflächenantigene des Rötelnvirus. Zunächst erfolgt die Translation eines Polyproteins. Durch zelluläre Peptidasen werden die Proteine E2 und E1 abgespalten. Die Proteine lagern sich anschließend als Heterodimer in die Virusmembran. TM, Transmembranomäne; SP, Signalpeptid. (modifiziert nach Knipe & Howley, 2013).

1.4 BAC-Mutagenese

Eine wesentliche Voraussetzung für die Experimente dieser Arbeit war die Möglichkeit, definierte Klone des VZV-Genoms genetisch zu modifizieren, zu isolieren und anschließend replikationsfähiges Virus zu rekonstituieren. Dieser Methodik wurde durch die Verwendung bakterieller artifizierender Chromosome (BAC) ermöglicht. Basierend auf dem Fertilitätsplasmid (F-Plasmid) von *Escherichia coli* (*E. coli*) konnte Fremd-DNA bis zu 300 kb als Einzelkopie in *E. coli* stabil repliziert und effizient genetisch manipuliert werden (Shizuya et al., 1992). Dies wurde zunächst mit humaner DNA durchgeführt. Später wurden auch virale Genome mit dieser Methodik als BACs in *E. coli* etabliert. Aus der Herpesvirusfamilie wurde der BAC-Vektor erstmalig in das Genom des murinen Cytomegalovirus (CMV) erfolgreich eingebracht (Messerle et al., 1997) und ermöglichte somit die gezielte Manipulation des Virusgenoms mit dem stetig wachsenden Repertoire der molekulargenetischen Methodik.

Auch das VZV-Genom liegt kloniert in verschiedenen BACs vor. In dieser Arbeit diente das vOKA-BAC als Ausgangspunkt für die Experimente. Dieses BAC enthält die vollständige genomische Sequenz des VZV-Impfstammes OKA. Ursprünglich basierte dieses BAC auf dem europäischen VZV-Stamm HJO (Wussow et al., 2009). Über konsekutive Rekombinationsschritte wurde die HJO-Sequenz durch die des Impfstamms vOKA aus dem Impfstoff Varilrix® ersetzt (Brunnemann et al., nicht publiziert). Im Rahmen der Rekonstitution werden die Fremdsequenzen vollständig aus dem Virusgenom entfernt (Wussow et al., 2009). Hierdurch konnten in der Arbeit rekombinante Impfstämme basierend auf dem sicheren Vakzine-Stamm vOKA erzeugt werden.

1.5 *en-passant*-Mutagenese

Die Mutagenese des vOKA-BACs erfolgte durch Anwendung der *en-passant*-Mutagenese. Hierbei handelt es sich um eine molekulargenetische Methode, mit der Mutationen wie Deletionen und Insertionen oder einzelne Punktmutationen durch aufeinanderfolgende Red-Rekombinasen-vermittelte homologe Rekombinationen durchgeführt werden können, ohne dass im Zielgenom unerwünschte Fremdsequenzen hinterlassen würden (Tischer et al., 2006). Ein PCR-Produkt wird in einem ersten Rekombinationsschritt über flankierende, homologe Bereiche in die gewünschte Stelle des BACs inseriert. Die Rekombination wird über das Red-Rekombinase-System vermittelt und kann durch Änderung der Kultivierungstemperatur induziert werden. Das Produkt der erfolgreichen Insertion kann über das Kanamycin-Resistenz-Gen (Kan^R) selektiert werden. Die chromosomalen Bereiche zwischen den homologen Bereichen werden bei der Insertion der Rekombinationskassette deletiert (Abb. 7). Sollen Fremdsequenzen inseriert werden, erfolgt dies ebenfalls über ein vorher gezielt hergestelltes PCR-Produkt (Abb. 8). In einem zweiten Rekombinationsschritt werden die ungewünschten Fremdsequenzen vollständig entfernt. Durch Zugabe von Arabinose zu dem Kulturmedium wird bei dem hier verwendeten *E.-coli*-Stamm GS1783 die Expression der Endonuklease I-SceI induziert. Die Endonuklease führt zu einem einzelnen DNA-Doppelstrangbruch im Bereich der Rekombinationskassette. Durch interne homologe Sequenzen erfolgt dann durch die Red-Rekombinasen vermittelt die Exzision sämtlicher Fremdsequenzen. Der Erfolg der *en-passant*-Mutagenese wird schrittweise mit PCR, Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-(RFLP)-Analyse und schließlich durch vollständige Sequenzierung der Insertions- und Deletionsstellen einschließlich der flankierenden Bereiche überprüft.

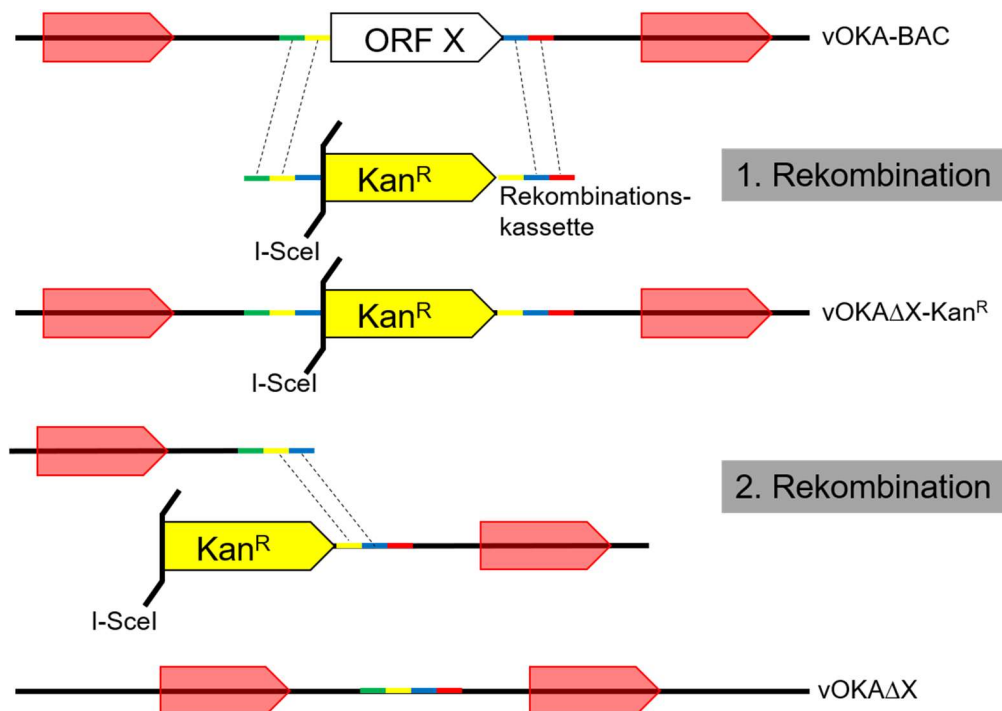


Abb. 7: Ablauf der *en-passant*-Mutagenese zur Deletion viraler Leserahmen. Amplifikation der Rekombinations-Kassette einschließlich des Kanamycin-Resistenz-Gens (Kan^R) und der I-SceI-Erkennungssequenz. Anteile von 50 bp beider Primer sind homolog zu der den ORF X flankierenden Sequenz. Während der ersten Rekombination wird die Rekombinationskassette in das VZV-BAC inseriert, gleichzeitig erfolgt die Deletion von ORF X. Die Induktion der Restriktionsendonuklease führt zu einem DNA-Doppelstrangbruch und damit zu der Exzision der Rekombinationskassette einschließlich jeglicher Fremdsequenz.

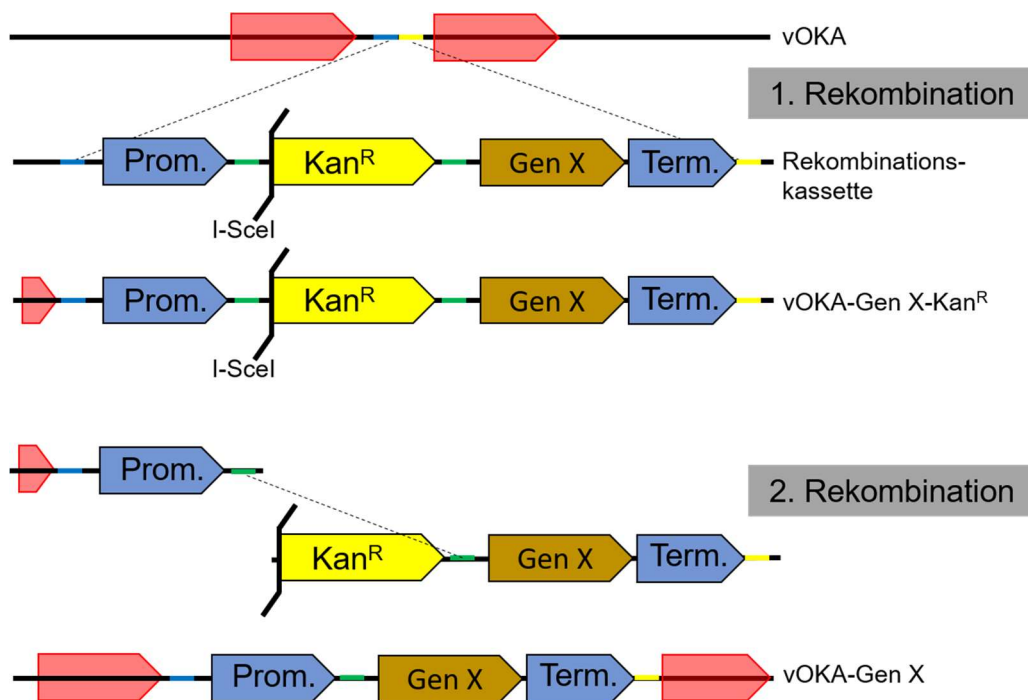


Abb. 8: Ablauf der *en-passant*-Mutagenese zur Insertion von Fremdgenen. Die Rekombinationskassette enthält zusätzlich zu dem Kanamycin-Resistenz-Gen (Kan^R) und der I-SceI-Erkennungssequenz die zu klonierende Fremdsequenz (Gen X). Während der ersten Rekombination wird die Rekombinationskassette in das VZV-BAC inseriert. Die Induktion der Restriktionsendonuklease I-SceI führt zu einem DNA-Doppelstrangbruch und damit zu einer Exzision der Kan^R-Kassette aus dem viralen Genom.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieses Promotionsprojekts war es, basierend auf dem VZV-Impfstamm vOKA rekombinante Viren zu entwickeln, die immunrelevante Oberflächenstrukturen des Masern- und des Rötelnvirus exprimieren und so potenziell einen oligo- bis polyvalenten Impfstoff gegen alle drei Virusinfektionen zu erzeugen.

Das Masernvirus besitzt mit dem Hämagglutinin- und dem Fusionsprotein zwei impfrelevante Oberflächenantigene. Beim Rötelnvirus wird das E2- und das E1-Protein als immunogen angesehen. Die entsprechenden Gene sollten amplifiziert und als Expressionskassetten mit einem Promotor und Terminator kloniert werden. Mit der BAC-Technik und der *en-passant*-Mutagenese sollten die Expressionskassetten in das Genom des VZV-Impfstammes eingebracht werden.

Aus den BAC-Varianten sollte rekombinantes Virus rekonstituiert werden. Nach Bestätigung einer effizienten Replikationskinetik, sollte das Virusgenom auf Insertion der Fremd-DNA untersucht werden. In Zellkultur sollte die Transkription und Expression der Fremdgene bestätigt werden.

Am Ende dieser Arbeit sollten replikationsfähige, oligovalente VZV-Impfstoffkandidaten vorliegen, die in Zellkultur erfolgreich die Fremdgene exprimieren und für initiale Tierexperimente zur Verfügung stehen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller, Ort |
|---------------------------|---------------------|---|
| Blotter | Transblot SD | BioRad (München,D) |
| Westernblot-Dokumentation | LAS-3000 | Fuji (Tokio, JP) |
| Elektroporator | Gene Pulser XCell | BioRad (München, D) |
| Fluoreszenz-Mikroskop | IX81 | Olympus (Tokio, JP) |
| Geldokumentationskammer | Gel iX imager | Intas (Göttingen, D) |
| Inverses Lichtmikroskop | DMIL | Leica Camera (Wetzlar, D) |
| SDS-PAGE Laufkammer | Mighty Small II | Amersham Biosciences (Little Chalfont, GB) |
| Photometer | Nanodrop 2000/2000c | PeqLab (Erlangen, D) |
| pH-Meter | Seven Easy pH | Mettler-Toledo (Gießen, D) |
| Sterilwerkbank | HeraSafe | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Thermocycler | T3000 | Biometra (Göttingen, D) |
| Zentrifuge | Multifuge 4 KR | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Zentrifuge | Pico/Fresco | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Zentrifuge | 5804R | Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, D) |

2.1.2 Software

| Verwendung | Bezeichnung | Hersteller, Ort |
|----------------------------------|--|--|
| Bilddokumentation | Fujifilm Image Reader (Version 2.1) | Fuji (Tokio, JP) |
| Bildverarbeitung | Xcellence Pro (Version 2.0) | Olympus (Tokio, JP) |
| DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung | NanoDrop 2000/2000c Operating Software (Version 1.6) | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Klonierungsstrategie | VectorNTI Advance 11 (Version 11.5.3) | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Textverarbeitung | Microsoft® Word 2016 | Microsoft (Redmond, WA, USA) |
| Sequenzdatenbank | GenBank | National Center for Biotechnology Information (NCBI), (Rockville, MD, USA) |

2.1.3 Labormaterialien

| Material | Eigenschaft | Hersteller, Ort |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Elektroporations-Küvetten | 0,1 cm | BioRad (München, D) |
| Filter-Pipettenspitzen | 10, 20, 200 und 1000 µl | Sarstedt (Nümbrecht, D) |
| Filter Top Zellkulturflaschen | 25, 75 und 175 cm ² | Greiner bio-one (Frickenhäusen, D) |
| Zellkulturplatten | 6 und 24-Well | Greiner bio-one (Frickenhäusen, D) |
| Petrischalen | | Sarstedt (Nümbrecht, D) |
| Photometer-Küvetten | 1000 µl | Bio-rad (München, D) |
| Imobilon-P PVDF- Membran | | Merck Millipore (Billerica, MA, USA) |

| Material | Eigenschaft | Hersteller, Ort |
|-----------------------|--------------------|---|
| Reaktionsgefäße | 0,2, 1,5 und 2 ml | Sarstedt (Nümbrecht, D) |
| Reaktionsröhrchen | 15 und 50 ml | Sarstedt (Nümbrecht, D) |
| Serologische Pipetten | 2, 5, 10 und 25 ml | Sarstedt (Nümbrecht, D) |
| Whatman-Papier | 7x8,4 cm | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |

2.1.4 Chemikalien, Reagenzien und Kits

| Chemikalien, Reagenzien und Kits | Hersteller, Ort |
|---|---|
| Acrylamid-Mix | Merck (Darmstadt, D) |
| Agarose | Life technologies (Darmstadt, D) |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Merck (Darmstadt, D) |
| Ampicillin | Biochrom, Merck (Berlin, D) |
| BigDye-Mix | Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) |
| Chloramphenicol | Merck (Darmstadt, D) |
| Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| DMEM) w/o L-Glutamin | Biochrom, Merck (Berlin, D) |
| fetal bovine serum (FBS) | PAA Laboratories (Cölbe, D) |
| Gel Extraction Kit | Qiagen (Hilden, D) |
| GeneRuler DNA Ladder Mix | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Glycerin | Gerbu (Heidelberg, D) |
| Kanamycin (Kan) | Merck (Darmstadt, D) |
| L-Glutamin | Biochrom, Merck (Berlin, D) |
| Lipofectamin 2000 | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| MgCl ₂ | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Maxi-DNA-Präparation | Qiagen (Hilden, D) |
| Mini-Plasmid-Präparation | Qiagen (Hilden, D) |
| Mounting Medium (Vector shield) | Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) |
| NucleoSpin Extract II Kit | Macherey-Nagel (Düren, D) |
| OptiMEM | Life technologies (Darmstadt, D) |
| PageRuler Plus Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ | Biochrom, Merck (Berlin, D) |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom, Merck (Berlin, D) |
| RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| RNase-Inhibitor | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen (Hilden, D) |
| RNeasy MinElute Cleanup Kits | Qiagen (Hilden, D) |
| RT2 First Strand Kit | Qiagen (Hilden, D) |
| Saponin | Merck (Darmstadt, D) |
| Trypsin/EDTA | Biochrom, Merck (Berlin, D) |

2.1.5 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

| Puffer und Lösungen | Zusammensetzung |
|---|---|
| Plasmidpräparation Puffer I | 10 mM EDTA, pH 8,0 25 mM TRIS-HCl, pH 8,0 100 µg/ml RNase A |
| Plasmidpräparation Puffer II | 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS |
| Plasmidpräparation Puffer III | 3 M Kaliumacetat, pH 5,5 |
| Lysepuffer | 1xPCR-Puffer, 5 % (v/v) Tween20, 134 µg/ml Proteinase K |
| TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) | 89 mM Borsäure 89 mM TRIS 2 mM EDTA, pH 8,0 |
| 6x DNA-Ladepuffer | 50 % (v/v) Glycerin 10 mM EDTA, pH 8,0 Bromphenolblau |
| Einfriermedium (Zellkultur) | 91 % (v/v) FBS, 9 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) |
| 10 x Phosphate-buffered saline (PBS) | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 12 mM Gesamtposphat pH 7,4 |
| Fixierlösung | 2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS |
| Permeabilisierungslösung | 1 % (w/v) Saponin in PBS |
| Blockierlösung | 10 % (v/v) FBS in PBS |
| 5x Protein-Ladepuffer | 5 % (w/v) SDS 5 % β-Mercaptoethanol 50 % (v/v) Glycerin |
| 10x SDS-Gel-Laufpuffer | 0,25 M TRIS 1,92 M Glycerin 1 % (w/v) SDS pH 8,3 |
| 10x Transferpuffer | 1,92 M Glycerin, 250 mM TRIS |
| TRIS-buffered saline mit 0,05% Tween 20 (TBS-T) | 0,05 % Tween 20 5 M NaCl 2 M TRIS-HCl pH 7,5 |
| Milchpulversuspension (TBS-TM) | 5 g Magermilchpulver 100 ml TBS-T |
| Chemolumineszenz-Substrat Lösung | 1:5-Mischung Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity mit Super Signal® West Pico chemiluminescent substrate, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Stripping-Puffer | 6 M Guanin-HCl 0,2 % Nonidet P40 0,1 M β-Mercaptoethanol 20 mM TRIS-HCl pH 7,5 |
| Lysogeny-Broth(LB)-Medium | 0,17 M NaCl, 1 % Trypton/Pepton, 0,5 % Hefeextrakt |
| LB-Agar | 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium |
| D10-Medium | 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin, in DMEM |
| SOC-Medium | 2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glucose |

2.1.6 Enzyme und Antikörper

| Bezeichnung | Hersteller, Ort |
|---|---|
| Restriktionsendonukleasen | |
| Ascl | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| BamHI | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| EcoRI | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| EcoRV | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| NheI | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| NsiI | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| PmeI | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| PstI | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| SacI | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Sall | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| XmaI | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Polymerasen | |
| HotStartTaq | Qiagen (Hilden, D) |
| Phusion-Polymerase | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Taq-DNA-Polymerase | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| RNasen, DNasen und Proteinasen | |
| RNase A | Roche (Basel, CH) |
| DNase I | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Proteinase K | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Antikörper, polyklonale Antikörper | |
| Maus anti-VZV-gE | Merck Millipore (Billerica, MA, USA) |
| Maus anti- β -Actin | Merck Millipore (Billerica, MA, USA) |
| Ziege anti-Maus-HRP | Merck Millipore (Billerica, MA, USA) |
| Ziege anti-Kaninchen-HRP | Merck Millipore (Billerica, MA, USA) |
| Ziege anti-Maus-AlexaFluor488 | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Ziege anti-Kaninchen-AlexaFluor488 | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Kaninchen anti-MeV-H-Serum | Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies, Universität Würzburg |
| Kaninchen anti-MeV-F-Serum | Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies, Universität Würzburg |

2.1.7 Plasmide, Bakterielle artifizielle Chromosomen und Viren

| | Eigenschaft | Quelle |
|--------------------------|---|--|
| Plasmide | | |
| pEP-Kan ^R -S2 | Transfervektor Kan ^R -Gen (aphAI) flankiert von I-SceI Restriktionsenzym-Erkennungsstellen | Tischer et al., 2006 |
| pORFeGFPkana | Transfervektor mit Promotor des Humanen T-Zellleukämievirus und polyA-Signal des Simianen Virus 40, inseriertes eGFP Gen mit Kan ^R -Kassette | Invivogen (San Diego, CA, USA), modifiziert |
| pcDNA3.1(-)-n-HSpr1A | Transfervektor mit CMV-Enhancer-Promotor und polyA-Signal des bovinen Wachstumshormons (BGH), inseriertes murines Sprr1A | Prof. Dr. Michaela Kress, Physiologie, Innsbruck |
| pJET1.2 blunt | Transfervektor | Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |

Bakterielle artifizielle Chromosomen (BAC)

| | | |
|--------------|--|---------------------------------|
| pvOka | VZV-Oka Genom kloniert als BAC mit MiniF-Sequenz, Chloramphenicol-Resistenz-Gen | Brunnemann, 2012 |
| Viren | | |
| rvOka | | Brunnemann, 2012 |
| Masernvirus | Priorix (Ch.-B.: A69CD577A) | GlaxoSmithKline (Brentford, UK) |
| Rötelnvirus | Priorix® (Ch.-B.: A69CD577A) | GlaxoSmithKline (Brentford, UK) |

2.1.8 Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz |
|-------------|--|
| HF2846 | TAT ACC TAG GAT GTC ACC ACA ACG AGA CC |
| HF2847 | CTA TCT GCG ATT GGT TCC ATC |
| HF2848 | ATG TCC ATC ATG GGT CTC AAG |
| HF2849 | TAT AAT GCA TTC AGA GCG ACC TTA CAT AGG |
| HF2855 | GAG CTG ATA CCG TCT ATG AAC C |
| HF2853 | TCG AAT TAC AAG TGG AAT GC |
| HF2860 | ATG GCC CCC CAG GCC TTC CTT GCC GGG CTC TTG C |
| HF2862 | TAT GAG CTC TTG TGA GGG TGC TGG ACG TAG CTA GCA AGG |
| HF2861 | TAT ACC TAG GCT AGC GCG GCG CTA TAG CGC CGC GCA AGT AG |
| HF2863 | TGA TGA GCG TGT TCG CCC TTG CTA GCT ACG |
| HF884 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG |
| HF2841 | TGC GCC ACT CAA GCA C |
| HF2843 | GAA TTG CCA TCT CAC CG |
| HF2725 | GGG GGT CCG TGA GGA TCG ACC TTT ACA AGA TAT AAT TTG TCC ATA TCG CAG TAC AGC GGT TAA TAG ATA GTT ATG TAG GGA TAA CAG GGT AAT CGA TTT |
| HF2726 | GAA ATG ACC GCC AAA GTG CCT AGT CCA TAA CTA TCT ATT AAC CGC TGT ACT GCG ATA TGG ACA AAT TAT ATC TTG GCC AGT GTT ACA ACC AAT TAA CC |
| HF2727 | TAC CCA CAA TAT CAA GTG GTC GTT TGT ATT TAA CGA TTA TTA CCG GTA CCT TTA ATG GAT TTT TAA ATG TTG TCA TAG GGA TAA CAG GGT AAT CGA TTT |
| HF2728 | TAC ATT CGC AAC ACA TCT ACT GTC TTG ACA ACA TTT AAA AAT CCA TTA AAG GTA CCG GTA ATA ATC GTT AAA TAC GCC AGT GTT ACA ACC AAT TAA CC |
| HF2902 | GGA TTG GGA AGA CAA TAG CAG GCA TGC TGG GGA TGC GGT GGG CTC TAT GGA CCG GGT AGG GGA GGC GCT TTT CC |
| HF2903 | ACG ATT TAT AAC ATG TAT ATA CGA GCA AAA TAA AAC AAT GAA CCA TTA AGG CTT CTG ATG GAA TTA GAA CTT GGC |
| HF2927 | TAT AGT CGA CTA GGG ATA ACA GGG TAA TCG ATT T |
| HF2928 | ATA TGT CGA CCA GGC GCA GCC GGG GAC GCT CTG GCG TAG CCC CCA CAA GCC GCG AGC AGT GCC AGT GTT ACA ACC AAT TAA CC |
| HF3162 | TAC CCA CAA TAT CAA GTG GTC GTT TGT ATT TAA CGA TTA TAC CGG TAC CGC TCC GGT GCC CGT CAG TGG GCA G |
| HF3163 | TAC ATT CGC AAC ACA TCT ACT GTC TTG ACA ACA TTT AAA AAT CCA TTA AAA ATT AAC ATT TAA ATG GAT CTA CC |
| HF3164 | GCT GTT CAT AAA CAG AAA CCA ACC AAA CGC GTC TGT GTA TAT CAT TTT ATG CTT CTG ATG GAA TTA GAA CTT GGC |
| HF3163 | TTT AAT GGA TTT TTA AAT GTT GTC AAG ACA GTA GAT GTG TTG CGA ATG TAT ACC GGG TAG GGG AGG CGC TTT TCC |

| Bezeichnung | Sequenz |
|-------------|--|
| HF2929 | CTA AAC ACT GTA TTA ACA AAA TAT TGG AAT TAA AAC ACA CAT AAG AGC GAG CTC CGG TGC CCG TCA GTG GGC AG |
| HF2930 | ACG ATT TAT AAC ATG TAT ATA CGA GCA AAA TAA AAC AAT GAA CCA TTA AGA ATT AAC ATT TAA ATG GAT CTA CC |
| HF3350 | CTG CTC GCG GCT TGT GGG GGC TAC GCC AGA GCG TCC CCG GCT GCG CCT GGT CGA CGC CGA CGA CCC CCT GCT GCG CAC TTA GGG ATA ACA GGG TAA TCG ATT T |
| HF3351 | CCC ACA CCT CGC CGG GCC CAG GGG CAG TGC GCA GCA GGG GGT CGT CGG CGT CGA CCA GGC GCA GCC GGG GAC GCT GCC AGT GTT ACA ACC AAT TAA CC |

2.1.9 Bakterienstämme, Viren, Zelllinien

Zwischenschritte der Klonierung mit Transfervektoren wurden in dem kommerziell verfügbaren *E.-coli*-Stamm DH5 α durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in flüssigem LB-Medium bzw. auf LB-Agar-Platten mit Zusatz von Antibiotika zur Selektion der erfolgreich transformierten Klone.

Die Manipulation der VZV-BACs erfolgte im *E.-coli*-Stamm GS1783. Dieser Bakterienstamm verfügt über zwei induzierbare Expressionskassetten. Aufgrund einer λ -Prophagensequenz ist eine Temperatur-sensitive Expression von Red-Rekombinase-Genen möglich. Darüber hinaus wird durch Hinzugabe von Arabinose zum Kulturmedium die I-SceI Endonuklease exprimiert (Tischer et al., 2010).

Als Ausgangsmaterial für die Amplifikation der Masern- und Rötelnvirusgene diente der trivalente Lebendimpfstoff Priorix®. Der Impfstoff enthält den Masern-Virusstamm Schwarz, den Mumps-Virusstamm RIT 4385 und Röteln-Virusstamm Wistar RA 27/3. Das Masern- und Mumpsvirus wird zur Impfstoffherstellung in embryonalen Hühnerzellen und das Rötelnvirus in MRC-5 Zellen kultiviert (GlaxoSmithKline, 2019). Vor der RNA-Extraktion wurden Vero-Zellen mit den Impfviren infiziert. Vero-Zellen stammen von Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze ab (Ammerman et al., 2008). Diese Zelllinie diente zur Replikation von Masern- und Rötelnvirus aus Priorix®-Impfstoff. Die adhärenenten Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin, im Weiteren als D10-Medium bezeichnet, bei 37 °C kultiviert. Die Infektion mit Impfviren erfolgte durch Zugabe von 5, 50 und 100 μ l des nach Herstellerangaben rekonstituierten Impfstoffs zu jeweils einem Gefäß einer 6-Well-Platte mit Vero-Zellen.

Die für VZV permissive, menschliche Melanomzelllinie MeWo wurde in D10-Medium bei 37 °C kultiviert (Grose & Brunel, 1978). Die Zelllinie diente der Rekonstitution rekombinanter Viren, für Replikationskinetiken und Expressionsexperimente. Als adhärenente Zelllinie konnte eine Rekonstitution bzw. Replikation mikroskopisch anhand der zytopathischen Effekte (CPE) verfolgt werden. Ebenfalls waren Immunfluoreszenzexperimente nach Fixation der Zellen möglich.

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung

Elektrokompetente Zellen: Die Transformation rekombinanter Plasmide und BACs in kompetente Bakterienzellen erfolgte durch Elektroporation. Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurde ein Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB-Medium mit 2,5 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstamms inokuliert. Das Medium wurde mit Antibiotikum zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes versetzt und die Kultur bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm bei 37 °C inkubiert. Im Fall des *E.-coli*-Stamms GS1783 wurde eine Inkubationstemperatur von 32 °C eingestellt und nach Erreichen der gewünschten Zelldichte durch Inkubation für 15 min bei 42 °C im Wasserbad die Expression der Red-Rekombinasen induziert. Anschließend wurde die Kultur in einem Eiswasserbad für 20 min abgekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und in 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Nach der dritten Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µl 10 % Glycerin resuspendiert und in 50 µl Teilportionen in 1,5-ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Diese wurden sofort in einem Ethanol-Trockeneisbad eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Elektroporation kompetenter Zellen: Zur Transformation elektrokompetenter Zellen wurden 1-2 µl des Ligationsansatzes oder gereinigter, zirkulärer DNA zu den auf Eis aufgetauten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit 1 mm Elektrodenabstand gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 1.500 V, 25 µF und 200 Ω. Der Ansatz wurde in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 2 h bei 37 °C (*E.-coli*-Stamm DH5α) bzw. bei 32 °C (*E.-coli*-Stamm GS1783) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes ausgebracht und für 1-2 d bei gleicher Temperatur im Brutschrank inkubiert.

Hitzeschock-Transformation chemisch kompetenter Zellen: Zur Transformation gereinigter Plasmide wurden 1-2 µl zu 80 µl des kompetenten *E.-coli*-Stamm DH5α gegeben. Nach Inkubation für 20 min auf Eis wurde der Transformationsansatz für 40 s bei 42 °C im Wasserbad erwärmt. Der Ansatz wurde sofort für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium wurden die transformierten Zellen für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert und danach auf Antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert und für 1 d bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Polymerasekettenreaktion: Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich spezifische DNA-Abschnitte amplifizieren. Dies diente sowohl der Erstellung der Expressionskassetten als auch der Überprüfung einzelner Klonierungsschritte. In einem Reaktionsgemisch liegen die DNA-Matrize, Sequenz-spezifische Oligonukleotide und eine DNA-Polymerase mit den

entsprechenden Kofaktoren (Mg^{2+} , dNTP) in einem Reaktionspuffer vor. Die Reaktion erfolgt in Zyklen von Denaturierung, Anlagerung und Elongation, die sich jeweils in der Reaktionstemperatur und Dauer unterscheiden. Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Polymerasen und Reaktionsbedingungen gewählt. Die Anlagerungstemperatur wurde der Schmelztemperatur der Oligonukleotide angepasst. Zur Überprüfung einzelner Klonierungsschritte reicht häufig der Nachweis kurzer DNA-Fragmente, wie zum Beispiel im Fall der Kolonie-PCR. Zur Selektion positiver Klone nach Transformation wurde die DNA einzelner Klone auf das Vorhandensein des gewünschten DNA-Fragmentes untersucht. Hierfür kam die Taq-Polymerase zur Anwendung. Die Taq-Polymerase wurde ebenfalls zum Nachweis der Transgene nach erfolgreicher cDNA-Synthese verwendet (Tab. 1).

Die Amplifikation der zu klonierenden viralen Gene nach reverser Transkription erfolgte mit der Phusion-Polymerase, die über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt und bei geringer Fehlerquote auch bei längeren Amplifikaten Punktmutationen vermeidet (Tab. 2). Die für die *en-passant*-Mutagenese zu erstellenden Expressionskassetten wurden mit der HotStartTaq-Polymerase amplifiziert. Auch diese Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche das Risiko von Punktmutationen im Amplifikat reduziert. Gleichzeitig eignet sich diese Polymerase besonders für Sequenzen, die zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigen (Tab. 3).

Tab. 1: Ansatz und Ablauf der PCR mit der Taq-Polymerase.

| Ansatz zu 25 µl | µl | Phase | Temperatur [°C] | Dauer | Wiederholung |
|------------------------------|-------|------------------------|-------------------|---------|--------------|
| DNA-Matrize | 0,5 | initiale Denaturierung | 95 | 5 min | 1x |
| dNTPs | 0,5 | Denaturierung | 95 | 30 s | \ |
| 10xTaq-Pol-Puffer | 2,5 | Anlagerung | Primer-spezifisch | 30 s | 30x |
| Primer for/rev | je 1 | Elongation | 72 | 90 s/kb | / |
| Taq-Polymerase | 0,5 | finale Elongation | 72 | 10 min | 1x |
| H ₂ O, DNase-frei | ad 25 | | | | |

Tab. 2: Ansatz und Ablauf der PCR mit der Phusion-Polymerase.

| Ansatz zu 50 µl | µl | Phase | Temperatur [°C] | Dauer | Wiederholung |
|------------------------------|-------|------------------------|-------------------|---------|--------------|
| DNA-Matrize | 2 | initiale Denaturierung | 98 | 1 min | 1x |
| dNTPs | 1 | Denaturierung | 98 | 10 s | \ |
| 10x GC-Puffer | 5 | Anlagerung | Primer-spezifisch | 30 s | 35x |
| Primer for/rev | je 1 | Elongation | 72 | 30 s/kb | / |
| Phu-Polymerase | 0,5 | finale Elongation | 72 | 5 min | 1x |
| DMSO | 1,5 | | | | |
| H ₂ O, DNase-frei | ad 50 | | | | |

Tab. 3: Ansatz und Ablauf der PCR mit HotStartTaq-Polymerase.

| Ansatz zu 50 µl | µl | Phase | Temperatur [°C] | Dauer | Wiederholungen |
|------------------------------|-------|------------------------|-----------------|---------|----------------|
| DNA-Matrize | 1 | initiale Denaturierung | 94 | 15 min | 1x |
| dNTPs | 1 | Denaturierung | 94 | 40 s | \ |
| 10x Puffer | 5 | Anlagerung | 55 | 40 s | 35x |
| Primer for/rev | je 1 | Elongation | 72 | 60 s/kb | / |
| Polymerase | 1 | finale Elongation | 72 | 5 min | 1x |
| H ₂ O, DNase-frei | ad 50 | | | | |

Reverse Transkription: Zur Klonierung viraler Gene erfolgte zunächst die reverse Transkription mit dem *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific). Die isolierte Virus-RNA wurde mit Oligonukleotiden mit einer Länge von sechs Nukleotiden und zufälliger *random*-Sequenz versetzt und nach einer Denaturierungsphase bei 65 °C für 5 min reverse Transkriptase im Reaktionspuffer mit Desoxynukleotiden hinzugegeben. Zur Vermeidung eines unspezifischen RNA-Abbaus war das Reaktionsgemisch mit RNase-Inhibitor versetzt. Die Anlagerung der Oligonukleotide erfolgte für 5 min bei 25 °C. Die anschließende cDNA-Synthese fand bei 42 °C über 1 h statt. Die Reaktion wurde bei 70 °C gestoppt und die cDNA bei -80 °C gelagert.

Zum Nachweis erfolgreicher Expression der Transgene in rekombinanten Viren wurde nach RNA-Isolierung aus infizierten MeWo-Zellen eine reverse Transkription mit dem *RT2-First-Strand-Kit* (Qiagen) durchgeführt. Zur weiteren Reinigung der RNA erfolgte ein weiterer Schritt zum Abbau genomischer DNA. Ein µg RNA wurde mit dem Puffer GE für 5 min bei 42 °C in einem Reaktionsvolumen von 10 µl inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz mit reverser Transkriptase und Reaktionspuffer versetzt. Die cDNA-Synthese fand bei 42 °C für 15 min statt und wurde bei 95 °C für 5 min gestoppt. Die cDNA wurde ebenfalls bei -80 °C gelagert.

En-passant-Mutagenese: Die Deletion einzelner Leserahmen und die Insertion der Expressionskassetten in das VZV-Genom erfolgte durch die *en-passant*-Mutagenese. Hierbei handelt es sich um eine Rekombinationsstrategie, bei der das Endprodukt ohne zusätzliche Fremdsequenzen oder Selektionsmarker vorliegt. Die *en-passant*-Mutagenese verläuft in zwei aufeinander folgenden Rekombinationsschritten. Das VZV-Genom lag als BAC im *E. coli*-Stamm GS 1783 vor. Dieser Bakterienstamm verfügt über zwei induzierbare Expressionskassetten. Eine Expressionskassette kodiert für die Red-Rekombinasen und kann durch die Erhöhung der Wachstumstemperatur von 32 auf 42 °C induziert werden. Die Zweite kodiert für die *homing*-Endonuklease I-SceI, welche durch Zugabe von L(+)-Arabinose zu dem Kulturmedium exprimiert wird.

Zur Deletion eines Leserahmens wurde ein PCR-Produkt mit der HotStart-Taq Polymerase generiert. Das PCR-Produkt enthielt sowohl die bakterielle Resistenz-Kassette aphal, die für eine Kan^R kodiert, als auch die Erkennungssequenz der I-SceI-Endonuklease. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass am 3'- und 5'-Ende des PCR-Produktes jeweils 50 bp homologe Sequenzen zu den flankierenden Bereichen des zu deletierenden Gens vorhanden waren. Über diese homologen Bereiche erfolgte in einer ersten Rekombination die Insertion der Resistenz-Kassette in das BAC-Genom sowie eine gleichzeitige Deletion des entsprechenden Gens. Positive Klone nach dieser Rekombination konnten über die Zugabe von Kan zu dem Kulturmedium selektiert werden. Zur Deletion der Fremdsequenz war eine weitere Rekombination nötig. Hierfür wiederholten sich die letzten 25 bp des 5'-homologen Bereichs am 3'-Ende der Resistenz-Kassette, direkt nach der Fremdsequenz. Ebenso fanden sich 25 bp des 3'-homologen Bereichs am 5'-Ende vor der Fremdsequenz. Nach Induktion der I-SceI-Restriktionsendonuklease durch die Zugabe von L(+)-Arabinose konnten sich diese homologen Bereiche anlagern und so konnten in der zweiten Rekombination jegliche Fremdsequenz aus dem BAC-Genom entfernt werden.

Plasmidpräparation: Die Isolierung von Plasmiden, sowie BAC-DNA aus Übernachtskulturen der entsprechenden Bakterienstämme erfolgte mit der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Sieben ml antibiotikahaltiges LB-Medium wurden nach Inokulation mit dem Bakterienstamm über Nacht bei 32 °C (*E. coli* GS1783) oder 37 °C (alle übrigen verwendeten Bakterienstämme) schüttelnd bei 220 U/min inkubiert. Die Bakterienzellen wurden anschließend bei Raumtemperatur mit 3000 x g für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 300 µl kaltem Puffer I resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 300 µl Puffer II und Inkubation für 3-5 min bei Raumtemperatur. Hierbei wurde die bakterielle RNA durch die enthaltene RNase abgebaut. Die Zugabe von 300 µl Puffer III und sofortiges Invertieren stoppte die Lyse. Die zirkuläre Plasmid-DNA renaturierte unter diesen Bedingungen, während die genomische DNA denaturiert blieb. Nach 10 min auf Eis wurden Zellbestandteile und die denaturierte genomische DNA durch Zentrifugation sedimentiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation sedimentiert. Nach Zentrifugation bei 16.200 x g bei Raumtemperatur für 30 min erfolgte ein Waschschriff mit 800 µl 70-%-igem Alkohol. Die isolierte DNA wurde in 50 µl DNase-freiem Wasser bei Raumtemperatur gelöst. Plasmide wurden anschließend bei -20 °C und BAC-DNA bei 7 °C gelagert.

Rekombinante BAC-DNA zur Transfektion permissiver Zellen wurde mit dem kommerziell verfügbaren *Plasmid-Maxi-Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben gewonnen. Hierbei können die für die Transfektion benötigten größeren Mengen an BAC-DNA gewonnen werden.

Agarose-Gelelektrophorese: Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten verwendet. Hierfür wurde eine Gelmatrix aus 0,6- bis 2-%-iger Agarose in TRIS-Borat-EDTA-Puffer mit der Probe beladen und eine Spannung angelegt. Die in Lösung negativ geladenen DNA-Fragmente bewegten sich in Richtung Anode. Die Auftrennung erfolgte durch die Porengroße der Gelmatrix entsprechend der Fragmentlänge der DNA-Proben.

Zunächst wurde die Agarose in TRIS-Borat-EDTA-Puffer gegeben und in einem Mikrowellenofen zum Sieden gebracht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde Ethidiumbromid (0,3 µg/ml) hinzugegeben. Der Ansatz wurde in eine Gießvorrichtung gegeben. Die Taschen für die Proben wurden durch einen entsprechenden Kamm im Gel ausgespart. Nach Erkalten wurde das Gel mit TRIS-Borat-EDTA-Puffer bedeckt, das Probenmaterial mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Probentaschen gegeben. Als Größenstandard diente der *GeneRuler DNA Ladder Mix*. Kürzere DNA-Fragmente wurden bei 120 V über 1 h in 1-%-igen Agarosegelen aufgetrennt. Für die RFLP-Analyse wurden die Proben zunächst für 10 min bei 120 V und dann für weitere 24 h bei 40 V in 0,6-%-igen Gelen aufgetrennt. Die Analyse der Gelelektrophorese erfolgte durch Anregung des interkalierenden Ethidiumbromids mit ultraviolettem Licht. Das Bandenmuster wurde über ein Geldokumentationssystem festgehalten.

Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse: Die RFLP-Analyse diente der Überprüfung rekombinanter Plasmide bzw. BACs nach den einzelnen Rekombinationsschritten. Hierfür wurden die DNA-Proben mit Restriktionsendonukleasen inkubiert. Das resultierende Bandenmuster wurde anschließend mit der Agarose-Gelelektrophorese dokumentiert. Zunächst wurde die BAC-DNA über eine BAC-Mini-Präparation isoliert. Jeweils 15 µl wurden anschließend mit 1 µl Restriktionsendonuklease, 2 µl enzymespezifischen Reaktionspuffer und 2 µl Wasser vermischt und über 12 h bei 37 °C inkubiert. Das Bandenmuster wurde nach Gelelektrophorese dokumentiert und mit dem erwarteten Muster des Programmes *Vector NTI* (Thermo Fisher Scientific) abgeglichen. Insertionen oder Deletionen verändern das Bandenmuster. Die RFLP-Analyse wurde jeweils mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Auf diese Weise ließen sich die Rekombinationsschritte auf Genomebene überprüfen.

DNA-Konzentrationsbestimmung: Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm von 1 µl Probematerial wurde im Photometer (NanoDrop) bestimmt. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz ließ sich anschließend die DNA-Konzentration rechnerisch bestimmen. Der Reinheitsgrad der gelösten DNA kann ebenfalls abgeschätzt werden. Hierfür wird der Extinktion bei einer Wellenlänge von 240 nm und 260

nm bestimmt. Der Quotient sollte bei etwa 1,8 liegen. Eine starke Abweichung des Quotienten von diesem Wert weist auf eine Verunreinigung der Probe hin.

Ligation: Die Insertion eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid erfolgte in einem 10- μ l-Ansatz. Die Menge der eingesetzten DNA richtete sich nach der Länge des DNA-Fragments sowie der Plasmidgröße und wurde nach Herstellerangaben berechnet. Die entsprechende DNA-Menge wurde mit 1 μ l Ligase und 2 μ l Ligasepuffer auf 10 μ l mit Wasser aufgefüllt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in kompetente Bakterienstämme transformiert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Zellkultur: Für die zellbiologischen Versuche wurden rekonstituierte VZV-Stämme in permissiven humanen MeWo-Zellen in D10-Medium kultiviert. Das Wachstum der adhärenenten MeWo-Zellen erfolgte in Zellkulturgefäßen verschiedener Größe bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und 5 % CO₂-Gehalt. Die Zellen bildeten nach etwa 6 d einen konfluenten Zellrasen. Die adhärenenten Zellen wurden zunächst zweimalig mit 1 x PBS gewaschen und anschließend durch Inkubation mit Trypsin für 5 min vom Gefäßboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in D10 Medium überführt und in einem Verhältnis von 1:4 in neue Zellkulturgefäße aufgeteilt. Für analytische Versuche wurden definierte Zellzahlen verwendet. Hierfür wurden jeweils 1×10^6 Zellen in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte, bzw. 2×10^5 Zellen einer 24-Well-Platte gegeben.

Transfektion permissiver Melanomzellen und Virus-Rekonstitution: Die Transfektion der BAC-DNA in permissive MeWo-Zellen erfolgte durch Lipofektion. Hierfür wurde zunächst die BAC-DNA über eine Maxi-Präparation isoliert. MeWo-Zellen (1×10^6 Zellen in einem Kulturgefäß einer 6-Well-Platte) waren zum Zeitpunkt der Transfektion zu 90 % konfluent. Der Transfektionsansatz wurde mit *Lipofectamin 2000* (Thermo Fisher Scientific) entsprechend den Herstellerangaben angesetzt.

Das D10-Medium wurde von den MeWo-Zellen abgenommen, durch DMEM ersetzt und jeweils 500 μ l des Transfektionsansatzes wurden auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation für 24 h wurde das DMEM gegen D10-Medium ausgewechselt und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus je drei Kulturgefäßen abgelöst und in eine T175-Flasche überführt. Etwa 5-7 d nach erfolgreicher Transfektion konnten erste CPEs mikroskopisch nachgewiesen werden. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt und weiter kultiviert, bis ein möglichst hoher Anteil der Zellen infiziert war.

Zur Konservierung für weitere Untersuchungen sollten die infizierten Zellen eingefroren werden. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen mit jeweils 5 ml PBS gewaschen und vom Gefäßboden mit Trypsin vollständig abgelöst. Die Enzymaktivität wurde danach durch Zugabe von D10-Medium gehemmt. Die Zellen wurden für 10 min bei 240 x g und Raumtemperatur sedimentiert. Die Zellen wurden in eiskaltem FBS aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 9 % DMSO versetzt und zu je 1 ml in Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden nun in einer vorgekühlten Isopropanol-Kryo-Box bei -80 °C eingefroren.

Virustiterbestimmung: Zur Bestimmung des Virustiters in den archivierten Proben wurden zunächst Verdünnungsreihen von $1:10^1$ bis $1:10^6$ erstellt. Hiervon wurden jeweils 100 µl in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte mit 2×10^5 MeWo-Zellen/Vertiefung gegeben. Je Virusstamm wurden jeweils zwei Kryoröhrchen getestet und je Kryoröhrchen vier unabhängige Verdünnungsreihen erstellt. Drei Tage nach der Infektion erfolgte die Färbung der infizierten Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz (s. u.). Anschließend wurden die CPEs pro Vertiefung in allen Ansätzen von mindestens zwei Verdünnungsstufen mittels Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Aus diesen Daten wurde der Virustiter als *plaque forming units* (PFU)/ml berechnet.

Replikationskinetik: Die Replikationsfähigkeit der rekombinanten Virusvarianten wurde mit Replikationskinetiken quantifiziert. Hierfür wurden MeWo-Zellen mit einer definierten Anzahl PFU der Virusstämme infiziert und aus den Proben der Virustiter von d 1 bis d 5 nach Infektion bestimmt. Die Versuche wurden in 6-Well-Platten mit jeweils 1×10^6 MeWo-Zellen pro Vertiefung durchgeführt. Die Zellen wurden in sechs gleichen Ansätzen mit jeweils 100 PFU pro Gefäß des zu testenden Virusstammes infiziert und über 5 d inkubiert. An jedem Tag wurden die Zellen eines Ansatzes vom Gefäßboden gelöst, gewaschen und zur späteren Virustiterbestimmung eingefroren (s. o.). Dann erfolgte die Bestimmung des Virustiters bis d 5 nach der Infektion (s. o.). Zur Kontrolle der eingesetzten Anzahl PFU erfolgte zusätzlich eine Virustiterbestimmung aus dem Ausgangsmaterial.

2.2.3. Analytische Methoden

DNA-Präparation aus infizierten Zellen: Zur Überprüfung der rekombinanten Virusstämme nach Infektion von MeWo-Zellen wurde Virus-DNA aus den Zellen isoliert und die eingebrachten Mutationen durch eine PCR nachgewiesen. Hierfür wurde das Medium von infizierten Zellen aus T75-Flaschen abgenommen, die Zellen zweimal mit je 3 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin vom Gefäßboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 9 ml D10-Medium aufgenommen und so die weitere Reaktion gestoppt. Der Ansatz wurde bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 100 µl Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgt für 1-3 h bei 56 °C. Zur Inaktivierung der Proteinase K erfolgte ein 10-minütiger

Inkubationsschritt bei 95 °C. Zellbestandteile wurden für 10 min bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Die DNA war im Überstand gelöst und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Indirekte Immunfluoreszenz: Mit der indirekten Immunfluoreszenz können durch Einsatz eines Virusantigen-spezifischen primären Antikörpers und eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörpers infizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden und so CPEs gezählt werden.

Drei Tage nach der Infektion der MeWo-Zellen in einer 24-Well-Platte wurde das Medium abgenommen und ein Waschschriff mit 500 µl PBS folgte. Zur Fixierung der Zellen wurde in jede Vertiefung 150 µl 2 % Paraformaldehyd/PBS gegeben und die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Waschschriffen mit je 500 µl PBS wurden die Zellmembranen durch Hinzugabe von 1 % Saponin für 5 min bei Raumtemperatur für die Antikörper durchlässig. Zur Vorbereitung der Antikörperbehandlung erfolgten erneut zwei Waschriffen mit PBS, gefolgt von einer Inkubation mit 500 µl 10 % FBS für 1 h zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen.

Der primäre Antikörper anti-VZV-gE aus der Maus zur Detektion des Glykoproteins gE von VZV wurde 1:1000 in 10 % FBS/PBS verdünnt und je 100 µl wurden auf die fixierten Zellen für 1 h bei Raumtemperatur oder für 24 h bei 4 °C gegeben. Ungebundene Antikörper wurden in drei Waschschriffen mit jeweils 500 µl PBS für 5 min von den Zellen gewaschen. Der sekundäre Antikörper anti-Maus-AlexaFluor488 wurde 1:1000 in 10 % FBS/PBS verdünnt und jeweils 100 µl wurden für 1 h bei Raumtemperatur zu den fixierten Zellen gegeben. Nach Entfernung von ungebundenem Antikörper über zwei Waschschriffen für 5 min konnte der sekundäre Antikörper mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Die Detektion des MeV-H-Proteins in mit rvOkaΔ13-MeV-H infizierten MeWo-Zellen erfolgte ebenfalls über indirekte Immunfluoreszenz wie oben beschrieben. Lediglich die Fixierung der Zellen und die Antikörper wurden angepasst. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach Abnahme des Kulturmediums und zwei Waschschriffen durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Aceton. Der Ansatz wurde für 10 min bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde das Aceton abgenommen und zwei Waschschriffen mit PBS folgten. Nach einem Blockierungsschritt mit 10 % FBS/PBS für 1 h bei Raumtemperatur wurde 100 µl des anti-MeV-H-Serums in einer Verdünnung 1:1000 in 10 % FBS auf die Zellen gegeben. Ungebundene Antikörper wurden in drei Waschschriffen mit PBS entfernt. Die Detektion erfolgte mit dem sekundären Antikörper anti-Kaninchen-AlexaFluor488 (100 µl/well, 1:100 Verdünnung in 10 % FBS). Die Zellen wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriffen mit PBS konnten die infizierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden.

Protein-Gelelektrophorese: Der Nachweis erfolgreicher Translation der Transgene erfolgte durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hier werden Proteine unter denaturierten Bedingungen nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Als Matrix dient ein 10-%-iges, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel. Nach Tab. 4 wurde zunächst das Trenngel zusammengegeben. Durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde die Polymerisation gestartet. Der noch flüssige Ansatz wurde in eine Gießvorrichtung zwischen eine Glas- und eine Keramikplatte gegeben und mit Isopropanol überschichtet, damit nach oben ein gleichmäßiger Abschluss des Gels erreicht wurde. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt. Der noch flüssige Ansatz für das Sammelgel wurde auf das bereits feste Trenngel geben und ein Probenkamm zur Aussparung der Probenaschen in das Sammelgel gedrückt. Nach vollständiger Polymerisation wurden die vorbereiteten Gele bis zur Verwendung in feuchten Umschlägen bei 4 °C gelagert.

Tab. 4: Zusammensetzung der Gele zur Durchführung der SDS-PAGE.

| Reagenz | Sammelgel [ml] | Trenngel [ml] |
|-------------------------|----------------|---------------|
| 30 % Acrylamid | 0,67 | 3,3 |
| 1,5 M TRIS-HCl (pH8,8) | - | 2,5 |
| 1,0 M TRIS-HCl (pH 6,8) | 0,5 | - |
| 10 % SDS | 0,04 | 0,1 |
| 10 % APS | 0,04 | 0,1 |
| TEMED | 0,004 | 0,004 |
| H ₂ O | 2,7 | 4 |

Zur Herstellung der Proben wurden 1×10^6 MeWo-Zellen pro Vertiefung in einer 6-Well-Platte ausgesät und am Folgetag mit 100 PFU/Well des entsprechenden Virus zugeben. Drei Tage nach der Infektion erfolgte die Ablösung der adhärennten Zellen wie oben beschrieben. Die Zellen wurden für 10 min bei $1.200 \times g$ sedimentiert und die Zellen in 100 μ l 2x SDS-Ladepuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 1 μ l Benzonase und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurden Nukleinsäuren in der Probe abgebaut. Anschließend wurden die Proteine bei 95 °C über 10 min denaturiert. Hierbei lagerten sich SDS-Moleküle an das Aminosäure-Rückgrat der denaturierten Proteine, wodurch diese eine einheitliche negative Ladung erhielten.

Das Gel wurde anschließend in die Laufkammer gespannt und mit Laufpuffer beschickt. Nachdem der Probenkamm entfernt wurde, wurde das Gel mit je 15 μ l der entsprechenden Proben beladen. Zusätzlich wurde eine Probenflasche mit einem dem Größenmarker *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) beladen. Die Auftrennung der Proben erfolgte zunächst bei 50 V für 15 min. Anschließend wurden die Proben im Trenngel bei 120 V für etwa 60 min aufgetrennt.

Immunblot: Nach der Größenauftrennung wurden die Proteine bei 20 V für 30 min in einem Semi-dry-Blot-System auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zunächst für 1 h mit 5 % Milchpulver in TBS-Puffer mit 0,1 % Tween20 (TBST) inkubiert. Hierdurch sollten unspezifische Antikörperbindungen reduziert werden. Die Membran wurde anschließend für 10 min in TBST-Puffer geschwenkt. Das anti-MeV-H-Serum wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in 5 % Milchpulver in TBST zu der Membran gegeben und für 60 min inkubiert. Nach drei Waschschritten in TBST-Puffer wurde der sekundäre Antikörper anti-Kaninchen-HRP in einer Verdünnung von 1:500 in 5 % Milchpulver in TBST auf die Membran gegeben. Nach 60 min Inkubationszeit wurde die Membran dreimal gewaschen. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion mit Chemolumineszenz.

Der sekundäre Antikörper war mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Durch Zugabe einer Substratlösung kam es zur Chemolumineszenz, die mit einer Spezialkamera detektiert werden konnte. Die Komponente A und B der Substratlösung (*Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity* mit *Super Signal® West Pico chemiluminescent substrate*, Thermo Fisher Scientific) wurde in einem 1:5 Verhältnis zusammengemischt und auf die Membran gegeben. Die Chemolumineszenz wurde über eine CCD-Kamera mit einem LAS-3000-Gerät von Fujifilm detektiert.

Zum Nachweis des zellulären Proteins β -Actin wurden die Antikörper von der Membran gelöst. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min in Strippingpuffer inkubiert. Nach drei Waschschritten für jeweils 10 min in TBST konnte erneut eine Antikörperfärbung durchgeführt werden. Im Wesentlichen erfolgte die Durchführung wie oben beschrieben. Der primäre Antikörper anti- β -Actin aus der Maus wurde in einer 1:1000 Verdünnung in TBST-Puffer verwendet. Der sekundäre Antikörper anti-Maus-HRP wurde 1:3000 in 5 % Milchpulver in TBST eingesetzt.

RNA-Präparation aus infizierten Zellen: Der Nachweis der Expression der Transgene auf Transkriptebene erfolgte durch RT-PCR aus infizierten MeWo-Zellen. MeWo-Zellen (1×10^6 Zellen/Vertiefung) wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät und am Folgetag mit 100 PFU/Well des entsprechenden Virus infiziert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Drei Tage nach Infektion wurde das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden einmalig mit 500 μ l PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 μ l Buffer RLT und 200 μ l 70 % Ethanol hinzugeben und die Zellen vom Gefäßboden durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Die Probe wurde in die mitgelieferten Säulen geben und wie bei allen folgenden Zentrifugationsschritten für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Hierbei banden die Nukleinsäuren an das Säulenmaterial. Die DNA wurde durch eine DNase-Behandlung direkt auf der Säule abgebaut. Zunächst wurden 350 μ l RWI-Puffer auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Säulenmembran mit 80 μ l *DNaseI*

Incubation Mix für 15 min bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 350 µl RWI-Puffer und Zentrifugation wurde die DNase von der Membran gelöst. Zwei Waschrunde mit jeweils 500 µl RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation folgten. Zur Elution der RNA von der Säulenmembran wurden 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und die gelöste RNA durch Zentrifugation in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt.

Vor der weiteren Verwendung für die Reverse Transkription erfolgte ein weiterer DNA-Abbau mit Hilfe des *RNeasy MiniElute Cleanup Kits*. Zu 87,5 µl gelöster RNA wurde 10 µl RDD-Puffer und 2,5 µl DNaseI gegeben und der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung über das *RNA Cleanup and Concentration* Protokoll nach Herstellerangaben. Mit dem Ziel einer möglichst hohen Reinheit der RNA erfolgte der DNase-Verdau mit anschließender Reinigung der RNA insgesamt zweimal.

Reverse Transkription: Zum Nachweis viraler Transkripte wurde das *RT2 First Strand Kit* (Qiagen) verwendet. In diesem Protokoll ist ein Abbau genomischer DNA durch eine DNase integriert. Für eine effiziente cDNA-Synthese wurden sowohl Oligo-dT Primer als auch *random* Hexamer-Primer verwendet. Etwa 1 µg RNA wurde mit 2 µl GE-Puffer versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt (Ansatz 1). Im GE-Puffer war die DNase erhalten. Bei 42 °C erfolgte für 5 min der DNA-Abbau. Ein zweiter Ansatz wurde mit 4 µl 5x BC3-Puffer, 2 µl RE3-RT-Mix und 3 µl RNase-freiem Wasser pipettiert (Ansatz 2). Die cDNA-Synthese erfolgte durch Mischung von Ansatz 1 und Ansatz 2 und Inkubation für 15 min bei 42 °C. Die enzymatische Aktivität im Ansatz wurde durch eine Inkubation bei 95 °C für 5 min gestoppt. Der Ansatz wurde auf 100 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle einer Kontamination der Probe mit genomischer DNA wurde ebenfalls ein Ansatz ohne Zugabe Reverser Transkriptase mitgeführt. Der Nachweis der Transkripte erfolgte anschließend durch eine Gen-spezifische PCR mit der Taq-Polymerase.

Sanger-Sequenzierung: Zur Kontrolle der DNA-Sequenz verschiedener Zwischenkonstrukte und der fertiggestellten BAC-Stämme wurden relevante Bereiche sequenziert. Hierfür wurde die Methode nach Sanger genutzt. Durch Einbau von vier unterschiedlich fluoreszierenden Didesoxynukleotiden während einer Sequenz-PCR werden Kettenabbrüche erzeugt. Die entstandenen Fragmente haben unterschiedliche Längen und sind fluoreszenzmarkiert. Mit der Kapillarelektrophorese können die Fragmente aufgetrennt und das entsprechende Fluoreszenzmuster nach Anregung durch einen Laser detektiert werden. Hierdurch können DNA-Sequenzen bis zu einer Länge von 200-500 Basenpaaren bestimmt werden.

Zunächst wurde der Bereich, der später sequenziert werden sollte, mit der Phusion-Polymerase amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend über die Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechende Bande mit dem *NucleoSpin Extract II* Kit (Macherey-Nagel) aus dem Gel isoliert. Die Sequenzier-PCR wurde nach Tab. 5 angesetzt.

Tab. 5: Ansatz und Ablauf des PCR-Programmes zur Durchführung der Sequenzier-PCR.

| Ansatz zu 10 µl | µl | Phase | Temperatur [°C] | Dauer | Wiederholungen |
|------------------------------|-------|------------------------|-----------------|-------|----------------|
| DANN | 50 ng | initiale Denaturierung | 96 | 1 min | 1x |
| BigDye-Mix | 1 | Denaturierung | 96 | 10 s | \ |
| Sequenzier-Puffer | 1 | Anlagerung | 50 | 5 s | 24x |
| Spezifischer Primer | 1 | Elongation | 60 | 4 min | / |
| H ₂ O, DNase-frei | ad 10 | | | | |

Nach der Sequenzier-PCR wurden die Ansätze bei -20 °C gelagert. Die Kapillarelektrophorese erfolgte im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die Sequenzdaten wurden mit der Software *Vector NTI* (Thermo Fisher Scientific) analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung der Expressionskassetten

3.1.1 Herstellung der Insertionskassetten für MeV-H und MeV-F

Zur Herstellung der Vektorviren wurden zuerst Insertionskassetten für die Gene der Masernvirus-Proteine Hämagglutinin und Fusionsprotein hergestellt. Dazu wurden zunächst Vero-Zellen mit den Impfviren aus dem Lebend-Impfstoff Priorix® infiziert. Aus den infizierten Zellen wurde die RNA isoliert und unter Verwendung von *random*-Hexamer-Primern eine cDNA-Synthese durchgeführt. Aus der cDNA wurde mit spezifischen Oligonukleotiden sowohl das Gen für MeV-H (Primers HF2846/HF2847) als auch das Gen für MeV-F (Primers HF2848/HF2849) amplifiziert (Abb. 9). Die Oligonukleotide waren mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen für die anschließenden Klonierungsschritte versehen.

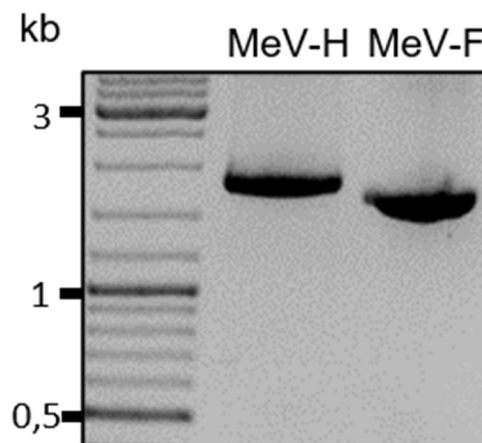


Abb. 9: PCR zur Amplifizierung der Masernvirusgene MeV-H und MeV-F aus cDNA. Nach reverser Transkription mit unspezifischen *random*-Hexamer-Primern erfolgte die Amplifikation der Masernvirusgene MeV-H und MeV-F mit Gen-spezifischen Primern. Die Elektrophorese erfolgte in 1-%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet. Erwartete Fragmentgrößen und Primerpaare: MeV-H (HF2846/2847), 1,9 kb; MeV-F (HF2848/2849), 1,7 kb.

Im Fall des MeV-F-Gens wurde durch die Auswahl der Primer die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NsiI* am 5'-Ende des Gens angefügt. Nach Reinigung des Amplifikats und Verdau mit *NsiI* konnte das Gen mit Ligation zwischen die *PmeI*- und *PstI*-Position des Expressionsvektors pBS-PGK eingebracht werden. Hierdurch entstand die Expressionskassette mit dem MeV-F-Gen zwischen dem PGK-Promotor und PGK-Terminator. Nach der Transformation in *E. coli* wurden vorhandene Kolonien mit der Kolonie-PCR und dem Primerpaar HF238/2854 auf korrekte Insertion des MeV-F-Gens in das Plasmid getestet. Zur Überprüfung des Zwischenkonstruktes pBS-PGK-MeV-F erfolgte eine vollständige Sequenzierung des MeV-F-Gens mit Promotor und Terminator. Der Abgleich der Sequenz, mit der Sequenzdatenbank (GenBank, Zugangs-Nummer: FJ211590.1) des National Center for Biotechnology

Information (NCBI) ergab eine stille Mutation im 3'-Bereich des MeV-F-Gens. Hierbei handelte sich um einen Austausch von Adenosin nach Guanosin. Beide Basenkombinationen kodieren als Triplet für die Aminosäure Lysin. Ansonsten stimmte die ermittelte Sequenz vollständig mit der erwarteten DNA-Sequenz überein.

Als Vorbereitung auf die homologe Rekombination durch *en-passage*-Mutagenese wurde an die XmaJI-Position innerhalb des Mev-F-Gens die Kan^R-Kassette eingesetzt. Nach der Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E.-coli*-Zellen und Selektion auf Kan-haltigem LB-Medium wurden positive Klone mit der Kolonie-PCR (HF1699/2855) identifiziert. Das isolierte Plasmid wurde mit einer RFLP-Analyse untersucht und das erwartete Bandenmuster konnte bestätigt werden (Abb. 10). Durch Auswahl der Primer konnten die Expressionskassetten nun in verschiedene Bereiche im vOKA-BAC mit Hilfe der *en-passant*-Mutagenese eingebracht werden.

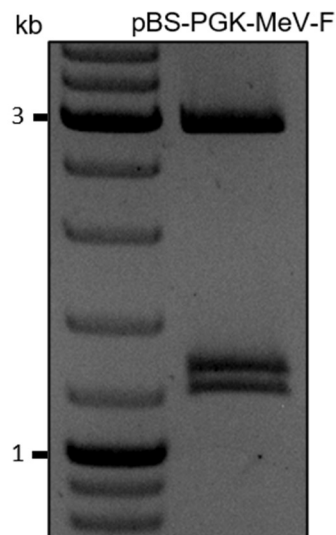


Abb. 10: RFLP zur Überprüfung des Zwischenkonstruktes pBS-PGK-MeV-F. Nach Plasmidpräparation erfolgte ein Verdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV und Ascl. Die Elektrophorese erfolgte in 1-%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet.

Zur Erstellung des Mev-H-Konstruktes wurde durch Auswahl der Primer während der PCR eine AvrII-Erkennungsstelle am 3'-Ende des Masernvirusgens angefügt. Hierüber konnte die MeV-H-Sequenz durch Ligation zwischen dem CMV-Enhancer-Promotor und dem BGH-poly-A-Signal des pcDNA-Vektors nach Verdau mit NheI und PmeI eingebracht werden. Nach Ligation wurden Plasmid-tragende Klone auf Ampicillin-haltigem LB-Agarplatten selektiert und mit der Kolonie-PCR (HF 852/2853) positive Klone identifiziert. Zur Überprüfung des Zwischenkonstruktes pcDNA-MeV-H wurde eine Sequenzierung des MeV-H-Gens mit Promotor und Polyadenylierungs-Signal durchgeführt. Der kodierende Bereich des MeV-H-Gens entsprach vollständig der aus Datenbanken bekannten Sequenz (GenBank, Zugangs-Nummer:

FJ211590.1). Stromabwärts des Stoppcodons und vor dem Polyadenylierungs-Signal wurde eine nicht kodierende Insertion einer Cytosin-Base festgestellt.

Zur Vorbereitung der Insertion in das vOKA-BAC wurde die Kan^R mit dem Primerpaar HF2868/2869 und pEP-Kan^R-S2 als Matrize in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, gereinigt und anschließend ebenso wie der Vektor pcDNA-MeV-H mit der Restriktionsendonuklease SnaBI verdaut. Nach einem erneuten Reinigungsschritt erfolgte die Ligation und Transformation in den chemisch kompetenten *E.-coli*-Stamm DH5 α . Eine positive Selektion der gewünschten Klone war durch Wachstum auf Kan- und Ampicillin-haltigem Kulturmedium möglich. Nach Bestätigung mit Kolonie-PCR (HF 1439/1551) wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt und der Vektor anschließend mit der RFLP-Analyse bestätigt (Abb. 11). Die Expressionskassette im Plasmid pcDNA-MeV-H-Kan^R stand nun zur Insertion in das vOKA-BAC zur Verfügung. Die Klonierungsschritte zur Erstellung beider Expressionskassetten sind in Abb. 12 schematisch dargestellt.

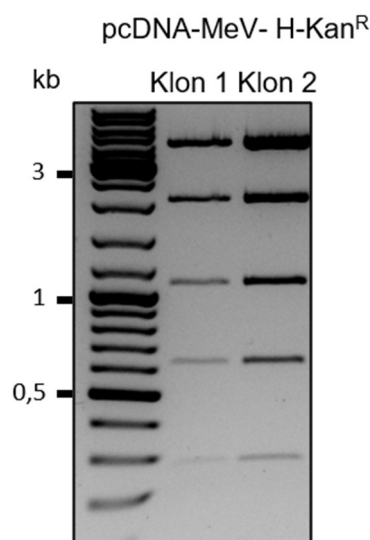


Abb. 11: RFLP-Analyse des Zwischenkonstruktes pcDNA-MeV-H-Kan^R. Nach Plasmidpräparation erfolgte eine Inkubation mit der Restriktionsendonukleasen Aval. Die Elektrophorese erfolgte in 1-%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet.

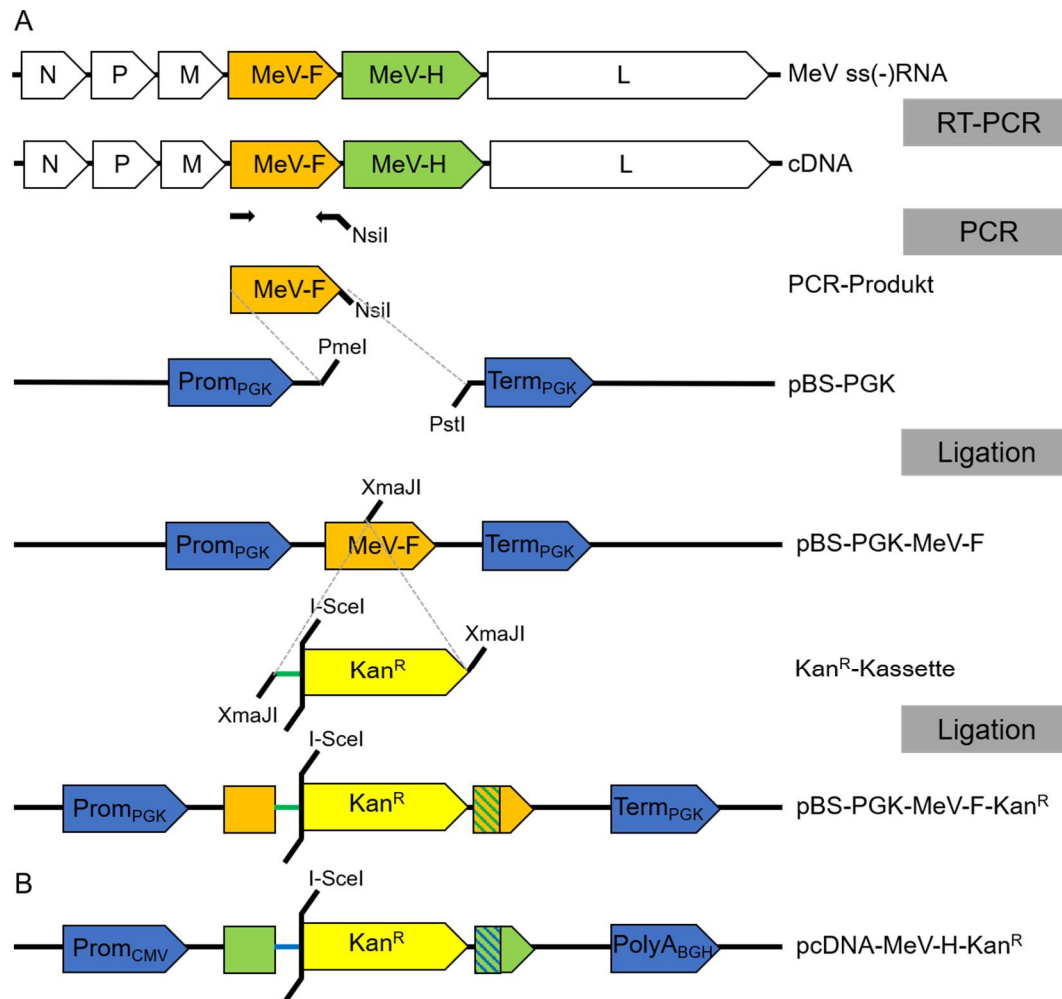


Abb. 12: Klonierungsstrategie zur Erstellung der Expressionskassetten MeV-H-Kan^R und MeV-F-Kan^R. **A** Klonierung des Expressionsvektors pBS-PGK-MeV-F-Kan^R. Die reverse Transkription der Masernvirus-RNA erfolgte mit *random*-Hexamer-Primern. Aus der cDNA wurde mit spezifischen Primern die MeV-F-Sequenz amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit NsiI verdaut und durch Ligation in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pBS-PGK zwischen den PGK-Promotor und den PGK-Terminator eingebracht. Zur Vorbereitung der Insertion in das vOKA-BAC Genom wurde die Kan^R amplifiziert und über die XmaJI-Erkennungssequenz in den XmaJI verdauten Vektor pBS-PGK-MeV-F ligiert. Die Expressionskassette pBS-PGK-MeV-F-Kan^R konnte nun mit der *en-passant*-Mutagenese in verschiedene Stellen des vOKA-Genoms eingebracht werden. **B** Schematische Darstellung des Expressionsvektors pcDNA-MeV-H-Kan^R. Das Masernvirusgen MeV-H liegt kloniert zwischen dem CMV-Enhancer-Promotor und dem BGH-polyA-Signal vor. Die Kan^R-Kassette wurde über die SnaBI-Erkennungsstelle in den Vektor eingebracht.

3.1.2 Herstellung der Insertionskassette für RuV-E2E1

Vero-Zellen wurden mit den attenuierten Viren aus dem Priorix®-Lebendimpfstoff infiziert. Die Virus-RNA wurde aus den infizierten Zellen isoliert. Die durch reverse Transkription gewonnene cDNA diente als Ausgangsmaterial für die spezifische Amplifikation der RuV-E2E1-Sequenz. Aufgrund der Größe und des hohen GC-Gehaltes sollte das Gen in zwei überlappende Fragmente geteilt und in aufeinanderfolgenden Schritten in den Expressionsvektor kloniert werden. Hierzu bot sich eine singuläre NheI-Erkennungsstelle im Bereich der RuV-E1 Sequenz an. Nach der reversen Transkription wurde aus der cDNA die RuV-E2E1 kodierende Sequenz in zwei Fragmenten amplifiziert (HF 2860/2862 und HF2861/2863) (Abb. 13). Beide Fragmente überlappen in der singulären NheI-Erkennungsstelle im RuVE1 kodierenden Bereich.

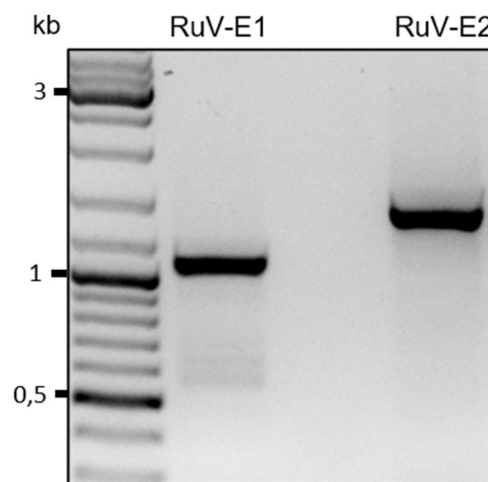


Abb. 13: PCR zur Amplifizierung der Rötelnvirusgene RuV-E1 und RuV-E2 aus cDNA. Die virale RNA wurde aus infizierten Vero-Zellen isoliert. Nach reverser Transkription mit *random*-Hexamer-Primern erfolgte die Amplifikation der Rötelnvirusgene RuV-E1 und RuV-E2 mit Gen-spezifischen Primern. Die Elektrophorese erfolgte in 1%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet. Erwartete Fragmentgrößen und Primerpaare: RuV-E1 (HF 2861/2863), 1 kb; RuV-E2 (HF2860/2862), 1,4 kb.

Die Amplifikate wurden jeweils in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pJET2.1 blunt end eingebracht und anschließend in chemisch-kompetente *E. coli* DH5α transformiert. Die positive Selektion Plasmid-tragender Klone erfolgte auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten. Die Kolonien wurden in einer Kolonie-PCR für RuV-E2 mit den Primern HF 884/2841/2153 und für RuV-E1 mit den Primern HF 884/2843/2153 (Abb. 14) weiter untersucht.

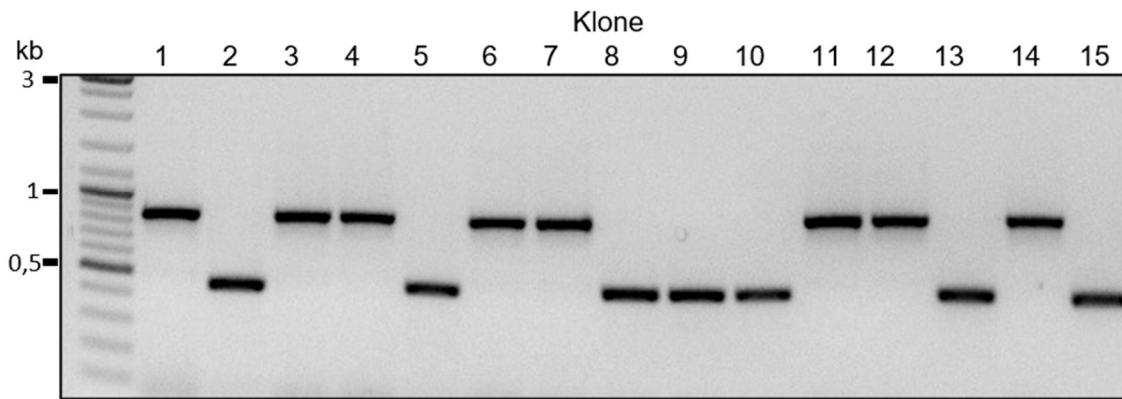


Abb. 14: Kolonie-PCR zur Überprüfung der Transformation von pJET-RuV-E1 in *E. coli* DH5 α . Hierbei wurden drei Primer verwendet, damit beide Orientierungen des Inserts im Vektor dargestellt werden konnten (HF 884/HF2843/HF2153). Die Elektrophorese erfolgte in 1-%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet. Fragmentgrößen und Primerpaare: pJET-E1 (HF 884/2843), 416 bp; pJET-E1 (HF 2153/2843), 811 bp; pJET ohne Insert (HF884/2153), 525 bp.

Durch DNA-Sequenzierung der Plasmide pJET-RuV-E1 und pJET-RuV-E2 und Abgleich mit der Datenbank (GenBank, NCBI) konnte die erfolgreiche Klonierung bestätigt werden. Durch eine weitere PCR mit dem Primerpaar HF2860/2862 wurde das RuV-E2 Fragment aus dem Transfervektor pJET-RuV-E2 amplifiziert und hierdurch gleichzeitig eine *SacI*-Erkennungssequenz am 3'-Ende des PCR-Produkts angefügt. Durch *SacI*-Verdau konnte das Fragment in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pORF zwischen den Promotor des Humanen T-Zelleukämievirus sowie dem Terminator des Simianen Virus 40 inseriert werden. Nach Ligation erfolgte eine positive Selektion Plasmid-tragender Klone auf Ampicillin-haltigem Medium. Die Sequenz des Rötelnvirusgens im Zwischenkonstrukt pORF-RuV-E2 wurde mit DNA-Sequenzierung bestätigt.

Das RuV-E1-Fragment wurde mit dem Primerpaar HF2861/2863 und pJET-RuV-E1 als Matrize amplifiziert und hierdurch mit einer weiteren *NheI*-Erkennungssequenz am 3'-Ende versehen. Durch Verdau mit *NheI* und Ligation in den ebenfalls *NheI* verdauten Vektor pORF-RuV-E2 wurde die ursprüngliche Sequenz von RuV-E2E1 im Expressionsvektor wiederhergestellt. Der Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente Bakterien (*E. coli* DH5 α) transformiert und Plasmid-tragende Klone wurden durch Ampicillin selektiert. Die erfolgreiche Ligation wurde dann mit der Kolonie-PCR (HF665/2843) überprüft. Anschließend wurde die Sequenz des Promotors des Rötelnvirusgens RuVE2E1 und des Polyadenylierungs-Signals mit DNA-Sequenzierung kontrolliert.

Zur Vorbereitung der Insertion der Expressionskassette in das vOKA-BAC wurde die Kan^R-Kassette über die *Sall*-Position im Bereich der RuVE2 Sequenz eingebracht. Hierfür wurde eine PCR mit dem Primerpaar HF 2927/2928 und dem Plasmid pEP-Kan^R-S2 durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschte

Bande unter ultraviolettem Licht ausgeschnitten. Nach DNA-Isolierung aus dem Agarosegel wurde sowohl das PCR-Produkt als auch der Vektor pORF-RuV-E2E1 mit der Restriktionsendonuklease Sall verdaut. Nach erneuter Reinigung des Ligationsansatzes wurde das Produkt in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α transformiert. Die Selektion der gewünschten Klone erfolgte durch Zugabe von Ampicillin und Kan zum Kulturmedium. Die Klone wurden dann mit der Kolonie-PCR überprüft. Die Klonierungsschritte zur Erstellung der Expressionskassette sind in Abb. 15 schematisch dargestellt. Der Vektor pORF-RuV-E2E1-Kan^R stand nun für die Insertion in das vOKA-BAC mit der *en-passant*-Mutagenese zur Verfügung.

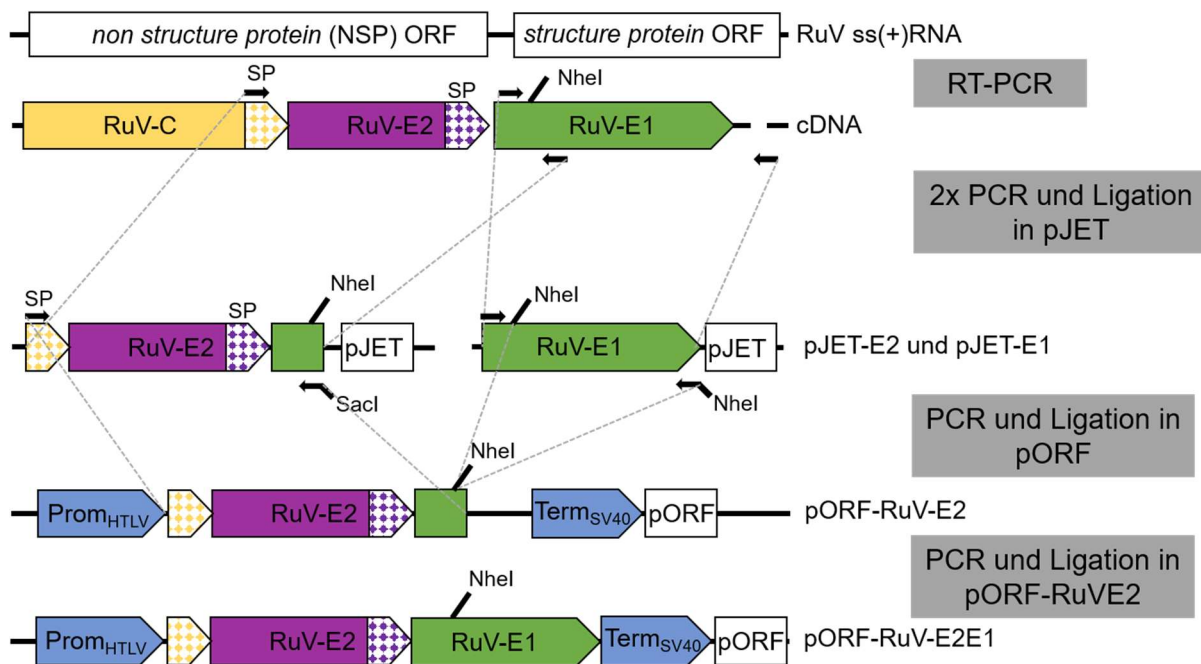


Abb. 15: Klonierungsstrategie zur Erstellung der Expressionskassette pORF-RuV-E2E1. Die reverse Transkription der Rötelnvirus-RNA erfolgte mit *random*-Hexamer-Primern. Die cDNA wurde zur Amplifikation zweier Fragmente der kodierenden Sequenz mit Gen-spezifischen Primern genutzt (RuV-E2 und RuV-E1). Beide Fragmente überlappen im Bereich einer einzelnen NheI- Erkennungssequenz im RuV-E1 kodierenden Bereich. Die PCR-Produkte wurden jeweils in den Vektor pJET1,2 blunt kloniert. Eine zweite PCR wurde zur Ergänzung einer SacI-Erkennungssequenz an dem RuV-E2 Fragment durchgeführt. Nach einem Restriktionsenzymverdau mit SacI wurde das RuV-E2-Fragment in die multiple Klonierungsstelle des SacI-verdauten Vektors pORF zwischen den Promotor des Humanen T-Zellleukämievirus (HTLV) und den Terminator des Simianen Virus 40 (SV40) eingefügt. In einer weiteren PCR wurde eine zusätzliche NheI-Erkennungssequenz an das 3'-Ende des RuV-E1-Fragments angefügt. Das PCR-Produkt wurde mit NheI behandelt und in den ebenfalls mit NheI verdauten Vektor pORF-RuV-E2 ligiert. Zur Vorbereitung der Insertion in das vOKA-BAC wurde eine Kan^R über eine Sall-Erkennungsstelle in die Expressionskassette inseriert (nicht dargestellt).

3.2 Gezielte Mutagenese des vOKA-BACs

Die Expressionskassetten sollten unter Verwendung der *en-passant*-Mutagenese in das VZV-Genom inseriert werden. Als Empfängerstamm sollte eine vOKA-Deletionsmutante verwendet werden. Nach Deletion von offenen Leserahmen aus dem BAC, die für die Replikation in Zellkultur nicht essenziell sind, standen Deletionsvarianten zur Verfügung, die einerseits über eine erhöhte Aufnahmekapazität von Fremd-DNA verfügten und andererseits potenziell ein reduziertes Nebenwirkungspotenzial als Impfvirus aufwiesen. In der *unique long region* des VZV-Genoms liegen ORF11, 12 und 13 aufeinanderfolgend vor. Durch Deletion dieses Genclusters ist es möglich, drei in Zellkultur nicht essenzielle Leserahmen aus dem Genom zu entfernen und das Genom dabei um 5,7 kb zu verkleinern. Daher sollten ORF11, 12 und 13 zunächst als ein Cluster deletiert werden.

In Vorexperimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Deletion von ORF11 zu einer Verkleinerung der Plaquegröße und signifikant reduzierten Replikationsfähigkeit des Virus in Zellkultur führt (Daten nicht publiziert). Damit aber in Zellkultur ausreichend replikationsfähiges Virus produziert werden konnte, wurde daher auf die Deletion von ORF11 verzichtet und die Deletionsmutanten pvOKA Δ 13 und pvOKA Δ 13/12 wurden als mögliche Ausgangskandidaten ausgewählt.

Eine stabile Insertion und erfolgreiche Expression von Fremdgenen konnte im vOKA-Genom unter anderem für den Bereich zwischen ORF17 und 18 (Brunnemann et al., 2015) als auch nach Deletion von ORF13 an gleicher Stelle (Somboonthum et al., 2007) nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden daher beide Insertionsstellen für die Aufnahme der Expressionskassetten verwendet.

3.2.1 Herstellung der Deletionsmutante pvOKA Δ 13

Zur Erstellung der Deletionsmutante pvOKA Δ 13 wurde die Kan^R-Kassette aus dem Vektor pEP-Kan^R-S2 mit dem Primerpaar HF2727/HF2728 amplifiziert. Durch Transformation in *E. coli* GS1783 wurde das PCR-Amplifikat mit der ersten homologen Rekombination in das BAC pvOKA inseriert, wodurch gleichzeitig der ORF13 deletiert wurde. Die Selektion erfolgte über Kan. Die erste homologe Rekombination wurde mit Kolonie-PCR und RFLP-Analyse bestätigt. Mit der zweiten Rekombination konnte die Fremdsequenz restlos aus dem VZV-BAC pvOKA Δ 13 entfernt werden. Nach Kolonie-PCR und RFLP-Analyse (Abb. 16) wurden die Deletionsstelle und die flankierenden Bereiche durch DNA-Sequenzierung kontrolliert.

3.2.2 Herstellung der Deletionsmutante pvOKA Δ 13/12

Das BAC pvOKA Δ 13 diente als Ausgangsstamm für die Deletion von ORF12. Die Kan^R-Kassette des Vektors pEP-Kan^R-S2 wurde mit dem Primerpaar HF2725/HF2726 amplifiziert, in *E. coli* GS1783 elektroporiert und mit der ersten homologen Rekombination in das BAC pvOKA Δ 13 inseriert. Hierbei wurde gleichzeitig der ORF12 deletiert. Für die Selektion wurden Kan und Chloramphenicol verwendet. Erfolgreich transformierte Kolonien wurden mit der Kolonie-PCR identifiziert und mit RFLP-Analyse bestätigt. Mit der zweiten Rekombination konnte die Kan^R-Kassette aus dem VZV-BAC pvOKA Δ 13/12 entfernt werden. Nach Kolonie-PCR und RFLP-Analyse (Abb. 16) wurden die Deletionsstelle und die flankierenden Bereiche durch DNA-Sequenzierung kontrolliert.

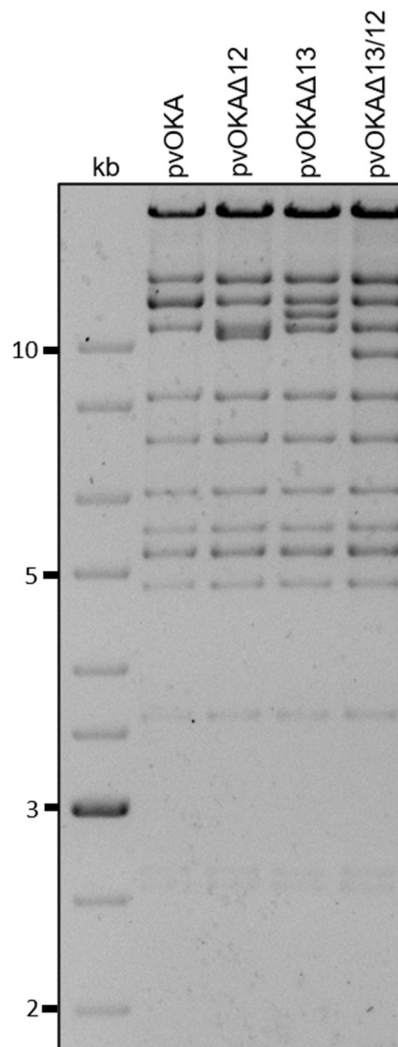


Abb. 16: RFLP-Analyse zur Bestätigung der genomischen Struktur der Deletionsmutanten pvOKA Δ 12, pvOKA Δ 13 und pvOKA Δ 13/12. Klone, die in der Kolonie-PCR positiv getestet wurden, wurden mit der RFLP-Analyse auf genomischer Ebene untersucht. Hierfür wurden aus inokulierten Flüssigkulturen Plasmid-Minipräparationen durchgeführt. Die gereinigte DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease PstI inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem 0,6%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet.

3.2.3 Herstellung der Insertionsmutante pvOKA Δ 13/12-MeV-H-F

Die Expressionskassette MeV-H-Kan^R wurde mit dem Primerpaar HF2900/2901 und dem Plasmid pcDNA-MeV-H-Kan^R amplifiziert und unter Selektionsdruck mit Kan-haltigem Medium durch eine erste homologe Rekombination in das BAC pvOKA Δ 13/12 inseriert. Der Insertionsort lag zwischen ORF17 und ORF18. Nach Identifizierung positiver Kolonien mit der Kolonie-PCR und Bestätigung durch RFLP-Analyse wurde die Kan^R-Kassette in der zweiten homologen Rekombination vollständig entfernt. Die korrekte Insertion des Expressionskassette wurde erneut mit Kolonie-PCR, RFLP-Analyse (Abb. 17) und DNA-Sequenzierung überprüft.

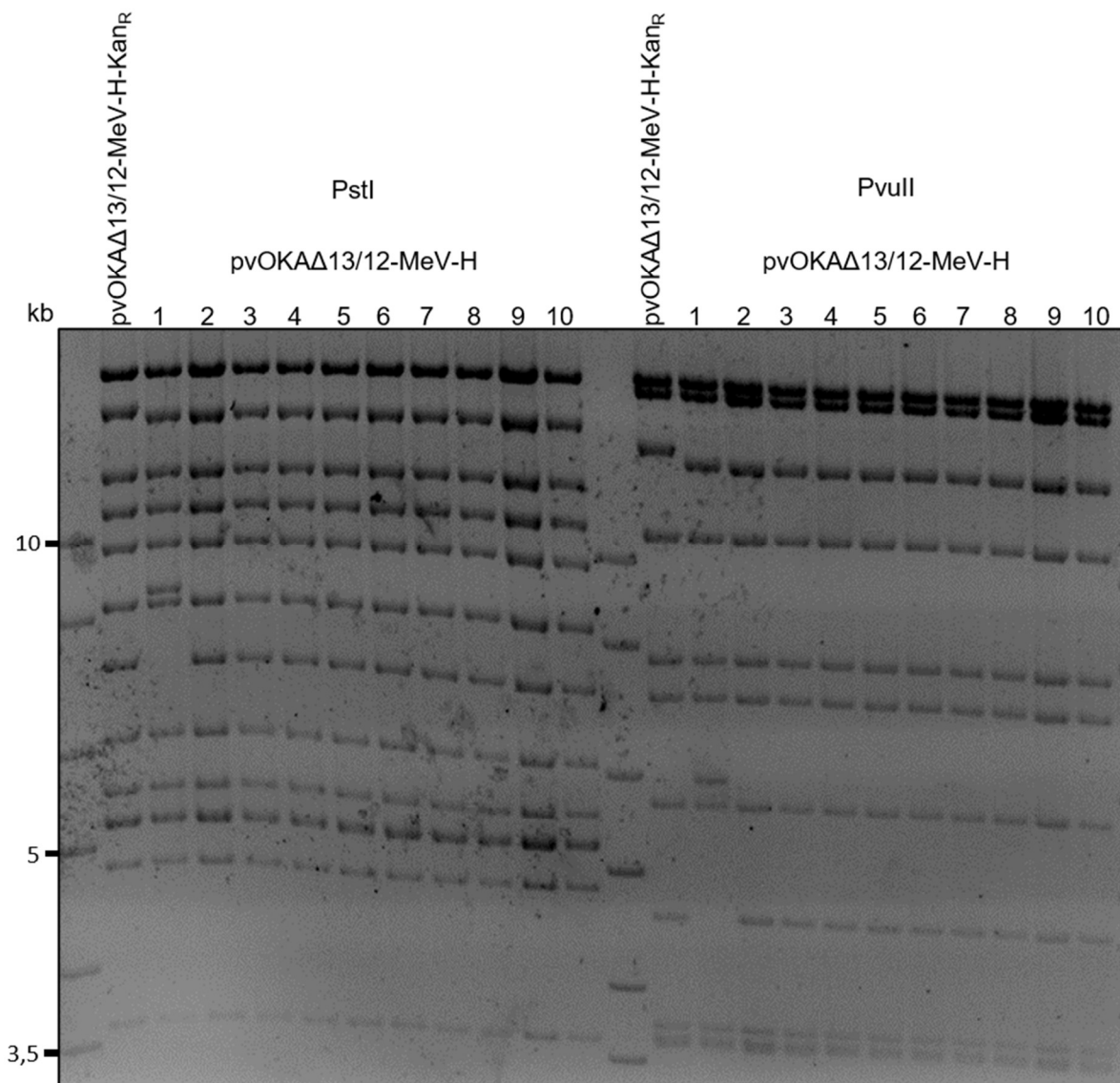


Abb. 17: RFLP-Analyse von pvOKA Δ 13/12-MeV-H. Klone, die in der Kolonie-PCR positiv getestet wurden, wurden mit der RFLP-Analyse untersucht. Hierfür wurden Plasmid-Minipräparationen durchgeführt. Die isolierte DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease PstI bzw. PvuII inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem 0,6%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet. Klone 2-10 zeigten das erwartete Bandenmuster und wurden mit DNA-Sequenzierung bestätigt.

Zusätzlich sollte ein BAC mit beiden Masernantigen-Expressionskassetten erstellt werden. Das BAC pvOKA Δ 13/12-MeV-H diente nun als Empfängerstamm für die Expressionskassette MeV-F-Kan^R. Die Masernvirussequenz wurde mit dem Primerpaar HF2902/2903 amplifiziert und durch homologe Rekombination in das BAC pvOKA Δ 13/12-MeV-H stromabwärts der MeV-H-Kassette inseriert. Die Antibiotika-Resistenz-Kassette wurde im zweiten Rekombinationsschritt entfernt. Auch die Überprüfung dieses Konstruktes verlief bis hin zur Sequenzbestimmung. Die Überprüfung der korrekten Insertion erfolgte zunächst mit der Kolonie-PCR. Die hier positiven Klone wurden mit RFLP-Analyse (Abb. 18) und DNA-Sequenzierung getestet.

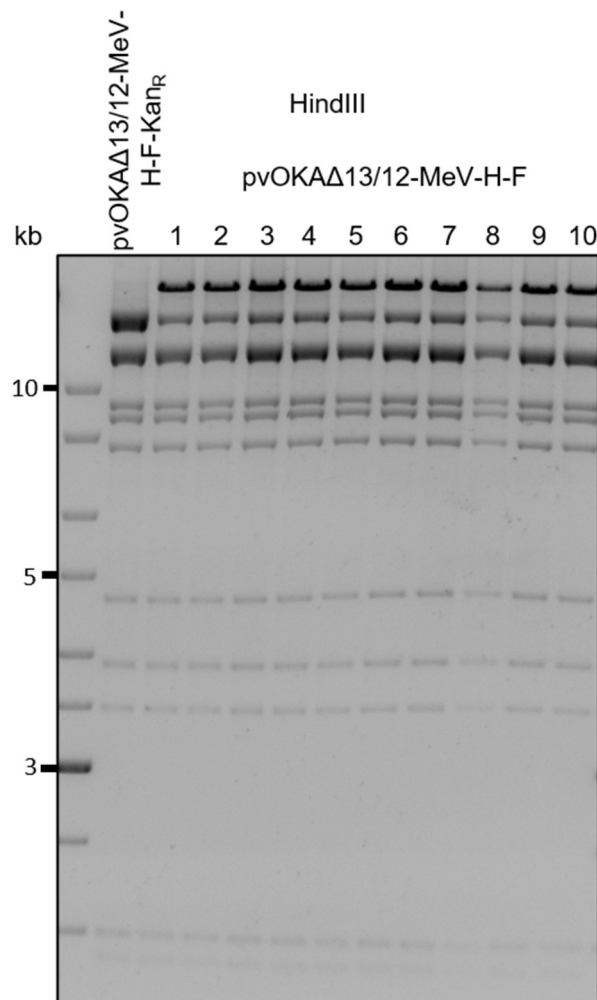


Abb. 18: RFLP-Analyse von pvOKA Δ 13/12-MeV-H-F. Klone, die in der Kolonie-PCR positiv getestet wurden, wurden mit der RFLP-Analyse untersucht. Plasmid-DNA-Minipräparationen der positiven Kolonien wurde mit HindIII inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem 0,6-%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet. Alle Proben zeigten das erwartete Bandenmuster.

3.2.4 Herstellung der Insertionsmutante pvOKA Δ 13-MeV-H

Alternativ sollte die Expressionskassette MeV-H-Kan^R statt zwischen ORF17 und 18 anstelle des ORF13 in das BAC-Genom eingefügt werden. Als Ausgangstamm diente das BAC pvOKA Δ 13. Mit dem Primerpaar HF3086/3087 wurde in einer PCR die Expressionskassette MeV-H-Kan^R von dem Plasmid pcDNA-MeV-H-Kan^R amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde durch Transformation in den pvOKA Δ 13 tragenden *E.-coli*-Stamm GS1783 transformiert. Klone der ersten homologen Rekombination konnten durch Selektion auf Kan-haltigem LB-Medium selektiert werden. Die Überprüfung der Klone erfolgte mit der Kolonie-PCR und der RFLP-Analyse. Durch die zweite homologe Rekombination wurde die Kan^R-Kassette aus dem BAC entfernt. Auch hier erfolgte eine Überprüfung der Klone mit Kolonie-PCR und RFLP-Analyse (Abb. 19). Die Sequenz der Expressionskassette mit den flankierenden Bereichen wurde abschließend durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt. Das BAC pcDNA-MeV-H stand nun für die Rekonstitutionsexperimente zur Verfügung.

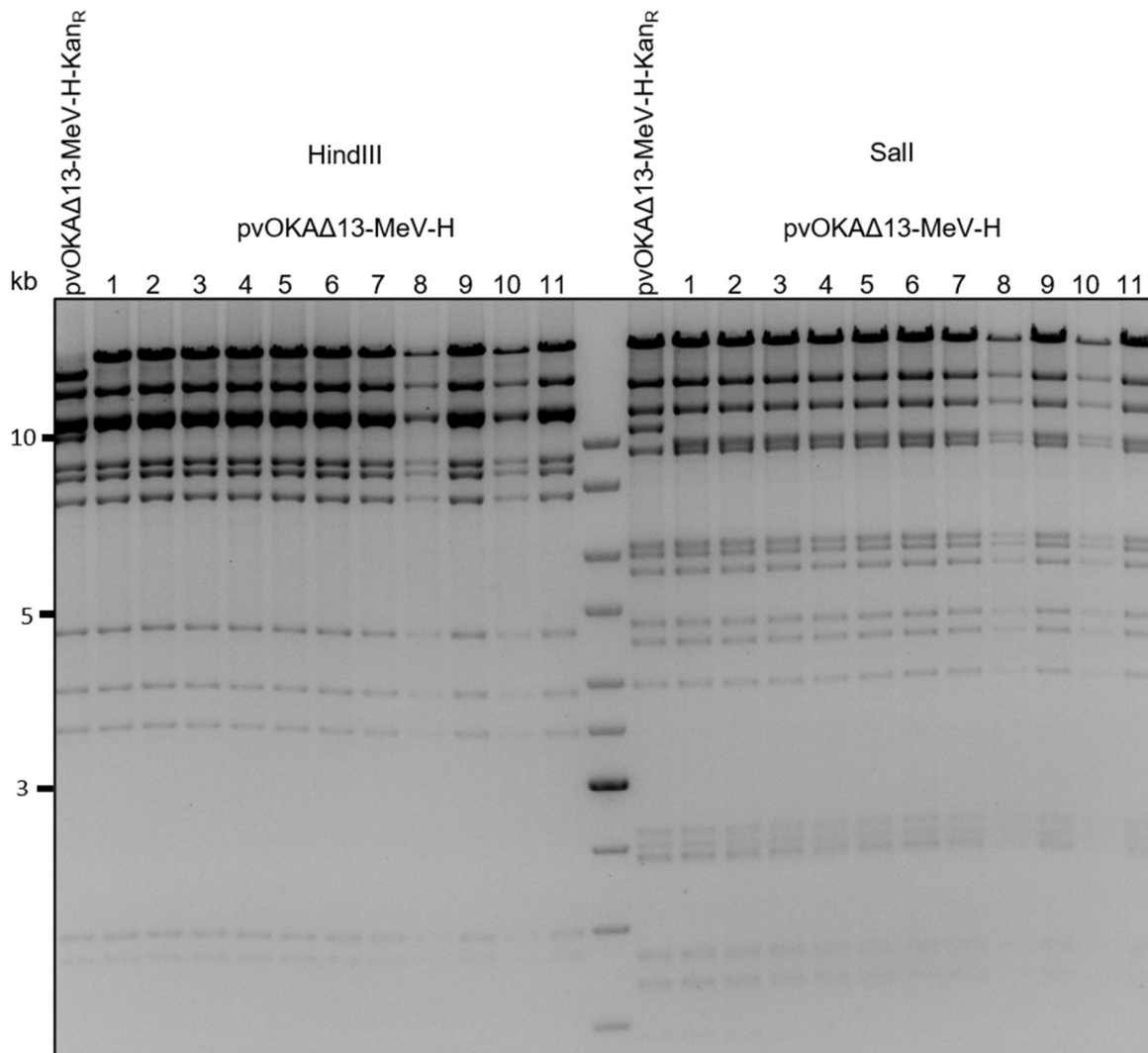


Abb. 19: RFLP zur Bestätigung der genomischen Struktur der Insertionsmutante pvOKA Δ 13-MeV-H. Nach der Kolonie-PCR wurden positive Klone mit der RFLP-Analyse untersucht. Die BAC-DNA wurde mit HindIII bzw. Sall inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem 0,6-%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet. Sämtliche getestete Klone zeigten das erwartete Bandenmuster.

Ergänzend sollte die MeV-F-Kan^R-Expressionskassette in das BAC pvOKAΔ13-MeV-H eingebracht werden. Die Insertionsstelle lag direkt am 3'-Ende der MeV-H-Expressionskassette. Mit dem Primerpaar HF3164/3163 und dem Plasmid pBS-PGK-MeV-F-Kan^R wurde eine PCR durchgeführt. Nach Reinigung wurde das PCR-Produkt in den *E.-coli*-Stamm GS1783 mit dem BAC pvOKAΔ13-MeV-H transformiert. Trotz mehrfacher Wiederholung der Transformation konnten nach der ersten homologen Rekombination aber keine selektierbaren Klone isoliert werden.

3.2.5 Herstellung der RuV-E2E1-Insertionsmutanten

Die Expressionskassette RuV-E2E1-Kan^R sollte zunächst in das BAC pvOKAΔ13/12 zwischen ORF17 und ORF18 inseriert werden. Hierfür wurde eine PCR mit dem Primerpaar HF2929/2930 und dem Plasmid pORF-RuV-E2E1-Kan^R durchgeführt. Die Expressionskassette wurde dann in den Bakterienstamm GS1783 mit dem BAC pvOKAΔ13/12 transformiert. Die erste homologe Rekombination wurde mit Kolonie-PCR und RFLP-Analyse bestätigt. In der zweiten Rekombination wurde die Kan^R aus dem BAC entfernt. Durch Sequenzierung der Expressionskassette wurde eine Deletion von vier aufeinanderfolgenden Nukleotiden im kodierenden Bereich festgestellt. Zur Wiederherstellung der ursprünglichen Nukleotidsequenz sollte die Deletion mit der *en-passant*-Mutagenese rückgängig gemacht werden.

Hierfür erfolge eine Amplifikation der Kan^R-Kassette mit dem Primerpaar HF3350/3351 und dem Plasmid pEP-Kan^R-S2. Das PCR-Produkt wurde anschließend in den pvOKAΔ13/12-RuV-E2E1 tragenden *E.-coli*-Stamm GS1783 transformiert. Die beiden homologe Rekombinationsschritte wurden durchgeführt. Die Überprüfung erfolgte mit Kolonie-PCR und RFLP-Analyse. Mit der DNA-Sequenzierung konnte abschließend die erfolgreiche Wiederherstellung nachgewiesen werden. Die RuV-E2-E1-Kassette und der flankierende Bereich konnten in ihrer Richtigkeit bestätigt werden. Das BAC wurde pvOKAΔ13/12-RuV-E2E1-Mut benannt und stand für Rekonstitutionsversuche zur Verfügung.

Zusätzlich sollte die Expressionskassette RuV-E2E1-Kan^R in die Position ORF13 des BAC pvOKAΔ13 eingebracht werden. Hierfür erfolgte eine Amplifikation der Insertionskassette mit dem Primerpaar HF3162/3163 und dem Plasmid pORF-RuV-E2E1-Kan^R. Trotz mehrfacher Wiederholung gelang es aber schon nach der ersten Rekombination nicht, Kolonien auf Kan- und Chloramphenicol-haltigem LB-Medium zu erhalten.

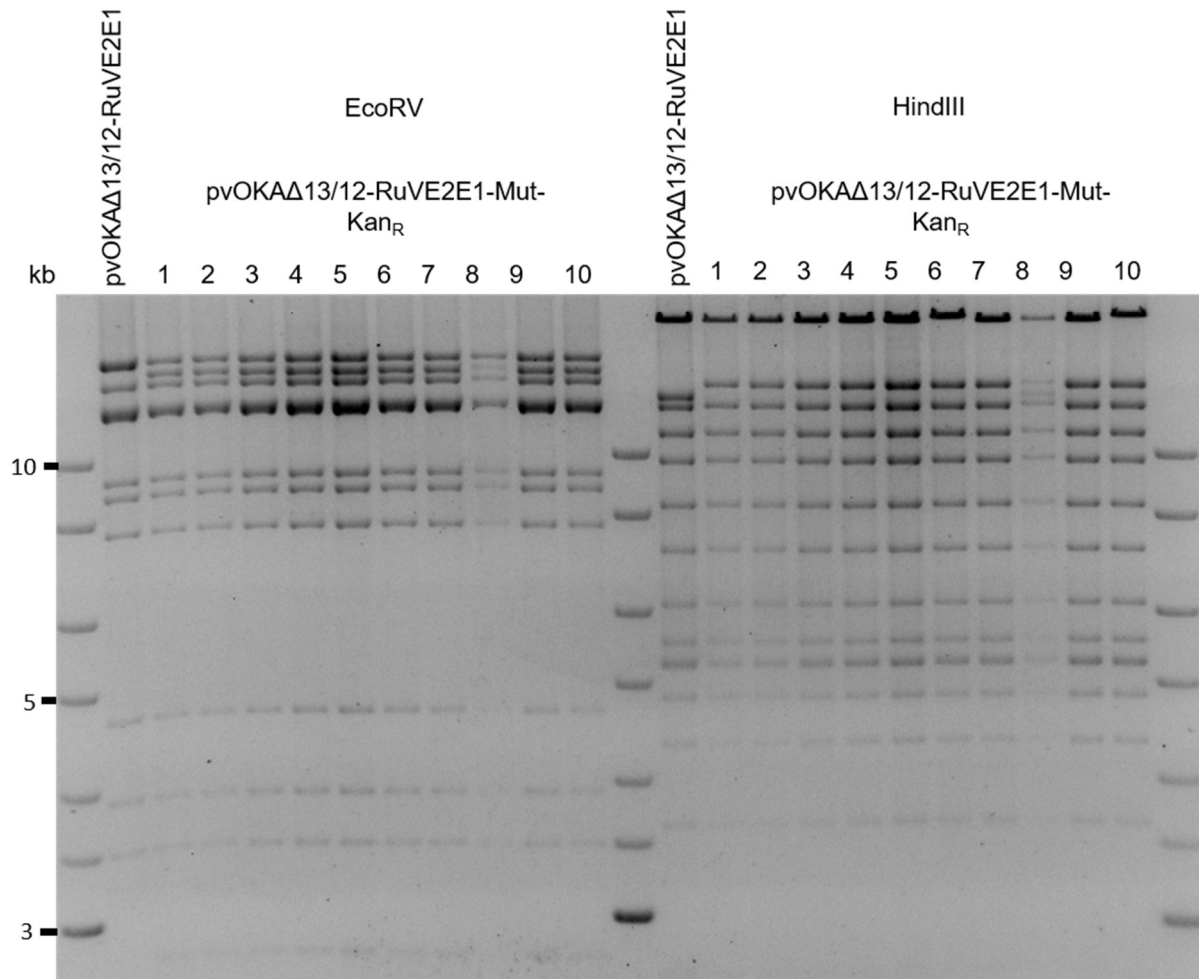


Abb. 20: RFLP-Analyse nach erster homologer Rekombination der Insertionsmutante *pvOKAΔ13/12-RuVE2E1-Mut-Kan_R*. Nach der Kolonie-PCR wurden positive Klone mit der RFLP-Analyse untersucht. BAC-DNA wurde mit EcoRV bzw. HindIII inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem 0,6%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet.

3.3 Virusrekonstitution aus BAC-DNA

Zur Untersuchung der Replikationseigenschaften und zum Nachweis der Expression viraler Fremdgene sollten die veränderten BACs durch Lipofektion der permissiven Melanomzelllinie MeWo rekonstituiert werden. Als Zeichen für eine erfolgreiche Virusrekonstitution zeigten sich makroskopisch und mikroskopisch nach 5-7 d erste CPEs. Die adhärenenten Zellen wurden bis zu einer maximalen Infektionsrate kultiviert, anschließend mit Trypsin von den Kulturgefäßen gelöst und für spätere Untersuchungen bei -80 °C gelagert. Von den Deletionsmutanten und der Insertionsmutante rvOKA Δ 13-MeV-H konnten replikationsfähige, rekombinante Viren rekonstituiert werden. Drei Insertionsmutanten konnten allerdings trotz vielfacher Wiederholungen nicht rekonstituiert werden. Zur besseren Übersicht sind die Plasmid- und BAC-Konstrukte, sowie das replikationsfähige Virus, welches in dieser Arbeit hergestellt wurde, in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Liste der in dieser Arbeit erstellten Plasmidkonstrukte, BAC-Varianten und rekonstituierten Viren.

| Expressionskassette | Insertionsstelle | Empfängerstamm | BAC-Konstrukt | Rekonstitution |
|------------------------------|-------------------|-----------------------------------|---|----------------------------------|
| MeV-H-Kan ^R | zwischen ORF17/18 | pvOKA Δ 13/12 | pvOKA Δ 13/12-MeV-H | nicht möglich |
| MeV-H-Kan^R | ORF13 | pvOKAΔ13 | pvOKAΔ13-MeV-H | replikationsfähiges Virus |
| MeV-F-Kan ^R | 3'-Ende von MeV-H | pvOKA Δ 13/12- MeV-H | pvOKA Δ 13/12-MeV-H-F | nicht möglich |
| MeV-F-Kan ^R | 3'-Ende von MeV-H | pvOKA Δ 13-MeV-H | keine Transformation möglich | - |
| RuV-E2E1-Kan ^R | zwischen ORF17/18 | pvOKA Δ 13/12 | pvOKA Δ 13/12-RuV-E2E1-Mut | nicht möglich |
| RuV-E2E1-Kan ^R | ORF13 | pvOKA Δ 13 | keine Transformation möglich | - |

3.4 Replikationskinetiken

Mit rvOKA Δ 13MeV-H konnte in dieser Arbeit ein rekombinantes, replikationsfähiges Vektorvirus rekonstituiert werden. Zunächst sollten die Replikationseigenschaften des rekombinanten Virus untersucht werden. Dazu wurden Replikationskinetiken mit rvOKA sowie rvOKA Δ 13 als Kontrolle durchgeführt. Das Experiment wurde insgesamt dreimal in Quadruplikaten durchgeführt. Da der Titer des Inokulats in den aufgetauten Röhrchen schwanken kann, wurden die Werte auch auf einen gemeinsamen Ausgangswert normalisiert. Die Insertionsmutante rvOKA Δ 13MeV-H zeigte im Vergleich zu den Kontrollstämmen rvOKA und rvOKA Δ 13 keine relevant veränderte Replikationskinetik (Abb. 21 und 22). Somit kann von einer ausreichenden Replikation des rekombinanten Virus in Zellkultur zur weiteren Charakterisierung ausgegangen werden.

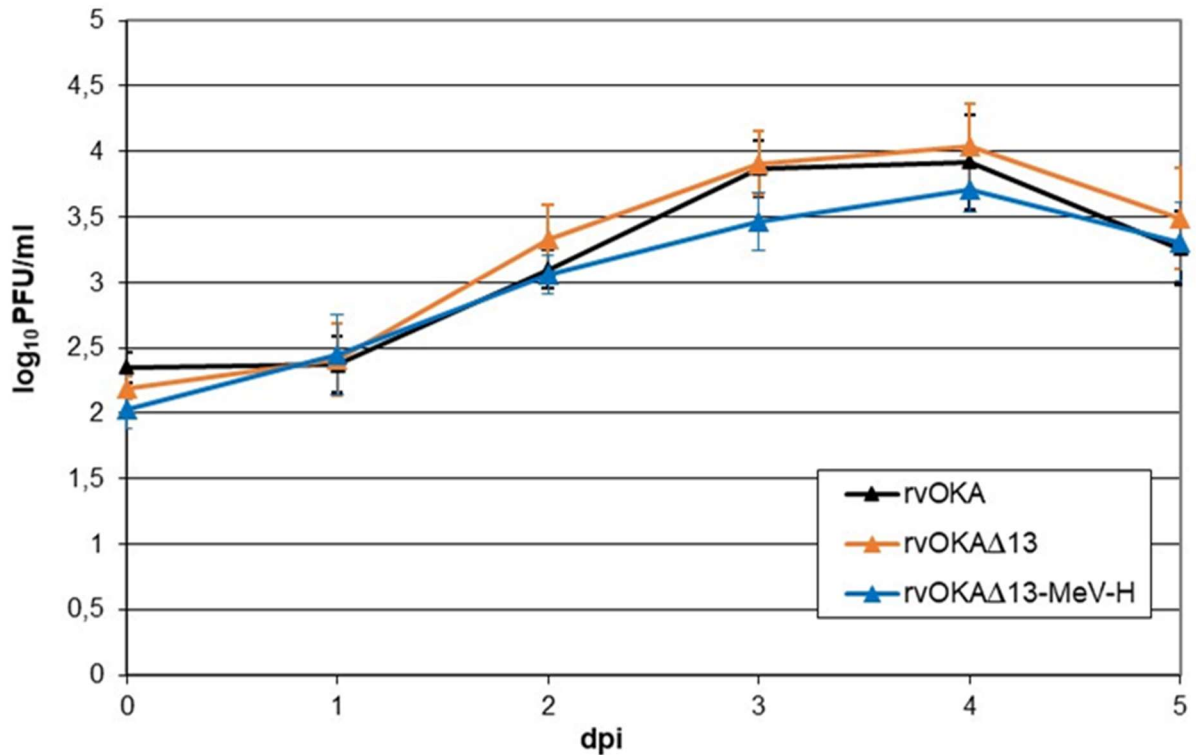


Abb. 21: Replikationskinetik rvOKAΔ13MeV-H. Die Ergebnisse der Replikationskinetik stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Quadruplikate durchgeführt wurden. Als Kontrolle dienten Viren der ebenfalls rekonstituierten Ausgangsstämme rvOKA und rvOKAΔ13. Die Zeit wurde in Tagen nach Infektion (dpi) angegeben.

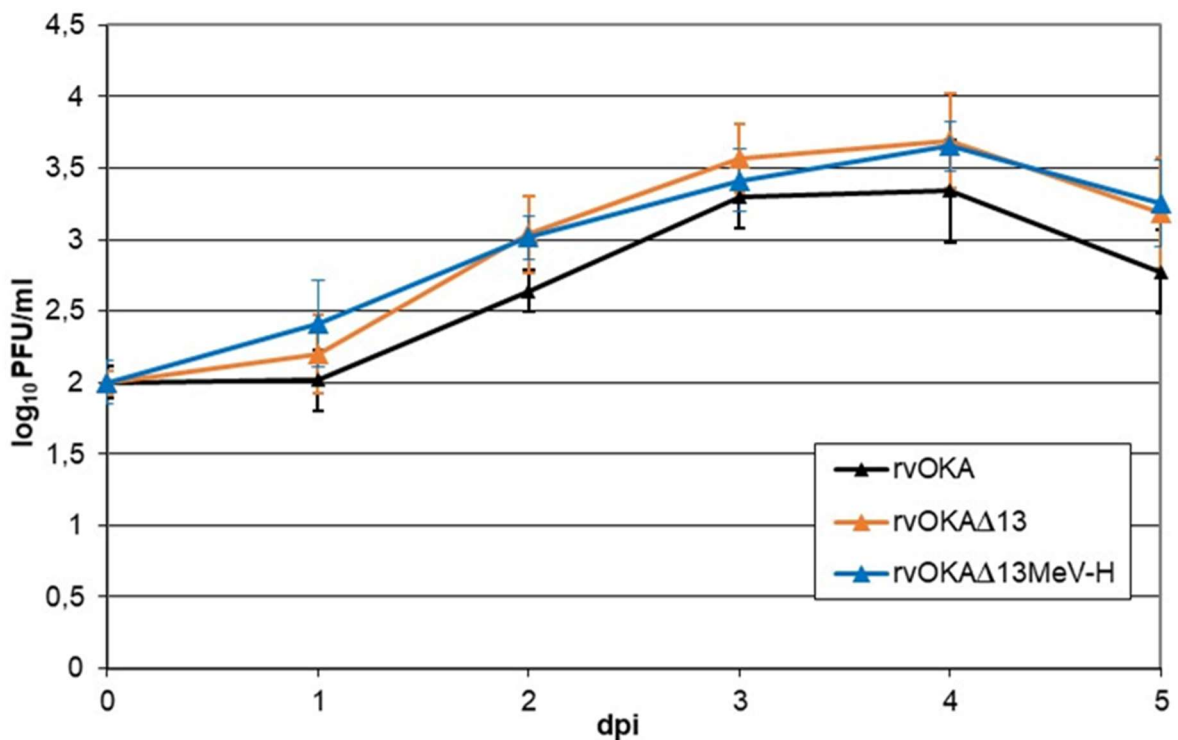


Abb. 22: Replikationskinetik rvOKAΔ13MeV-H, normalisiert. Aufgrund methodischer Ungenauigkeiten bei der PFU-Bestimmung schwanken die Ausgangswerte an Tag 0. Zur Darstellung möglicher Unterschiede der Replikationseigenschaften aufgrund unterschiedlicher Virustiter an Tag 0 wurden die Daten rechnerisch auf einen gleichen Ausgangswert an Tag 0 normalisiert.

3.5 DNA-Nachweis des MeV-H-Gens in infizierten MeWo-Zellen

Zum Nachweis der Deletion von ORF13 und der Insertion von MeV-H in dem rekonstituierten Virus wurden Zelllysate aus infizierten MeWo-Zellen hergestellt. Vier Primerpaare wurden ausgewählt. Zunächst wurde mit HF3214/2852 zum Nachweis der Insertion in das VZV-Genom ein Bereich aus dem MeV-H-Gen amplifiziert. Zur Dokumentation der ORF13-Deletion im rekonstituierten Virus wurde auch hier ein Bereich aus dem entsprechenden Leserahmen amplifiziert (HF1015/1053). Zum Nachweis von VZV-DNA in den Proben wurde ein separater Bereich aus dem ORF30 amplifiziert (HF1214/1215). Als zelluläre Kontrolle wurde ein Teil des GAPDH-Gens amplifiziert (HF3211/3212). Ein Signal für ORF13 konnte lediglich im Ausgangsstamm rvOKA nachgewiesen werden. In der Deletionsmutante rvOKA Δ 13 und der Insertionsmutante fehlte das Signal, was das Fehlen des ORF13 auch im rekonstituierten Virus bestätigt. Im Zelllysate von mit rvOKA Δ 13-MeV-H infizierten MeWo-Zellen konnte das MeV-H-Signal nachgewiesen werden (Abb. 23).

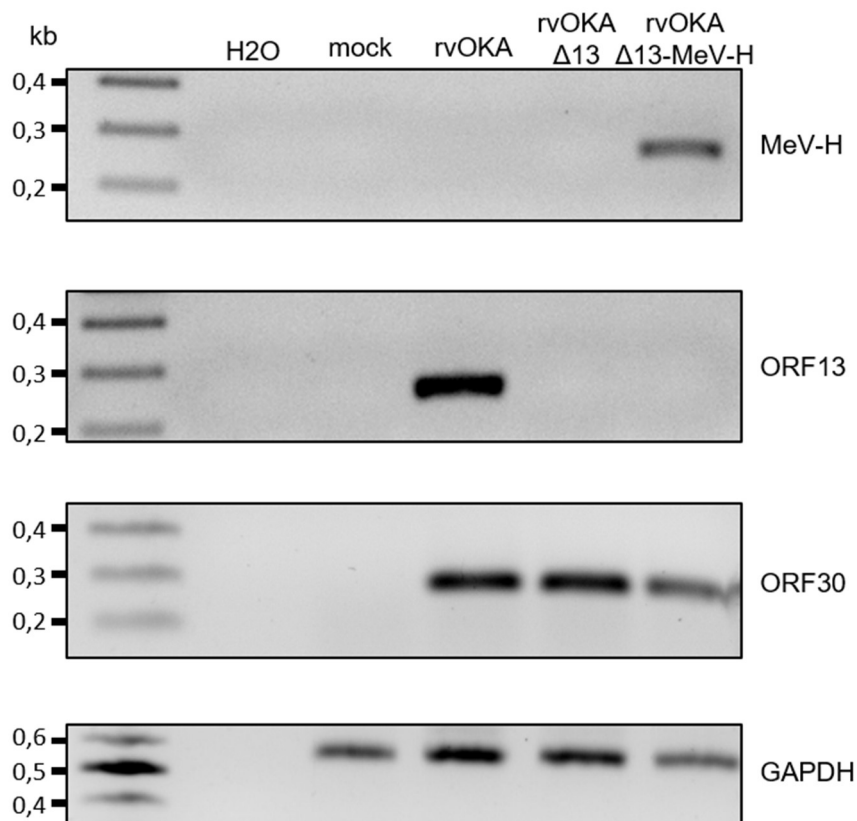


Abb. 23: Nachweis der MeV-H-DNA in infizierten Zellen. Die DNA wurde aus Zelllysaten infizierter MeWo-Zellen isoliert und mit einer PCR für das MeV-H Gen und den ORF13 amplifiziert. Als Virus-Kontrolle diente ORF30 und als Zellkontrolle GAPDH. Die Elektrophorese erfolgte in einem 1-%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet. Erwartete Fragmentgrößen und Primerpaare: MeV-H-Gen (HF3214/2852), 264 bp; ORF13 (HF1015/1053), 250 bp; ORF30 (HF1214/1215), 271 bp; GAPDH (HF3211/3212), 600 bp.

3.6 Transkriptnachweis des MeV-H-Gens in infizierten MeWo-Zellen

Die Expression des Masernantigens in rvOKA Δ 13-MeV-H wurde sowohl auf Transkript- als auch auf Translationsebene überprüft. Der Transkriptnachweis erfolgte mit der RT-PCR. Hierfür wurden MeWo-Zellen mit den rekombinanten Viren infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurde die RNA isoliert. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem *RT2-FirstStrand* Kit. Zum Nachweis der Transgenexpression wurde die cDNA verschiedenen PCR-Ansätzen zugeführt. Der Nachweis des GAPDH-Transkriptes diente als zelluläre Positivkontrolle. Die Negativ-Kontrollen dienten dem Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse aufgrund einer etwaigen DNA-Kontamination. In der Probe der Insertionsmutante zeigte sich mit den Primerpaar HF3214/2852 zum Nachweis des MeV-H-Transkriptes eine Bande auf der erwarteten Position von 264 bp (Abb. 24). Hiermit konnte die Transkription des MeV-H-Gens in mit rvOKA Δ 13-MeV-H infizierten MeWo-Zellen bestätigt werden.

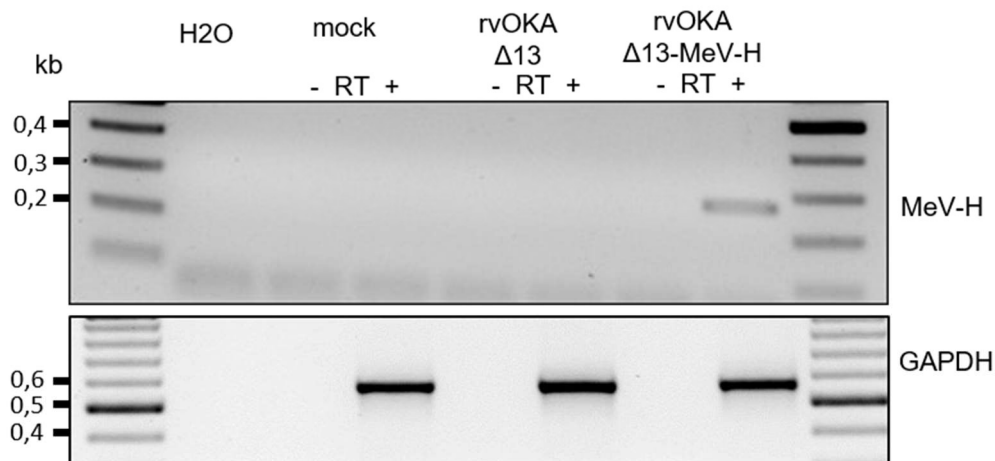


Abb. 24: RT-PCR zum Nachweis des MeV-H Transkriptes. Die RNA wurde aus infizierten MeWo-Zellen isoliert. Als zelluläre Kontrolle wurde ein Abschnitt des GAPDH-Gens amplifiziert. Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse aufgrund etwaiger DNA-Kontamination in den Proben dienten Negativ-Kontrollen vor Reverse Transkription (RT -). Die Elektrophorese erfolgte in einem 1%-igem Agarosegel. Der *GeneRuler DNA Ladder Mix* wurde als Größenmarker verwendet. Erwartete Fragmentgrößen und Primerpaare: MeV-H-Transkript (HF3214/ 2852), 264 bp; GAPDH (HF3211/3212), 600 bp.

3.7 Nachweis der MeV-H-Proteinexpression in infizierten MeWo-Zellen

3.7.1 Nachweis der Proteinexpression durch Immunfluoreszenz

Die Translation des MeV-H-Gens sollte mit der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Zunächst wurden MeWo-Zellen in 24-well-Platten ausgesät und mit rvOKA Δ 13-MeV-H infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte, mit rvOKA infizierte und mit rvOKA Δ 13 MeWo-Zellen. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Mit der Immunfluoreszenz sollten das VZV-spezifische Glykoprotein gE und das Hämagglutinin des Maservirus MeV-H nachgewiesen werden. Der Nachweis des VZV gE erfolgte mit einem gE-spezifischen Maus-Antikörper. Als sekundärer Antikörper diente anti-Maus-AlexaFluor488. Anschließend konnte die Fluoreszenz mikroskopisch detektiert und dokumentiert werden (Abb. 25).

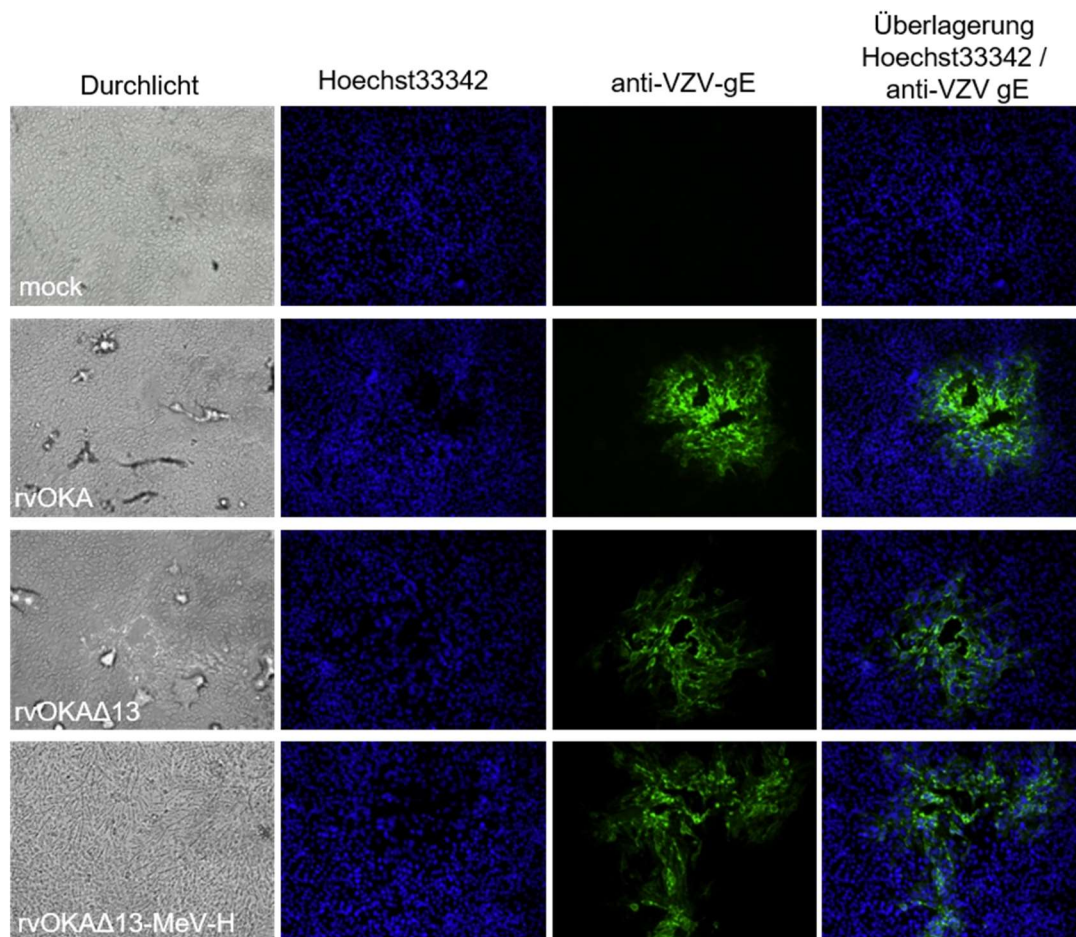


Abb. 25: Immunfluoreszenz zum Nachweis des VZV-spezifischen gE in infizierten MeWo-Zellen. MeWo-Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus rvOKA Δ 13-MeV-H infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen sowie MeWo-Zellen, die mit rvOKA, und rvOKA Δ 13 infiziert wurden. Nach 3 d wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. VZV spezifischer Nachweis: Maus anti-VZV-gE und AlexaFluor488 anti-Maus.

Zum Nachweis des MeV-H-Proteins diente ein polyklonales anti-MeV-H Kaninchenserum, das durch Frau Prof. Dr. Sibylle Schneider Schaulies aus Würzburg zur Verfügung gestellt wurde.

Als sekundärer Antikörper wurde anti-Kaninchen-AlexaFluor488 gewählt. Der Zellkern wurde mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 gefärbt.

Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden Fotos der CPEs mit einem Fluoreszenzmikroskop angefertigt. In allen infizierten Zellen konnte ein Signal für den VZV IgE-Antikörper nachgewiesen werden, welches bei den nicht-infizierten Zellen fehlte. Zum Nachweis des MeV-H-Proteins zeigte sich die erwartete grüne Fluoreszenz deutlich in den CPEs von rvOKA Δ 13-MeV-H infizierten MeWo-Zellen (Abb. 26). Somit konnte auch die Expression des Masernvirus-Hämagglutinin durch das rekombinante VZV nachgewiesen werden. Eine klare morphologische Zuordnung des Expressionsortes ist aufgrund der Überlagerung mehrerer Zelllagen in diesem Versuch aber nicht möglich.

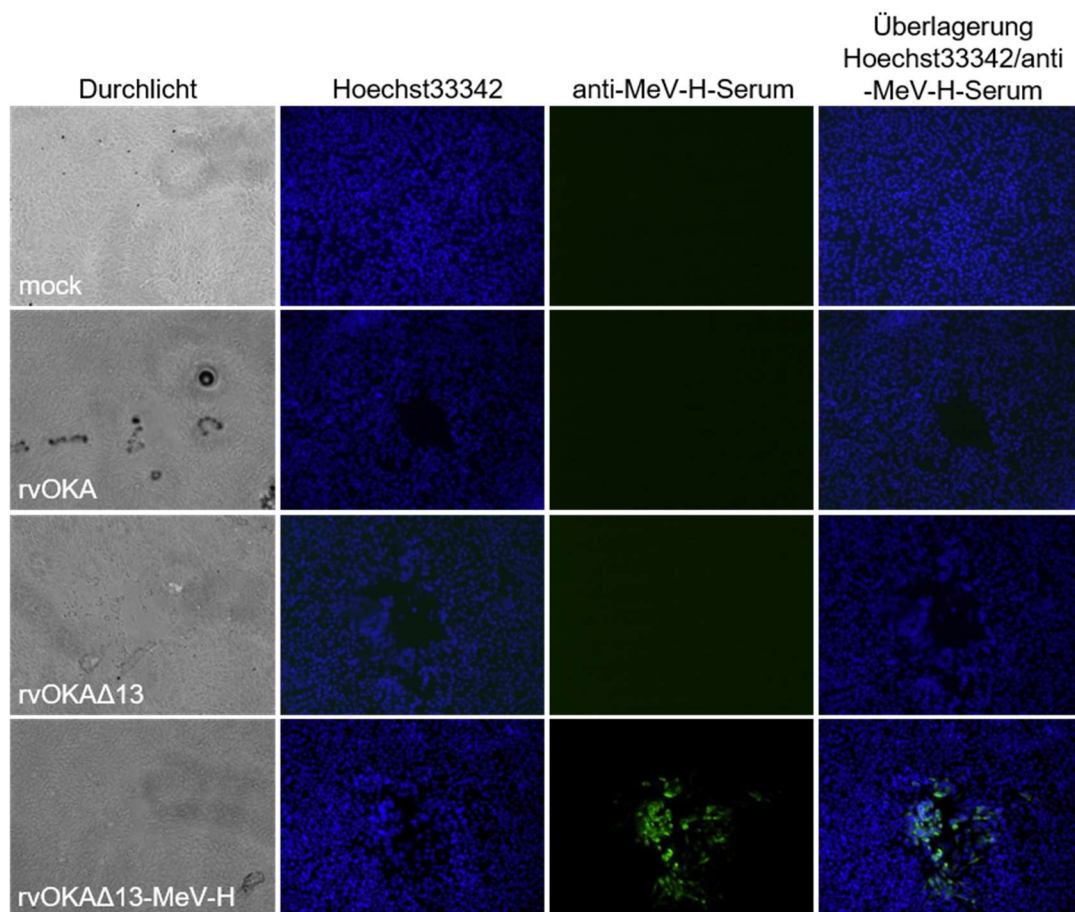


Abb. 26: Immunfluoreszenz zum Nachweis des MeV-H Proteins in infizierten MeWo-Zellen. MeWo-Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus rvOKA Δ 13-MeV-H infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen sowie MeWo-Zellen, die mit rvOKA, und rvOKA Δ 13 infiziert wurden. Nach 3 d wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Zum Nachweis des MeV-H Proteins wurde ein Kaninchen-anti-H-Serum verwendet, das von Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies zur Verfügung gestellt wurde. Als sekundärer Antikörper diente anti-Kaninchen-AlexaFluor-488.

3.7.2 Nachweis der Proteinexpression durch Immunblot

Für den zusätzlichen Nachweis der Fremd-Proteinexpression und zur Bestimmung der molekularen Proteingröße erfolgte die Immunblot-Untersuchung. Hierfür wurden MeWo-Zellen mit rvOKA Δ 13 und rvOKA Δ 13-MeV-H infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden mit Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend in einem *semi-dry*-Blot-System auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Zum Nachweis des H-Proteins diente das MeV-H-Serum, zur Detektion wurde der sekundäre Antikörper anti-Kaninchen-HRP verwendet. Dieser konnte durch ein Chemolumineszenz-Substrat nachgewiesen werden (Abb. 27).

Als zelluläre Kontrolle diente eine Färbung von β -Actin. Hierbei konnte in allen Proben eine ausreichende Beladung mit zellulären Proteinen dokumentiert werden. Eine spezifische Bande konnte für rvOKA Δ 13-MeV-H mit dem H-Serum auf Höhe von 69 kDa detektiert werden, welches der erwarteten molekularen Masse des MeV-H Proteins entspricht. Diese Bande fehlte in den übrigen Ansätzen. Hiermit konnte die Expression des Masernvirus-Hämagglutinin durch den rekombinanten VZV-OKA-Vektor rvOKA Δ 13-MeV-H nachgewiesen werden. Die hier bestimmte molekulare Masse von etwa 69 kDa entspricht der Größe des natürlich vorkommenden Masernproteins.

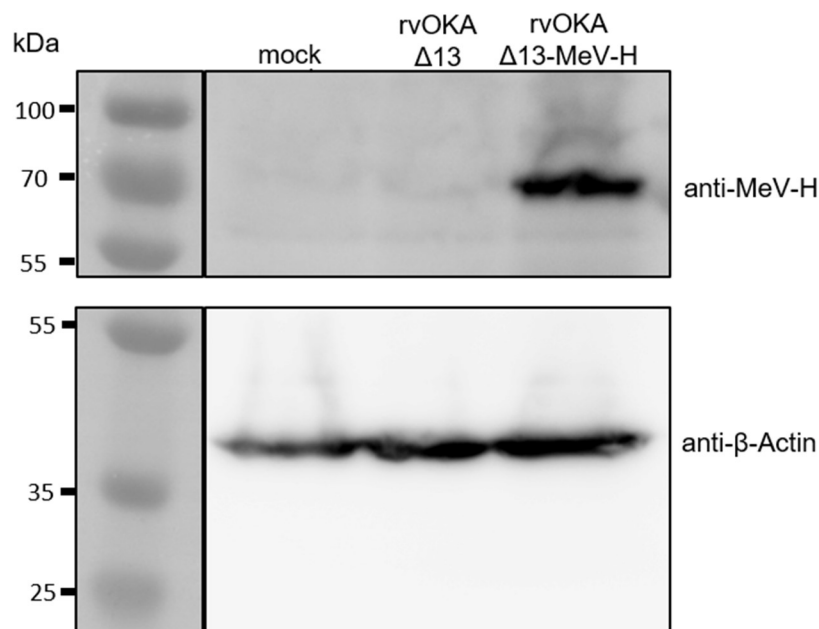


Abb. 27: Westernblot zum Nachweis des MeV-H-Proteins in infizierten MeWo-Zellen. Zur primären Färbung des MeV-H-Proteins diente ein Kaninchen-Antiserum gegen-MeV-H, das von Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies aus Würzburg zur Verfügung gestellt wurde. Als zelluläre Kontrolle diente β -Actin. Zur Detektion wurden sekundäre, HRP-gekoppelte Antikörper verwendet. Der *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* wurde als Größenmarker genutzt. Erwartete Molekularmassen: MeV-H 69 kDa; β -Actin 42 kDa.

4. Diskussion

Die Entwicklung und Verwendung von Impfstoffen führte zu einem massiven Rückgang der Inzidenz verschiedener impfpräventabler Infektionserkrankungen (Roush et al., 2007) und ermöglichte im Jahr 1978 die weltweite Eradikation der Pocken (Strassburg, 1982). Grundlegend für die Entwicklung von Impfstoffen waren die Impfversuche, die Edward Jenner bereits im 18. Jahrhundert mit Kuhpocken durchführte und die bei dem Geimpften eine Immunität gegen die Pocken erzeugten (Jenner, 1798). Seither wurden neben passiven Immunisierungen zahlreiche Impfstoffe zur aktiven Immunisierung hergestellt. Im Wesentlichen handelt es sich hierbei um Tot- oder um Lebendimpfstoffe in Form attenuierter Viren. Aktuell stehen die Polioviren, das Masernvirus und das Rötelnvirus im Zentrum der Eliminationsstrategien der Weltgesundheitsorganisation.

4.1 Rekombinante Vektorimpfstoffe

Gegen eine Vielzahl von Infektionserregern konnten auf konventionellem Weg jedoch keine wirksamen Impfstoffe hergestellt werden. Ein neuerer Ansatz ist dafür die Herstellung rekombinanter Impfvektoren, die nach Applikation zu einer intrazellulären Expression immunrelevanter Antigene des entsprechenden Erregers führen (Koff & Schenkelberg, 2019). Diese Herangehensweise bietet verschiedene Vorteile. So können einzelne für die Auslösung einer Immunantwort relevanter Antigene eines Erregers ausgewählt werden. Hierdurch ist bei besonders pathogenen Erregern das Risiko einer Verbreitung und Erkrankung durch Rückmutationen des attenuierten Erregers ausgeschlossen. Zusätzlich verspricht eine Expression des Antigens im Rahmen der Replikation des Impfvirus eine stabilere zelluläre und humorale Antwort des Immunsystems als bei einem Totimpfstoff.

Das Paradigma für die Anwendung einer rekombinanten, Impfvektor-basierten Vakzine beim Menschen ist der Ebola-Impfstoff Ervebo® (rVSV-EBOV) der Firma MSD. Hierbei handelt es sich um ein rekombinantes Vesikuläres-Stomatitis-Virus, bei dem das Glykoprotein der VSV-Virushülle entfernt und nach dem Prinzip der Pseudotypisierung durch das Oberflächen-Glykoprotein des Zaire-Ebola-Virus ersetzt wurde (Geisbert & Feldmann, 2011). Im Rahmen des bisher schwersten Ebola-Ausbruchs im Jahr 2014 wurde der Impfstoff erstmalig bei Menschen im Rahmen klinischer Studien getestet und zeigte eine vollständige Schutzwirkung in Riegelungs-Ringimpfungen bei moderatem Nebenwirkungsprofil (Callendret et al., 2018; Henao-Restrepo et al., 2017; Regules et al., 2017). Das Nutzen-Risiko-Verhältnis wurde anschließend von der *Global Advisory Committee on Vaccine Safety* der Weltgesundheitsorganisation als positiv bewertet und ein weiterer Einsatz bei einem erneuten Ebola-Ausbruch im

Jahr 2018 befürwortet (World-Health Organization, 2019). Die Europäische Arzneimittel-Agentur ließ 2019 Ervebo® unter Vorbehalt zu.

Dasselbe Prinzip stellte sich für das Spike-Protein des mit dem Schweren Atemnotsyndrom assoziierten Coronavirus Typ 2 aber als nicht funktionell heraus. Bei diesem neuen pandemischen Erreger kommen bisher auch zwei in der Europäischen Union zugelassene unabhängig entwickelte, rekombinante, replikationsdefekte Adenovirusvektor-Impfstoffe zum Einsatz, mit hoher Wirksamkeit, aber mit sehr seltenen, relevanten unerwünschten Nebenwirkungen im Bereich der Blutgerinnung. Der Impfstoff Vaxzevria® von Astra-Zeneca basiert auf einem an der Universität Oxford entwickelten, replikationsdefekten Schimpansen-Adenovirusvektor und erfordert zwei Impfungen im Intervall zur vollständigen Impfung (Ramasamy et al., 2021). Der Impfstoff COVID-19 Vaccine Janssen wurde von Johnson & Johnson entwickelt, nutzt das menschliche Adenovirus 26 als replikationsdefekten Vektor und genügt zur vollständigen Impfung als Einzeldosis (Sadoff et al., 2021). Der in der Europäischen Union noch nicht zugelassene Adenovirus-Impfstoff Sputnik V aus russischer Entwicklung verwendet zwei unterschiedliche replikationsdefekte Adenovirusvektoren für zwei Injektionen. Erstmals kommen also im Rahmen der Coronavirus-Pandemie rekombinante, replikationsdefekte Impfstoffe bei Massenimpfungen zum Einsatz und weitere Vektor-Impfstoffe befinden sich in der Entwicklung.

4.2 Varicella-Zoster-Virus als Impfvektor

Bereits seit vielen Jahren werden einige weitere Viren als Impfvektoren getestet. VZV bietet bezogen auf eine spätere klinische Anwendung viele Vorteile (Gray, 2013). Die Größe des Genoms von 125 kb im Vergleich zu kleineren viralen Genomen bietet ausreichend Kapazität zur Aufnahme von Fremdsequenzen, was insbesondere für die Erstellung polyvalenter rekombinanter Impfstoffe von Bedeutung ist. Zudem konnte in Experimenten gezeigt werden, dass die Expression ein Spleißen der Fremdgene sowie posttranslationale Modifikationen entsprechend einer natürlichen Infektion ermöglicht und somit potenziell eine hohe Immunogenität erzeugt (Heineman et al., 2004). Durch Replikation des Impfvektors sowie durch die VZV-spezifischen, subklinischen Reaktivierungen aus der Latenz und der damit einhergehenden, wiederholten Präsentation der Fremdantigene ist eine andauernde Immunantwort anzunehmen (Schünemann et al., 1998).

Nicht zuletzt ist die Anwendung replikationsfähiger Viren auch mit einem Risiko der Übertragung und ggf. Erkrankung durch den Vektor verbunden. Eine entscheidende Anforderung an den Impfvektor ist daher die Sicherheit. Im Falle von VZV gibt es mit vOKA einen Impfstamm mit sehr gutem Risikoprofil und ausreichender Erfahrung in der klinischen Praxis.

Tab. 7: Übersicht über virale Gene in VZV-Impfvektor-Varianten.

| Virus | Virusantigen | Immunantwort (Tiermodell) | Quelle |
|---------------------------------|------------------------------------|---|--------------------------|
| Epstein-Barr-Virus | gp350 | nicht getestet | Lowe et al., 1987 |
| Hepatitis-B-Virus | HBs-Antigen | Antikörper-Produktion gegen HBs-Antigen | Shiraki & Takahara, 1993 |
| Herpes-Simplex-Virus Typ 2 | gD | neutralisierende Antikörper, abgeschwächter Verlauf der Infektion bei Meerschweinchen | Heineman et al., 1995 |
| Herpes-Simplex-Virus Typ 2 | gD und gB | neutralisierende Antikörper, milderer Verlauf einer Infektion bei Meerschweinchen | Heineman et al., 2004 |
| Humanes Immundefizienz-Virus | env-Glykoprotein | humorale und zelluläre Immunantwort | Shiraki et al., 2001 |
| Mumpsvirus | Hämagglutinin-Neuraminidase | neutralisierende Antikörper gegen Mumps | Somboonthum et al., 2007 |
| Mumpsvirus | Hämagglutinin- und Fusions-Protein | neutralisierende Antikörper auch gegen F-Protein | Matsuura et al., 2013 |
| Respiratorisches Syncytialvirus | Fusions-Glykoprotein | humorale Immunantwort bei Meerschweinchen | Murakami et al., 2015 |
| Simianes Immundefizienz-Virus | gp160 | neutralisierende Antikörper, verstärkte Infektion bei Affen | Staprans et al., 2004 |

In verschiedenen vorklinischen Experimenten wurden unterschiedliche heterologe Gene für virale Antigene in das VZV-Genom mit dem Ziel eingebracht, die Virusantigene nach Infektion zu exprimieren und eine Immunantwort zu induzieren (Tab. 7). Hierbei wurden unter anderem Vertreter der Herpesviren ausgewählt. Das Glykoprotein gp380 aus dem Epstein-Barr-Virus konnte in Zellkultur erfolgreich exprimiert werden. Tierversuche wurden allerdings nicht durchgeführt (Lowe et al., 1987). Mit der Expression des viralen Antigens gD und gB des Herpes-Simplex-Virus Typ 2 konnte bei Meerschweinchen die Bildung neutralisierender Antikörper sowie ein abgeschwächter Infektionsverlauf beobachtet werden (Heineman et al., 1995; Heineman et al., 2004).

Bei zwei Konstrukten wurden Antigene von Lentiviren verwendet. Die Expression des Env-Glykoproteins des Humanen Immundefizienz-Virus führte zur Ausbildung einer humoralen und zellulären Immunantwort nach Infektion von Meerschweinchen (Shiraki et al., 2001). Ein weiteres Konstrukt führte zur Expression des aus dem Simianen Immundefizienz-Virus stammenden Antigens gp160. Nach intramuskulärer Applikation bei Rhesus-Affen konnten Antikörper, allerdings ohne neutralisierende Wirkung detektiert werden. Eine zelluläre Immunantwort blieb aus. Erstaunlicherweise konnte nach Impfung eine erhöhte Virusreplikation und ein rascherer Progress zur Immundefizienz festgestellt werden (Staprans et al., 2004). Als mögliche Ursache diskutierten die Autoren eine ineffiziente Replikation des rekombinanten Impfvectors in Gewebe der Rhesusaffen, sowie eine erhöhte CD4-Zellproliferation, die eine Virusreplikation begünstigte.

Rekombinantes VZV, welches das Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen HBsAg exprimierte, konnte ebenfalls eine humorale Immunantwort im Tiermodell induzieren (Shiraki & Takahara, 1993). Auch gegen das Fusions-Glykoprotein des Respiratorischen Syncytial-Virus konnten mit Hilfe eines rekombinanten VZV-Impfvektors Antikörper bei Meerschweinchen gebildet werden (Murakami et al., 2015).

Eine japanische Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Herstellung eines VZV-basierten Impfvektors gegen das Mumpsvirus. Zunächst wurde ein Impfstamm generiert, der das Oberflächenantigen Hämagglutinin-Neuraminidase exprimierte. In Impfxperimenten mit Meerschweinchen konnten neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Somboonthum et al., 2007). Der Impfvektor wurde anschließend um ein weiteres Mumpsvirus-Antigen, das F-Protein erweitert, das ebenfalls zur Ausbildung einer humoralen Immunantwort führte (Matsuura et al., 2013).

4.3 Weiterentwicklung des Varicella-Zoster-Virus als Impfvektor

In dieser Arbeit sollten basierend auf dem VZV Impfstamm vOKA rekombinante, polyvalente potenzielle Impfviren erstellt werden. Hierfür wurden Expressionskassetten hergestellt, welche die impfrelevanten Oberflächenantigene des Masern- und des Rötelnvirus enthielten. Diese Kassetten sollten anschließend in den VZV vOKA-Stamm mittels *en-passant*-Mutagenese eingebracht werden und nach Transfektion permissiver Zellen sollte replikationsfähiges Virus rekonstituiert werden.

Drei verschiedene Expressionskassetten konnten in Transfervektoren erfolgreich kloniert werden. Der Vektor pcDNA-MeV-H besaß den Leserahmen für das Masernvirus-Antigen Hämagglutinin, der zwischen CMV-Enhancer-Promotor und dem BGH-Polyadenylierungs-Signal positioniert wurde. Das zweite, impfrelevante Masernvirus-Gen für das Fusionsprotein wurde in den Vektor pBS-PGK-MeV-F kloniert. Die Masernvirus-Antigene könnten somit einzeln oder auch gemeinsam in einen Impfvektor eingebracht werden. Die für das Rötelnvirus bekannten immunogenen Antigene RuV-E2 und RuV-E1 wurden entsprechend der Struktur im Virusgenom als ein Gen zwischen den Promotor des Humanen T-Zellleukämievirus und das Polyadenylierungs-Signal des Simianen Virus 40 kloniert. In vivo wird nach Infektion einer Zelle durch das Rötelnvirus das E2- und E1-Protein als Polyprotein translatiert und anschließend durch zelluläre Peptidasen in die funktionalen Einzelproteine gespalten (Oker-Blom et al., 1984). Durch Ausnutzen dieses natürlichen Mechanismus konnten beide Proteine unter Verwendung eines Promotors und eines Terminators im Impfvektor transkribiert werden. Hierdurch kann die Fremdsequenz im Impfvektor geringgehalten werden. Durch die Anwendung homologer Rekombinationen bei der *en-passant*-Mutagenese mussten repetitive Sequenzen

vermieden werden, die zu ungewollten Rekombinationsereignissen führen könnten. Daher sollten die viralen Fremdgene in den Expressionskassetten unter Kontrolle unterschiedlicher Promotor- und Terminatorsequenzen exprimiert werden. Unter Verwendung der in dieser Arbeit erstellten Expressionskassetten würden sich vier impfrelevante Antigene von zwei Viren unter Kontrolle von drei Promotor und Terminatorpaaren in einem polyvalenten Impfvektor exprimieren lassen können. Zum Ausschluss etwaiger zwischenzeitlicher Veränderungen wurden die Zwischenkonstrukte der Expressionskassetten ebenfalls auf verschiedenen Ebenen kontrolliert und abschließend wurde der Bereich des Fremdgens und der Promotor- und Terminatorabschnitte sequenziert und für korrekt befunden.

Im Rahmen der Sequenzierung der MeV-F-Kassette wurde allerdings eine Mutation im 3'-Bereich des MeV-F-Gens nachgewiesen. Eine Adenosinbase war in der Expressionskassette durch eine Guanosinbase ausgetauscht. Hierbei handelte es sich um eine stille Mutation, da beide Varianten des Codons in die Aminosäure Lysin translatiert werden. Aufgrund der identischen Sequenz des Proteins wurde die Kassette für die folgenden Experimente weiterverwendet. Im Fall einer relevanten Mutation hätte auf dieser Ebene eine gerichtete Rückmutation durch homologe Rekombination in mehreren Schritten durchgeführt und damit die ursprünglich beabsichtigte Sequenz wiederhergestellt werden können.

Die Expressionskassetten sollten in vOKA-BACs eingebracht werden. Als Empfängerstamm dienten unterschiedliche vOKA-Deletionsvarianten und Insertionsstellen im vOKA-Genom. Hierfür wurde zunächst ein Cluster aus drei, *in vitro* nicht essenziellen, offenen Leserahmen ausgewählt (ORF11-13). In Vorexperimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Deletion von ORF11 zu einer Verkleinerung der Plaquegröße und reduzierten Replikationsfähigkeit des Virus in Zellkultur führt (Daten nicht publiziert). ORF11 kodiert für ein RNA-bindendes Protein im Virustegument. Die Replikation in menschlicher Haut in SCID-Maus-Xenograft-Experimenten zeigte eine deutlich eingeschränkte Replikation der ORF11-Deletionsmutante. Interessanterweise wurden in Zellkulturexperimenten bisher aber keine wesentlichen Unterschiede der Replikationsfähigkeit nachgewiesen (Che et al., 2008; Zhang et al., 2010).

Zur Sicherstellung, damit *in vitro* ausreichend replikationsfähiges Virus erhalten werden kann, wurde aufgrund der Vorexperimente bei dem Empfängerstamm dennoch auf eine Deletion von ORF11 verzichtet. Daher wurden nur ORF13 und ORF12 deletiert. Die Deletionsmutanten pvOKA Δ 13 und pvOKA Δ 13/12 wurden hinsichtlich zahlreicher Aspekte bis hin zur Sequenzierung der Deletionsstelle und deren Umfeld überprüft und standen nun als Empfängerstämme zur Verfügung.

Perspektivisch soll eine Deletionsvariante angestrebt werden, die durch Deletion sämtlicher *in vitro* nicht essenziellen Leserahmen zum einen eine erhöhte Aufnahmekapazität für Fremd-gene und andererseits möglicherweise *in vivo* ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweist. Dieser Minimalvektor wurde parallel zu den Arbeiten für dieses Projekt erstellt und stand deshalb noch nicht als Empfängerstamm zur Verfügung (Vogt, 2014; Taher, 2014). Die Expressionskassetten können jedoch durch Verwendung der *en-passant*-Mutagenese in verschiedene vOKA-BACs eingebracht werden und stehen somit zur Insertion in verschiedene Deletionsvarianten zur Verfügung.

Als Insertionsort wurden zwei Varianten getestet. Eine Insertion zwischen ORF17 und ORF18 erfolgte in den BAC-Varianten pvOKA Δ 13/12-MeV-H und pvOKA Δ 13/12-RuVE2E1. Eine Rekonstitution von replikationsfähigem Virus in humanen MeWo-Zellen gelang trotz mehrfacher Wiederholung und Variation der Rekonstitutionsbedingungen aber nicht. Entsprechend dürfte diese Position für die Insertion von heterologen Genen weniger gut geeignet sein.

Die MeV-H-Kassette wurde aber zusätzlich in den deletierten Bereich von pvOKA Δ 13 eingebracht. Nach Überprüfung der BAC-Variante konnte replikationsfähiges Virus gewonnen werden. Bereits zuvor führte an selber Stelle eine Insertion der Mumpsvirusgene zu einer erfolgreichen Expression der Fremdgene (Somboonthum et al., 2007) und lässt diesen Bereich des OKA-Genoms weiterhin als aussichtsreiche Insertionsstelle für die Aufnahme von Fremd-DNA erscheinen.

Die Expression des MeV-H-Gens wurde auf Transkriptions- und Translationsebene überprüft. Die Immunfluoreszenz mit anti-H-Serum zeigte die Expression des Masernvirusproteins Hämagglutinin in mit pvOKA Δ 13-MeV-H infizierten MeWo-Zellen. Eine genauere zelluläre Zuordnung zu dem Zellkompartiment, in dem sich das Fremdprotein ansammelt, war aufgrund der Experimentbedingungen nicht möglich. Weiterhin bleibt die Frage relevant, ob das Fremdprotein in Viruspartikeln nachweisbar wäre. In Versuchen mit dem oligovalenten rvOKA, welches die Mumpsvirus Hämagglutinin-Neuraminidase exprimierte, konnten elektronenmikroskopisch aber keine Einschlüsse des Fremdproteins in Virionen nachgewiesen werden (Somboonthum et al., 2007). Aufgrund der stark unterschiedlichen Biologie des VZV und des Masernvirus wäre eine derartige Pseudotypisierung mit Masernvirus-Glykoprotein auf der Oberfläche eines Herpesvirus wenig wahrscheinlich.

In dieser Arbeit konnten also drei Expressionskassetten hergestellt werden, mit denen die Gene für die impfrelevanten Oberflächenantigene des Masern- und des Rötelnvirus unter Verwendung der *en-passant*-Mutagenese in verschiedene vOKA-BAC-Varianten eingebracht werden konnten. Die MeV-H-Kassette wurde auch erfolgreich in das BAC pvOKA Δ 13 einge-

bracht. Das rekonstituierte Virus rvOKA Δ 13-MeV-H zeigte vergleichbare Replikationseigenschaften im Vergleich zum Ausgangstamm rvOKA. Die Stabilität der Fremdgeninsertion wurde auf DNA-Ebene gezeigt. Zusätzlich konnte die Transkription mit der RT-PCR dokumentiert werden. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie konnte die Expression des Maservirusproteins Hämagglutinin in infizierten MeWo-Zellen nachgewiesen werden. Im Westernblot wurde die molekulare Masse des rekombinanten MeV-H Proteins mit etwa 69 kDa bestimmt und entspricht damit der Größe des natürlich vorkommenden Masernproteins.

Für die Expressionskassetten RuV-E2E1 und MeV-F konnte in dieser Arbeit kein Virus rekonstituiert werden. Die Gründe hierfür sind nicht abschließend geklärt. Eventuell war der Insertionsort zwischen ORF17 und ORF18 ursächlich. In späteren Experimenten sollte daher versucht werden, die genannten Expressionskassetten zunächst einzeln und dann auch in Kombination an den nachweislich erfolgreichen Insertionsort der ORF13-Deletion einzubringen.

In dieser Arbeit konnte also erstmalig ein rekombinanter VZV-Impfvektor erstellt werden, der nach Infektion von permissiven Zellen das Masernvirus-Antigen Hämagglutinin exprimiert. Das rekombinante Virus repliziert effizient in Zellkultur und steht sowohl zur Untersuchung der Antikörperproduktion in initialen Tierexperimenten als auch als Ausgangstamm zur Insertion weiterer viraler Expressionskassetten zur Verfügung. Zusätzlich wurde mit der Erzeugung der Expressionskassetten für das Fusionsprotein des Masernvirus, sowie für die Rötelnvirusproteine RuV-E2 und RuV-E1 ein wichtiger Schritt getan, damit später ein polyvalenter vOKA-basierter Impfvektor erstellt werden kann, der impfrelevante Gene gegen VZV, Masern- und Rötelnvirus exprimiert.

5. Zusammenfassung

Mit Einführung attenuierter Lebendimpfstoffe konnte die Krankheitslast in der Bevölkerung durch verschiedene Infektionskrankheiten deutlich reduziert werden. Dennoch gibt es einige Infektionskrankheiten, gegen die konventionelle Impfstoffe bislang nicht entwickelt werden konnten. Bei rekombinanten Impfstoffen werden Plasmide oder Virusvektoren verwendet. Nach der Applikation des Vektors werden rekombinante Antigene eines Krankheitserregers intrazellulär produziert und somit eine Immunantwort des Geimpften induziert. Hierdurch können neue Impfstoffe gegen bislang nicht impfpräventable Erkrankungen entwickelt werden. Außerdem kann durch rekombinante Impfstoffe deutlich schneller auf neu auftretende Infektionserreger reagiert werden. Das Varicella-Zoster-Virus (VZV) führt nach der Primärinfektion zum Krankheitsbild Windpocken und kann nach Reaktivierung aus der Latenz die Gürtelrose (Herpes zoster) verursachen. Zur Prophylaxe der Windpocken steht ein effektiver und sicherer, attenuierter Lebendimpfstoff auf Basis des VZV-Stamms vOKA zur Verfügung.

In dieser Arbeit sollte vOKA als Vektor zur Expression der impfrelevanten Oberflächenantigene des Masernvirus und des Rötelnvirus verwendet werden. Hierfür wurden die entsprechenden Gene mit der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) amplifiziert und jeweils zusammen mit Promotor und Terminator in Zwischenvektoren kloniert. Diese Expressionskassetten wurden sequenziert und anschließend mit der *en-passant*-Mutagenese in den als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) kloniert vorliegenden vOKA-Stamm inseriert. Nach Überprüfung wurde replikationsfähiges Virus rekonstituiert. Das rekonstituierte Virus wurde hinsichtlich der Replikationseigenschaften und die Expression der viralen Fremdgene auf DNA-, RNA- und Proteinebene untersucht.

Das Hämagglutinin MeV-H und das Fusionsprotein MeV-F sind die impfrelevanten Antigene des Masernvirus. Der Offene Leserahmen für MeV-H wurde zwischen den *immediate-early*-Enhancer-Promotor des Cytomegalovirus und den zugehörigen Terminator kloniert und anschließend in die Deletionsvariante vOKA Δ 13 eingebracht. Das resultierende VZV-BAC vOKA Δ 13-MeV-H konnte erfolgreich in der menschlichen Melanomzelllinie MeWo rekonstituiert werden. Das rekonstituierte Virus zeigte ähnliche Replikationsfähigkeiten wie der Impfstamm vOKA. Die stabile Insertion des viralen Fremdgens konnte in Zellkultur auf DNA-Ebene bestätigt werden. Die Transkription des Masernvirus-Gens wurde mit der RT-PCR nachgewiesen. Die MeV-H-Expression wurde durch die indirekte Immunfluoreszenz in infizierten Melanomzellen bestätigt. Im Westernblot hatte das rekombinante MeV-H etwa 69 kDa, was der Größe des natürlich vorkommenden Masern-Proteins entspricht. Das MeV-F-Gen wurde mit dem Promotor und Terminator der Phosphoglycerinkinase versehen und sollte zusätzlich in vOKA eingebracht werden. Die Rekombination der Expressionskassette in vOKA Δ 13-MeV-H

konnte jedoch nicht erreicht werden. Das Rötelnvirus besitzt zwei zur Ausbildung einer Immunantwort wichtige Oberflächenantigene E2 und E1. Die entsprechenden Gene wurden zwischen den Promotor des Humanen T-Zellleukämievirus und den Terminator des Simianen Virus 40 kloniert und in das BAC vOKA Δ 13/12 eingebracht. Die Rekonstitution des rekombinanten BACs zu replikationsfähigem Virus war aber nicht möglich.

In dieser Arbeit konnte erstmals ein rekombinanter vOKA-Stamm erzeugt werden, der in einer permissiven humanen Zelllinie effektiv repliziert und das impfrelevante Masernvirusantigen Hämagglutinin exprimiert. Hiermit steht ein rekombinanter bivalenter Impfstoffkandidat für weiterführende immunologische Untersuchungen im Tiermodell zur Verfügung. Darüber hinaus können die erstellten Expressionskassetten für das Masernvirus-Fusionsprotein und für die Rötelnvirusantigene E1 und E2 durch Anpassung der Versuchsbedingungen zur Entwicklung polyvalenter vOKA-Varianten genutzt werden.

6. Summary

The introduction of live-attenuated vaccines has relevantly reduced the disease burden in the population from various infectious diseases. Nevertheless, there are some infectious diseases against which conventional vaccines have not yet been developed. Recombinant vaccines use plasmids or viral vectors. After application of the vector, recombinant antigens of a pathogen are produced intracellularly and, thus, an immune response of the vaccinated is induced. This makes it possible to develop new vaccines against previously non-vaccine-preventable diseases. In addition, recombinant vaccines can be used to react much more quickly to newly emerging infectious agents. The varicella zoster virus (VZV) leads to chickenpox after primary infection and can cause shingles (herpes zoster) after reactivation from latency. An effective and safe live attenuated vaccine based on the VZV strain vOKA is available for the prophylaxis of chickenpox.

In this project, vOKA was used as a vector to express the vaccine-relevant surface antigens of measles virus and rubella virus. For this purpose, the corresponding genes were amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into intermediate vectors together with promoter and terminator. These expression cassettes were sequenced and then inserted by *en passant* mutagenesis into the vOKA strain cloned as a bacterial artificial chromosome (BAC). After verification, replication-competent virus was reconstituted. The reconstituted virus was examined for replication properties and expression of the viral foreign genes at the DNA, RNA, and protein levels.

The hemagglutinin MeV-H and the fusion protein MeV-F are the vaccine-relevant antigens of measles virus. The open reading frame for MeV-H was cloned between the immediate-early enhancer-promoter of cytomegalovirus and the corresponding terminator and then inserted into the vOKA Δ 13 deletion variant. The resulting VZV-BAC vOKA Δ 13-MeV-H was successfully reconstituted in the human melanoma cell line MeWo. The reconstituted virus showed similar replication capabilities as the vOKA vaccine strain. Stable insertion of the foreign viral gene was confirmed in cell culture at the DNA level. Transcription of the measles virus gene was detected by RT-PCR. MeV-H expression was confirmed by indirect immunofluorescence in infected melanoma cells. In Western blot, the recombinant MeV-H had approximately 69 kDa, which is the size of the naturally occurring measles protein. The MeV-F gene was provided with the promoter and terminator of phosphoglycerol kinase and should be additionally introduced into vOKA. However, recombination of the expression cassette in vOKA Δ 13-MeV-H could not be achieved. Rubella virus possesses two surface antigens E2 and E1, which are important for the formation of an immune response. The corresponding genes were cloned between the promoter of human T-cell leukemia virus and the terminator of simian virus 40

and inserted into the vOKA Δ 13/12 BAC. However, reconstitution of the recombinant BAC into replication competent virus was not possible.

In this work, for the first time, a recombinant vOKA strain could be generated that effectively replicates in a permissive human cell line and expresses the vaccine-relevant measles virus antigen hemagglutinin. This provides a recombinant bivalent vaccine candidate for further immunological studies in animal models. In addition, the expression cassettes prepared for the measles virus fusion protein and for the rubella virus antigens E1 and E2 can be used for the development of polyvalent vOKA variants by further adapting the experimental conditions.

7. Literaturverzeichnis

- Almeida JD, Howatson AF, Williams MG (1962) Morphology of varicella (chicken pox) virus. *Virology* 16, 353-355.
- Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF (2008) Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current protocols in microbiology*, Appendix 4E.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bowden DS, Westaway EG (1984) Rubella virus: structural and non-structural proteins. *J Gen Virol* 65, 933-943.
- Brunnemann AK, Bohn-Wippert K, Zell R, Henke A, Walther M, Braum O, Maschkowitz G, Fickenscher H, Sauerbrei A, Krumbholz A (2015) Drug resistance of clinical Varicella-Zoster virus strains confirmed by recombinant thymidine kinase expression and by targeted resistance mutagenesis of a cloned wildtype isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 2726-2734.
- Buchanan R, Bonthius DJ (2012) Measles virus and associated central nervous system sequelae. *Sem Ped Neurol* 19, 107-114.
- Callendret B, Vellinga J, Wunderlich K, Rodriguez A, Steigerwald R, Dirmeier U, Cheminay C, Volkmann A, Brasel T, Carrion R, Giavedoni LD, Patterson JL, Mire CE, Geisbert TW, Hooper JW, Weijtens M, Hartkoorn-Pasma J, Custers J, Grazia Pau M, Zahn R (2018) A prophylactic multivalent vaccine against different filovirus species is immunogenic and provides protection from lethal infections with Ebolavirus and Marburgvirus species in non-human primates. *PloS One* 13, 1-24.
- Che X, Reichelt M, Sommer MH, Rajamani J, Zerboni L, Arvin AM (2008) Functions of the ORF9-to-ORF12 gene cluster in Varicella-Zoster virus replication and in the pathogenesis of skin infection. *J Virol* 82, 5825-5834.
- Cohen JI (2013). Herpes Zoster. *New Engl J Med* 369, 255-263.
- Cusi MG, Rossolini GM, Cellesi C, Valensin PE (1988) Antibody response to wild rubella virus structural proteins following immunization with RA 27/3 live attenuated vaccine. *Arch Virol* 101, 25-33.
- Davison AJ, Scott JE (1986) The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol* 67, 1759-1816.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009) The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154, 171-177.
- de Swart RL, Yüksel S, Osterhaus ADME (2005) Relative contributions of measles virus hemagglutinin and fusion protein-specific serum antibodies to virus neutralization. *J Virol* 79, 11547-11551.
- Fisher DL, Defres S, Solomon T (2015) Measles-induced encephalitis. *Quart J Med* 108, 177-182.
- Freer G, Pistello M (2018) Varicella-zoster virus infection: natural history, clinical manifestations, immunity and current and future vaccination strategies. *New Microbiol* 41, 95-105.

- Furlong D, Swift H, Roizman B (1972) Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J Virol* 10, 1071-1074.
- Geisbert TW, Feldmann H (2011) Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *J Infect Dis* 204 Suppl 3, S1075-1081.
- Gershon AA, Breuer J, Cohen JI, Cohrs RJ, Gershon MD, Gilden D, Grose C, Hambleton S, Kennedy PGE, Oxman MN, Seward JF, Yamanishi K (2015) Varicella zoster virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15016.
- Gilden D, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA (2009) Varicella zoster virus vasculopathies: diverse clinical manifestations, laboratory features, pathogenesis, and treatment. *Lancet Neurol* 8, 731.
- Gilden DH, Vafai A, Shtram Y, Becker Y, Devlin M, Wellish M (1983) Varicella-zoster virus DNA in human sensory ganglia. *Nature* 306, 478-480.
- GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG (2019) Fachinformation Priorix.
- Grahn A, Studahl M (2015) Varicella-zoster virus infections of the central nervous system – Prognosis, diagnostics and treatment. *J Infect* 71, 281-293.
- Gray WL (2013) Recombinant varicella-zoster virus vaccines as platforms for expression of foreign antigens. *Adv Virol* 2013, 219439.
- Gregg NM (1941) Congenital cataract following German measles in the mother. *Problems of Birth Defects: From Hippocrates to Thalidomide and After*, 3, 34-46.
- Gremillion DH, Crawford GE (1981) Measles pneumonia in young adults. An analysis of 106 cases. *Amer J Med* 71, 539-542.
- Grose C, Brunel PA (1978) Varicella-zoster virus: isolation and propagation in human melanoma cells at 36 and 32 degrees C. *Infect Immun* 19, 199-203.
- Gross GE, Eisert L, Doerr HW, Fickenscher H, Knuf M, Maier P, Maschke M, Müller R, Pleyer U, Schäfer M, Sunderkötter C, Werner RN, Wutzler P, Nast A (2020) S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Zoster und der Postzosterneuralgie. *GMS Infect Dis*, 8.
- Heineman TC, Connelly BL, Bourne N, Stanberry LR, Cohen J (1995) Immunization with recombinant varicella-zoster virus expressing herpes simplex virus type 2 glycoprotein D reduces the severity of genital herpes in guinea pigs. *J Virol* 69, 8109-113.
- Heineman TC, Pesnicak L, Ali MA, Krogmann T, Krudwig N, Cohen JI (2004) Varicella-zoster virus expressing HSV-2 glycoproteins B and D induces protection against HSV-2 challenge. *Vaccine* 22, 2558-2565.
- Henao-Restrepo AM, Camacho A, Longini IM, Watson CH, Edmunds WJ, Egger M, Carroll MW, Dean NE, Diatta I, Doumbia M, Draguez B, Duraffour S, Enwere G, Grais R, Gunther S, Gsell PS, Hossmann S, Watte SV, Kondé MK, Kieny MP (2017) Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: Final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *Lancet* 389, 505-518.
- Hope-Simpson RE (1965) The nature of Herpes Zoster. A long-term study and a new hypothesis. *Proc Royal Soc Med* 58, 9-20.

- Jenner E (1798) An inquiry into the causes and effects of variolae vaccinae, a disease discovered in some western counties of England. Sampson Low.
- Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J (2016) *Harrisons Innere Medizin*, 19. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag.
- Knipe DM, Howley PM (2013) *Fields Virology* (6th edition). Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Knuf M (2019) *Infektiologie. Lehrbuch Kinder- und Jugendmedizin*, S. 233-366. Springer.
- Koff WC, Schenkelberg T (2019) The future of vaccine development. *Vaccine* 38, 4485-4486.
- Ku CC, Zerboni L, Ito H, Graham BS, Wallace M, Arvin AM (2004) Varicella-Zoster virus transfer to skin by T cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon- α . *J Exp Med* 200, 917-925.
- Laksono BM, de Vries RD, McQuaid S, Duprex WP, de Swart RL (2016) Measles virus host invasion and pathogenesis. *Viruses* 8.
- Lambert HP, Stern H, Wellsted AJ (1965) Congenital rubellavirus syndrome. *Lancet* 286, 826-827.
- Lee JY, Bowden DS (2000) Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin Microb Rev* 13, 571-587.
- Lowe RS, Keller PM, Keech BJ, Davison AJ, Whang Y, Morgan AJ, Kieff E, Ellis RW (1987) Varicella-zoster virus as a live vector for the expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 3896-3900.
- Mangala Prasad V, Klose T, Rossmann MG (2017) Assembly, maturation and three-dimensional helical structure of the teratogenic rubella virus. *PLoS Pathog* 13.
- Matsuura M, Somboonthum P, Murakami K, Ota M, Shoji M, Kawabata K, Mizuguchi H, Gomi Y, Yamanishi K, Mori Y (2013) Novel polyvalent live vaccine against varicella-zoster and mumps virus infections. *Microbiol Immunol* 57, 704-714.
- Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH (1997) Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14759-14763.
- Miller C, Andrews N, Rush M, Munro H, Jin L, Miller E (2004) The epidemiology of subacute sclerosing panencephalitis in England and Wales 1990-2002. *Arch Dis Childhood* 89, 1145-1148.
- Mina MJ, Metcalf CJE, de Swart RL, Osterhaus ADME, Grenfell BT (2015) Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality. *Science* 348, 694-699.
- Murakami K, Matsuura M, Ota M, Gomi Y, Yamanishi K, Mori Y (2015) A recombinant varicella vaccine harboring a respiratory syncytial virus gene induces humoral immunity. *Vaccine* 33, 6085-6092.
- Oker-Blom C, Ulfmanen I, Kääriäinen L, Pettersson RF (1984) Rubella virus 40S genome RNA specifies a 24S subgenomic mRNA that codes for a precursor to structural proteins. *J Virol* 49, 403-408.

- Ortiz GA, Koch S, Forteza A, Romano J (2008) Ramsay hunt syndrome followed by multifocal vasculopathy and posterior circulation strokes. *Neurology* 70, 1049-1051.
- Plattet P, Alves L, Herren M, Aguilar HC (2016) Measles virus fusion protein: structure, function and inhibition. *Viruses* 8, 112.
- Ramasamy MN, Minassian AM, Ewer KJ, Flaxman AL, Folegatti PM, Owens DR, Voysey M, Aley PK, Angus B, Babbage G, Belij-Rammerstorfer S, Berry L, Bibi S, Bittaye M, Cathie K, Chappell H, Charlton S, Cicconi P, Clutterbuck EA, Colin-Jones R, Dold C, Emary KRW, Fedosyuk S, Fuskova M, Gbesemete D, Green C, Hallis B, Hou MM, Jenkin D, Joe CCD, Kelly EJ, Kerridge S, Lawrie AM, Lelliott A, Lwin MN, Makinson R, Marchevsky NG, Mujadidi Y, Munro APS, Pacurar M, Plested E, Rand J, Rawlinson T, Rhead S, Robinson H, Ritchie AJ, Ross-Russell AL, Saich S, Singh N, Smith CC, Snape MD, Song R, Tarrant R, Themistocleous Y, Thomas KM, Villafana TL, Warren SC, Watson MEE, Douglas AD, Hill AVS, Lambe T, Gilbert SC, Faust SN, Pollard AJ; Oxford COVID Vaccine Trial Group (2021) Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet* 396, 1979-1993.
- Regules JA, Beigel JH, Paolino KM, Voell J, Castellano AR, Hu Z, Muñoz P, Moon JE, Ruck RC, Bennett JW, Twomey PS, Gutiérrez RL, Remich SA, Hack HR, Wisniewski ML, Josleyn MD, Kwilas SA, Van Deusen N, Mbaya OT, rVSVΔG-ZEBOV-GP Study Group. (2017) A recombinant vesicular stomatitis virus Ebola vaccine. *New Engl J Med* 376, 330-341.
- Rommelaere M, Maréchal C, Yombi JC, Goffin E, Kanaan N (2012) Disseminated varicella zoster virus infection in adult renal transplant recipients: outcome and risk factors. *Transpl Proc* 44 2814-2817.
- Roush SW, Murphy TV (2007) Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. *J Amer Med Assoc* 298, 2155-2163.
- Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, Goepfert PA, Truyers C, Fennema H, Spiessens B, Offergeld K, Scheper G, Taylor KL, Robb ML, Treanor J, Barouch DH, Stoddard J, Ryser MF, Marovich MA, Neuzil KM, Corey L, Cauwenberghs N, Tanner T, Hardt K, Ruiz-Guiñazú J, Le Gars M, Schuitemaker H, Van Hoof J, Struyf F, Douoguih M, Ensemble Study Group (2021) Safety and efficacy of single-dose Ad26.-COV2.S vaccine against COVID-19. *N Engl J Med*, published online ahead of print.
- Sauerbrei A (2014) Windpocken (Varizellen). In: S2k-Leitlinie Labordiagnostik schwangerschafts-relevanter Virusinfektionen (S. 95-110). Springer.
- Schünemann S, Mainka C, Wolff MH (1998) Subclinical reactivation of Varicella-Zoster virus in immunocompromised and immunocompetent individuals. *Intervirol* 41, 98-102.
- Shiraki K, Sato H, Yoshida Y, Yamamura JI, Tsurita M, Kurokawa M, Kageyama S (2001) Construction of Oka varicella vaccine expressing human immunodeficiency virus env antigen. *J Med Virol* 64, 89-95.
- Shiraki K, Takahara T (1993) [Recombinant Oka varicella vaccine as a live hepatitis B virus vaccine]. *Nihon Rinsho. Jap J Clin Med* 51, 241-247.
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8794-8797.
- Somboonthum P, Yoshii H, Okamoto S, Koike M, Gomi Y, Uchiyama Y, Takahashi M, Yamashita K, Mori Y (2007) Generation of a recombinant Oka varicella vaccine expressing

- mumps virus hemagglutinin-neuraminidase protein as a polyvalent live vaccine. *Vaccine* 25, 8741-8755.
- Staprans SI, Barry AP, Silvestri G, Safrit JT, Kozyr N, Sumpter B, Nguyen H, McClure H, Montefiori D, Cohen JI, Feinberg MB (2004) Enhanced SIV replication and accelerated progression to AIDS in macaques primed to mount a CD4 T cell response to the SIV envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 13026-13031.
- STIKO (2004) Begründung der STIKO für eine allgemeine Varizellenimpfung. *Epid Bull* 49, 421-424.
- STIKO (2013) Mitteilung der Ständigen Impfkommision (STIKO) zur konsequenten Umsetzung der Standardimpfempfehlungen gegen Masern im Säuglings- und Erwachsenenalter. *Epid Bull* 16, 133-135.
- STIKO (2017) Background paper to the decision not to recommend a standard vaccination with the live attenuated herpes zoster vaccine for the elderly in Germany: Statement of the German Standing Committee on Vaccination (STIKO) at the Robert Koch Institute. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 60, 1162-1179.
- STIKO (2018) Wissenschaftliche Begründung zur Empfehlung einer Impfung mit dem Herpes zoster-subunit-Totimpfstoff. *Epid Bull* 50, 541-567.
- STIKO (2019) Mitteilung der Ständigen Impfkommision (STIKO) beim Robert Koch-Institut, Empfehlungen der Ständigen Impfkommision beim Robert Koch-Institut - 2019/2020. *Epid Bull* 34, 313-357.
- Strassburg MA (1982) The global eradication of smallpox. *Amer J Infect Control* 10, 53-59.
- Straus SE, Owens J, Ruyechan WT, Takiff HE, Casey TA, Vande Woude GF, Hay J (1982) Molecular cloning and physical mapping of varicella-zoster virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 993-997.
- Taher H (2014) Deletion mutagenesis of varicella zoster virus for the optimization of the vaccine Oka strain by multiple homologous recombination in bacteria. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Masterarbeit.
- Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N (2010) En passant mutagenesis: A two step markerless red recombination system. *Meth Mol Biol* 634, 421-430.
- Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N (2006) Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Bio-Techniques* 40, 191-197.
- Vogt F (2014) Erstellung einer Minimalvariante des Varicella-Zoster-Virus-Impfstammes durch Deletion nicht essenzieller Virusgene durch multiple homologe Rekombination in Bakterien. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Masterarbeit.
- Weber DM, Pellecchia JA (1965) Varicella pneumonia: study of prevalence in adult men. *J Amer Med Assoc* 192, 572-573.
- World Health Organization (2019) Safety of Ebola virus vaccines; extract from GACVS meeting of 5-6 June 2019. *WHO Weekly Epidemiological Record*.
- Wussow F, Fickenscher H, Tischer BK (2009) Red-mediated transposition and final release of the mini-F vector of a cloned infectious herpesvirus genome. *PloS One* 4, e8178.

Zhang Z, Selariu A, Warden C, Huang G, Huang Y, Zaccheus O, Cheng T, Xia N, Zhu H (2010) Genome-wide mutagenesis reveals that ORF7 is a novel VZV skin-tropic factor. PLoS Pathogens 6, e1000971.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BAC | bakterielles artifizielles Chromosom |
| bp | Basenpaar |
| BGH | <i>Bovine growth hormone</i> , bovines Wachstumshormon |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CPE | Cytopathischer Effekt |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotid-Triphosphat |
| dpi | <i>days post infection</i> , Tage nach der Infektion |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| F | Fusionsprotein |
| FBS | fötales Rinderserum |
| for | vorwärts gerichtet |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| gE | Glykoprotein E |
| H | Hämagglutinin |
| HRP | <i>horseraddish peroxidase</i> , Merrettich Peroxidase |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasenpaare, 1000 Basenpaare |
| MeV | Masernvirus |
| ORF | <i>open reading frame</i> , Offener Leserahmen |
| PBS | <i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphatpuffer |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PFU | Plaque-bildende Einheit |
| R | Resistenz |
| Rev | rückwärts gerichtet |
| RFLP | Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus |
| RNase | Ribonuklease |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| U/min | Umdrehungen/Minute |
| RT | Reverse Transkriptase |

| | |
|----------|--|
| RuV | Rötelnvirus |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| STIKO | Ständige Impfkommission |
| TBS | <i>TRIS-buffered saline</i> , TRIS-Puffer |
| TRIS | 2-Amino-2-Propan-1,3-diol |
| v | <i>vaccine</i> , Impfstamm |
| VZV | Varicella-Zoster-Virus |

9. Dank

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Fickenscher für die hervorragende Betreuung der gesamten Arbeit. Prof Fickenscher unterstützte mich jedoch nicht erst bei meiner Dissertation. Durch seine Vorlesungen zur Infektionsbiologie, die ich im Rahmen meines Biologiestudium besuchen durfte, entwickelte ich Interesse für die Humanmedizin. Prof. Fickenscher begleitete fortan meinen Weg von der Bewerbung um das Studium der Humanmedizin bis zur Anfertigung meiner Dissertation. Nun bin ich im vierten Weiterbildungsjahr zum Internisten in der Onkologie, ein Beruf, der mich zutiefst erfüllt und den ich nicht zuletzt durch den Einsatz von Prof Fickenscher erlernen durfte.

Ganz besonders möchte ich mich bei der „Bruhn-Stiftung zur Förderung der medizinischen Forschung“ für die Auszeichnung meines Promotionsprojektes mit dem „Förderpreis der Bruhn-Stiftung 2014“ bedanken. Der Preis ermöglichte erst die äußerst intensive Auseinandersetzung mit meinem Forschungsthema. Das mir entgegengebrachte Vertrauen war zusätzliche Motivation, wenn es im experimentellen Teil mal wieder galt, Hürden zu nehmen.

Auch der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die Unterstützung meiner Arbeit durch das Promotionsstipendium danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Infektionsmedizin für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei Anne Brunne-mann für die geduldige und präzise Einarbeitung in die Laborarbeit bedanken. Die Diskussionen mit ihr motivierten mich immer wieder aufs Neue. Auch wenn Gregor Maschkowitz sich wissenschaftlich eigentlich mit anderen Dingen beschäftigte, konnte ich jederzeit einen wertvollen Rat von ihm einholen. Michael Mannbar führte meine Versuche weiter und gab mir auch bei meiner Arbeit wichtige Anregungen.

Meiner Frau und meinem Sohn gilt Dank für die Rücksicht und Geduld während zahlreicher Tage und Nächte, als meine Familie auf mich für das Abfassen dieser Arbeit verzichten musste. Ohne den Rückhalt durch meine Familie wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Veröffentlichungen, Tagungsbeiträge

Taher H, **Petersen N**, Vogt F, Moock M, Brunnemann AK, Fickenscher H (2016) Clonal Oka varicella vaccine variants with reduced viral genome size and presumed higher clinical safety. Hamburg, European Congress of Virology 2016, Vortrag, 21.10.2016.

Taher H, Vogt F, **Petersen N**, Moock M, Brunnemann AK, Fickenscher H (2015) Clonal varicella zoster virus vaccine strain Oka variants with minimized genome size. Bochum, 25th Annual Meeting of the Society for Virology, Vortrag, 20.03.2015.

Taher H, **Petersen N**, Vogt F, Moock M, Brunnemann AK, Fickenscher H (2014): Deletion Mutagenesis of Varicella Zoster Virus for the Optimization of the Vaccine Oka Strain by Multiple Homologous Recombination in Bacteria. Berlin, 9th Mini-Herpesvirus Workshop. Vortrag, 19.09.2014.