

**Tania Mara Welzel**  
**Dr. med.**

## **Etablierung eines experimentellen Systems für die stabile Expression hantaviraler Nukleokapsidproteine in Säugetierzellen**

Geboren am 26.04.1974 in Stuttgart  
Reifeprüfung am 25.5.1993 in Stuttgart  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1993 bis WS 2000  
Physikum am 25.08.1995 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg und Boston  
Staatsexamen am 6.12.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene  
Doktorvater: Prof. Dr. med. G. Darai

Hantaviren, Negativ-Strang RNS-Viren aus der Familie der Bunyaviridae, sind Verursacher des Hämorrhagischen Fiebers mit renalem Syndrom (HFRS), der Nephropathia epidemica (NE) und des „Hantavirus Pulmonary Syndrome“ (HPS). Aufgrund der spezifischen Genomeigenschaften der Hantaviren (RNS-Genom mit negativer Polarität) und mangelnder bzw. ineffizienter Replikationssysteme *in vitro* (Zellkultur) und *in vivo* (Tiermodell) sind die Kenntnisse über spezifische Pathomechanismen und Replikation dieser Viren sehr limitiert. Die Identifizierung von immer mehr Hantavirus-Serotypen, die durch Unterschiede im Organotropismus und auch im Übertragungsmodus gekennzeichnet sind, erfordert eine detaillierte Untersuchung der Hantaviren auf molekularer Ebene sowie die Entwicklung weit anwendbarer diagnostischer, therapeutischer und präventiver Verfahren.

Das Ziel der Dissertation war die Etablierung eines experimentellen Systems für die stabile Expression hantaviraler Nukleokapsidproteine in Säugetierzellen. Diese Proteine beherbergen immunologisch dominante Antigene, gegen die eine frühe humorale Immunantwort gerichtet ist. Auch Seren rekonvaleszenter HFRS-Patienten weisen vor allem Antikörper gegen diese Proteine auf. Verschiedene Vektoren wurden für die Expression der Nukleokapsidproteine der Hantaviren herangezogen und getestet. Zunächst wurde das Nukleokapsidprotein des Hantavirus Serotyp Puumala unter Anwendung des Dexamethason-induzierbaren Vektors pGRE5-1 in Vero E6 Zellen exprimiert. Damit wurde gezeigt, daß die Expression des Puumala Virus Nukleokapsidproteins in Säugetierzellen möglich ist und zu keiner toxischen Zellschädigung führt. Dann gelang es zu zeigen, daß hantavirale Nukleokapsidproteine auch kontinuierlich, das heißt stabil in Säugetierzellen exprimiert werden können. Unter Anwendung des in der Polylinkerregion modifizierten Expressionsvektors pCR3.1 wurden transfektante Vero E6, HeLa und NIH3T3 Zelllinien etabliert. Diese beherbergen die cDNS-Sequenzen des S-RNS-Segments des Puumala oder Hantaan Virus komplett oder partiell und sind in der Lage, entsprechende Nukleokapsidproteine des jeweiligen Serotyps stabil zu exprimieren. Die Integrität der cDNS der viralen S-RNS-Segmente wurde in den Genomen der transfektanten Zelllinien durch Nukleotidsequenzanalysen geprüft. Die transkriptionelle Aktivität sowie die Expression der Nukleokapsidproteine wurde über 20 Zellpassagen durch RT-PCR sowie Immunblot-Analysen und Immunfluoreszenztests dokumentiert. Mit diesen Experimenten ist es erstmals gelungen, ein System zu etablieren, welches eine gezielte und stabile Expression hantaviraler Nukleokapsidproteine in Säugetierzellen ermöglicht.

Darüber hinaus konnte durch Induktion einer spezifischen Antikörperbildung in BALB/c Mäusen gezeigt werden, daß die konstruierten, rekombinierten Expressionsvektoren in der Lage sind, auch *in vivo* hantavirale Nukleokapsidproteine zu exprimieren.

Nachdem die Zielsetzung der Dissertation in ihrer Gesamtheit erreicht worden war, wurde zusätzlich versucht, unter Anwendung analoger und modifizierter experimenteller Strategien die Transkription und eventuell die Expression hantaviraler Glykoproteine und der RNS-abhängigen RNS-Polymerase in Säugetierzellen zu untersuchen. Es konnten verschiedene transfektante Vero E6 Zellklone etabliert werden, die stabil das Glykoprotein G1 des Puumala Virus exprimieren. Die Genexpression des viralen Glykoproteins G1 wurde in den Transfektanten durch RT-PCR und Immunblot-Analyse über 15 Zellpassagen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde ein polyklonal-monospezifisches Antiserum, das gegen lineare Epitope des Glykoproteins G1 des Puumala Virus gerichtet ist, in Kaninchen induziert. Dieses Antiserum ist in der Lage, das Glykoprotein G1 unter denaturierenden Bedingungen wie Immunblot zu erkennen. Unter Anwendung dieser Antikörper war es gelungen, zusätzlich ein verkürztes, 27 kDa großes Glykoprotein G1 des Puumala Virus in transfektanten und in Puumala Virus infizierten Vero E6 Zellen nachzuweisen. Die Existenz dieses Proteins, das hier zum ersten Mal nachgewiesen wurde, beruht wahrscheinlich auf spezifischer proteolytischer Prozessierung.

Für die Untersuchung der Transkription des Polymerasegens des Puumala Virus wurde der Expressionsvektor pHßAPr-1-neo verwendet. Über 15 Zellkulturpassagen konnte in Vero E6 Säugetierzellen die cDNS-Sequenz des Puumala Virus L-RNS-Segments durch PCR sowie eine spezifische transkriptionelle Aktivität durch RT-PCR Analysen nachgewiesen werden.

Das im Rahmen der Arbeit entwickelte experimentelle System, das eine stabile Expression hantaviraler Nukleokapsidproteine und Glykoproteine in Säugetierzellen ermöglicht, ist die Basis für die Etablierung einer neuen, auch unter ökonomischen Gesichtspunkten relevanten Generation von Diagnostika.

Der erbrachte Nachweis, daß durch Plasmid-DNS spezifische Antikörper in Mäusen induziert werden können, bildet die Grundlage für weiterführende Experimente zur Entwicklung einer DNS-Vakzine zur gezielten Prävention hantaviraler Infektionen in Risikogruppen.

Die Expression hantaviraler RNS-abhängiger RNS-Polymerasen kann zur Entwicklung eines Testverfahrens führen, in dem verschiedene Pharmaka (potentielle Virustatika) auf ihre Fähigkeit, spezifisch hantavirale Replikasen zu inhibieren, untersucht werden können.

Aufgrund der schweren Kultivierbarkeit der Hantaviren in Zellkultur und fehlender Transfizierbarkeit der viralen Nukleinsäure, die auf den spezifischen Genomeigenschaften (RNS mit negativer Polarität) beruht, ist die Entwicklung eines reversen genetischen Systems zur Untersuchung der molekularen Prozesse der Pathomechanismen dieser Viren von Bedeutung. Hier stehen die neu entwickelten experimentellen Systeme zur Expression hantaviraler Proteine in Säugetierzellen und die daraus gewonnenen Erfahrungen in Zukunft zur Verfügung.

Kürzlich ist es gelungen, transgene Tabak- (*Nicotiana tabacum*) und Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) zu entwickeln, die Nukleokapsidproteine des Hantavirus-Serptyps Puumala exprimieren. Die Expressionsprodukte der transgenen Pflanzen sind immunogen und werden durch hantaviruspezifische humane Rekonvaleszenzseren erkannt.

Diese transgenen Pflanzen sind ein geeignetes System zur kostengünstigen Produktion und Gewinnung von nativen viralen Proteinen in großem Maßstab. Diese können in Zukunft u. a. in der Diagnostik Verwendung finden. Darüber hinaus dienen die transgenen Pflanzen als Basis für weiterführende Experimente zur Entwicklung eines Systems für die Immunisierung der Vektoren und damit zu einer Unterbrechung der Infektionskette Nager-Nager und Nager-Mensch.