

Die Polymerasekettenreaktion im Dienste der Reduktion von Tierversuchen : ein Projekt zur Expression der Strukturproteine des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus

Autor(en): **Adler, H. / Ackermann, M.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **138 (1996)**

Heft 2

PDF erstellt am: **11.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-589336>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Die Polymerasekettenreaktion im Dienste der Reduktion von Tierversuchen: Ein Projekt zur Expression der Strukturproteine des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus

H. Adler und M. Ackermann

Zusammenfassung

Das Frühsommer-Meningoenzephalitis-(FSME-) Virus ist in Zellkultur schwierig zu züchten. Wird das Virus in aufeinanderfolgenden Zellkulturpassagen propagiert, so findet man eine stetige Titerabnahme. Dies erfordert, dass das Saatvirus in Mäusen propagiert werden muss. Jede Virusproduktion, sei es für die Forschung, Diagnostik oder Impfstoffherstellung, ist also mit einem Einsatz von Versuchstieren verbunden. Unser Ziel war es, den für die Strukturproteine kodierenden Anteil des Virusgenoms zu klonieren, um danach die viralen Strukturproteine in einem geeigneten Expressionssystem zu produzieren. Die reverse Transkription (RT) mit anschließender Polymerasekettenreaktion (PCR, RT-PCR) ermöglichte es uns, genau diesen Anteil des viralen Genoms gezielt zu amplifizieren, zur Klonierung mit Restriktionsstellen zu versehen und für die spätere Expression der Strukturproteine ein Stop-Kodon anzuhängen. Damit wurde die Ausgangsbasis für die Expression der viralen Strukturproteine im Baculovirus-Expressionssystem geschaffen. Als Ersatz für herkömmliche virale Antigene können diese rekombinanten Proteine in der Diagnostik zur Einsparung von Versuchstieren beitragen.

Schlüsselwörter: reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion – Frühsommer-Meningoenzephalitis

Using the polymerase chain reaction to reduce the use of laboratory animals: a project to express tick-borne encephalitis virus structural proteins

Tick-borne encephalitis virus is difficult to propagate because with consecutive passages in cell culture the virus titer will decrease. Stockvirus has to be propagated in young mice. Therefore, every production of virus for research, diagnostic assays or vaccination demands the use of laboratory animals. We decided to clone the part of the viral genome which codes for the structural proteins, and to produce the structural proteins in a suitable expression system. Using reverse transcription, followed by the polymerase chain reaction, we amplified exactly this part of the viral genome, added restriction sites for cloning and a stop-codon. Cloning of this DNA-fragment and expression of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus in the baculovirus expression system has thus been possible. Replacement of traditional viral antigen by these recombinant proteins may reduce the need for laboratory animals.

Key words: reverse transcription – polymerase chain reaction – tick-borne encephalitis

Einleitung

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis ist eine Erkrankung des zentralen Nervensystems, die in weiten Teilen Europas und der ehemaligen Sowjetunion verbreitet ist. Sie kommt in der Schweiz beim Menschen regelmässig vor und konnte auch bei Tieren nachgewiesen werden, z. B. beim Hund (Wandeler et al., 1972), bei der Ziege (Zindel und Wyler, 1983) und beim Pferd (Waldvogel et al., 1981). Der Erreger ist ein Flavivirus, das durch Zekkenbiss übertragen wird. Es handelt sich dabei um ein

behülltes Virus mit einem ikosaedrischen Nukleokapsid und einem Gesamtdurchmesser von ungefähr 40 nm. Reife Viruspartikel enthalten 3 Strukturproteine, das Kapsidprotein C, das Membranprotein M und das Hüllprotein E. Letzteres ist das virale Hämagglutinin und induziert neutralisierende Antikörper. Im unreifen, intrazellulären Virus findet sich anstelle des Membranproteins M dessen Vorläufer prM. PrM ist glykosiliert, wobei der glykosilierte Anteil des Proteins bei der Ausschleusung des Virus aus der Zelle abgespalten wird. Das Virusgenom besteht aus einem Strang positiv-polarer Ribonu-

kleinsäure (RNS) von etwa 10,5 Kilobasen. In einem einzigen offenen Leseraster wird für ein einziges Polyprotein kodiert, in dem, aminoterminal beginnend, zunächst die Strukturproteine in der Reihenfolge C-prM-E, danach die Nicht-Strukturproteine enthalten sind. Die Spaltung des Polyproteins in die Endprodukte erfolgt ko- und post-translational, zwischen C und prM und zwischen prM und E durch zelluläre Signalpeptidasen.

Das FSME-Virus ist in Zellkultur schwierig zu züchten. Wird das Virus in aufeinanderfolgenden Zellkulturpassagen propagiert, so findet man eine deutliche Titerabnahme. Um geeignete Titer zu erreichen, werden daher juvenile Mäuse intrazerebral mit FSME-Virus inokuliert. Sobald die Tiere erkranken, werden sie getötet. Die Gehirne werden entnommen, homogenisiert und zur Infektion von Zellkulturen verwendet. Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen bewilligungspflichtigen Tierversuch des Schweregrades 2 gemäss Informationsschrift des Bundesamtes für Veterinärwesen BVet 800. 116-1.04. Wenn für Forschung, Diagnostik oder Impfstoffherstellung grössere Mengen an FSME-Virus benötigt werden, bedeutet das oft einen erheblichen Versuchstiereinsatz. Ausserdem stellt der Umgang mit dem Virus ein Risiko für das Laborpersonal dar, das deshalb regelmässig geimpft werden muss. Eine Alternative zur Viruszüchtung für die Antigengewinnung könnte die Produktion von Virusproteinen in einem geeigneten Expressionssystem bieten, z. B. im Baculovirus-Expressionssystem. Mit diesen rekombinanten Proteinen können, ohne jedesmal grosse Mengen an FSME-Virus zu produzieren, Diagnostika zum Nachweis von Antikörpern gegen das FSME-Virus oder auch Impfstoffe hergestellt sowie funktionelle Studien durchgeführt werden.

Material und Methoden

Virale RNS

Das Schweizer FSME-Virusisolat I40 (Schmidtke, 1973) wurde auf embryonalen Hühnerfibroblasten, die mit homogenisierten Gehirnen infizierter Mäuse beimpft worden waren, gezüchtet. Das Virus wurde durch Ultrazentrifugation des zellfreien Kulturüberstandes konzentriert. Virale RNS wurde mit Guanidinthiocyanat in einem Single-Step-Verfahren (Ausubel et al., 1994) isoliert.

Primer und Sonde

Da das Schweizer FSME-Virusisolat I40 nicht sequenziert war, wurde die Sequenz des Stammes Neudörfl (Mandl et al., 1989) verwendet, um die Primer und die Sonde auszuwählen. Es wurden Abschnitte ausgesucht, die eine weitgehende Sequenzhomologie zum FSME-Virusstamm Sofjin (Pletnev et al., 1990) aufweisen.

Primer p1 (sense) beginnt 16 Basen stromaufwärts der kodierenden Region und beinhaltet an seinem 3'-Ende das Startkodon für das Polyprotein. Um das Fragment

Tabelle 1: Sequenzen der Oligonukleotide zur PCR und zur Hybridisierung

Oligonukleotid	Sequenz
Primer p1 (sense)	5'-CGGATCCTCTAGAACAAAGAGCTGGGATG-3'
Primer p2 (antisense)	5'-TTATCTGCAGTTACGCCCCACTCCAAGGGT-3'
Sonde (p3)	5'-Digoxigenin-TTGTACACATTGTGTACGTAAGACCTTCATCTT-3'

besser klonieren zu können, wurde am 5'-Ende eine *Xba*-I-Schnittstelle kreiert, indem 10 Basen hinzugefügt wurden. Die letzten 18 Basen des RNS-Abschnittes, der für Glykoprotein E kodiert, dienten als Vorlage, um Primer p2 (antisense) zu entwerfen. Ein Stopkodon und 10 Basen, um eine *Pst*-I-Schnittstelle hinzuzufügen, wurden 5'-seitig angehängt. Zur zusätzlichen Identifikation des PCR-Produktes wurde eine Digoxigenin-markierte Sonde (p3) synthetisiert, die komplementär zu einem RNS-Abschnitt von 35 Basen innerhalb der für Glykoprotein E kodierenden Region ist. Die Primer und die Sonde sind in Tabelle 1 aufgelistet, die Anordnung ist in Abbildung 1 dargestellt.

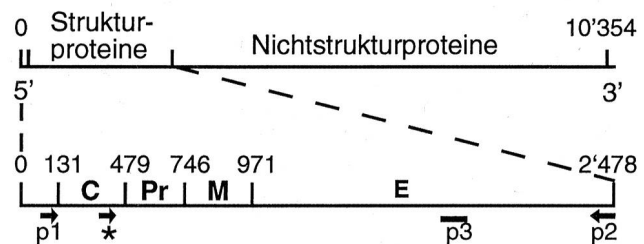


Abbildung 1: FSME-Virus-Genom mit Primern und Sonde, Numerierung der Nukleotide nach Stamm Neudörfl (Mandl et al., 1989), p1 Primer (sense), p2 Primer (antisense), p3 Digoxigenin-markierte Sonde, *Mispriming von p1

Synthese des 1. cDNA-Stranges

10 µl FSME-Virus-RNS (was 75% der Ausbeute einer infizierten 225-cm²-Zellkulturflasche entspricht) wurden mit 2 µl Primer p2 (18 µM) und 4 µl KCl (400 µM) gemischt. Das Gemisch wurde 5 min auf 94 °C erhitzt und anschliessend langsam auf 42 °C abgekühlt. Dann wurden 29 µl RT-Puffer, 12,5 Einheiten AMV Reverse Transkriptase (Pharmacia) und 29 Einheiten RNAGuard® (Pharmacia) zugegeben, so dass sich eine Konzentration von 52 mM Tris-HCl pH 8,3, 52 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 10mM DTT, 400 µM dNTPs ergab. Danach wurden die Reaktionsgefässe 1 h bei 42 °C inkubiert und anschliessend 5 Minuten auf 94 °C erhitzt.

PCR-Amplifikation

Zu 10 µl des cDNS-Reaktionsgemisches wurden 75 µl H₂O, 2 µl Primer p1 (18 µM), 2 µl Primer p2 (18 µM), 2 µl dNTPs (10 mM), 10 µl 10x Pfu-Reaktionspuffer #1 und 1 µl Pfu DNS Polymerase (2500 Einheiten/ml, Stratagene) zugegeben. Dieses Gemisch wurde mit Mineralöl überschichtet. Die cDNS wurde mit einem DNA Thermal Cycler 480 von Perkin Elmer Cetus amplifiziert. Das PCR-Programm war wie folgt definiert.

1. Zyklus: 5 min Denaturierung bei 95 °C; 5 Min. Annealing bei 50 °C bzw. 62 °C; 3 Min. Extension bei 74 °C.
2. - 37. Zyklus: 1 Min. Denaturierung bei 95 °C; 1 Min. Annealing bei 50 °C bzw. 60 °C; 3 Min. Extension bei 74 °C.
38. Zyklus: wie 2. - 37. Zyklus, aber mit einer Extensionszeit von 8 Min. Die Amplifikationsreaktionen wurden auf einem 1%igen Agarosegel in TAE-Puffer (Ausubel et al., 1994) analysiert.

Identifizierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden anhand von Grösse und Hybridisierung mit p3 identifiziert. Nach Southern Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) erfolgten die Prähybridisierung und die Hybridisierung in Anwesenheit von 50% Formamid bei 42 °C. Die Detektion wurde mit dem DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer, Mannheim) gemäss Herstellerangaben durchgeführt.

Klonierung

Das PCR-Produkt wurde mit *Xba* I und partiell mit *Pst* I geschnitten. Mit *Pst* I wurde nur partiell geschnitten, da sich in dem amplifizierten Fragment eine *Pst*-I-Schnittstelle befindet. Die geschnittene DNS wurde auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Bande mit der korrekten Grösse (2369 Basenpaare, entsprechend dem Fragment C-prM-E) wurde ausgeschnitten und die DNS mit Glasperlen gereinigt (Ausubel et al., 1994). Das Plasmid Bluescript KS+ (Stratagene) wurde mit *Xba* I und *Pst* I geschnitten, um kompatible Enden zu erhalten, und das gewünschte Fragment wurde auf die gleiche Weise gereinigt. Das PCR-Produkt wurde in das Plasmid ligiert, und mit dem Ligationsprodukt wurden kompetente *E.-coli*-DH5α-Zellen transformiert (Ausubel et al., 1994) und auf Luria-Bertani-Agarplatten (LB) mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden gepickt und in LB-Bouillon angezüchtet. Mit einem Miniprep-Verfahren (Ausubel et al., 1994) wurde die Plasmid-DNS isoliert. Die Plasmide wurden durch Herausschneiden des klonierten Fragments und Hybridisierung mit p3 identifiziert. Ausserdem wurden die Übergänge zwischen Plasmid und Insert mit dem Sequenase 2 Kit von USB und den Primern T7 und KS sequenziert.

Resultate

RT-PCR

Um den Anteil des FSME-Virusgenomes zu erhalten, der für die Strukturproteine C, prM und E kodiert, wurde mit Hilfe von Primer p2 aus viraler RNS eine cDNS transkribiert und mit den Primern p1 und p2 mittels PCR amplifiziert. Bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C entstanden 2 Fragmente mit einer Länge von ungefähr 2000 (2032) bzw. 2400 (2369) Basenpaaren. Beide Fragmente hybridisierten mit der Sonde p3. Erhöhte man die Annealing-Temperatur auf 62 °C und führte ausserdem einen Heiss-Start durch, so wurde nur noch das längere der beiden Fragmente amplifiziert (Abb. 2).

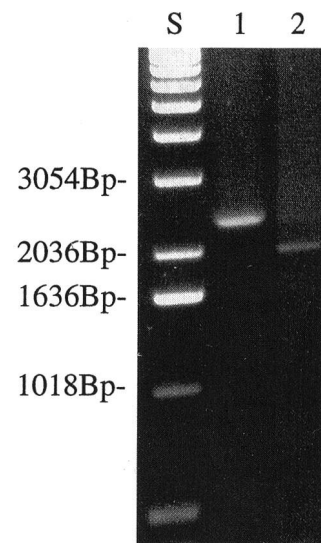


Abbildung 2: RT-PCR mit den Primerpaaren p1 und p2 an viraler RNA. Spur S, DNS-Grössenstandard, Fragmentgrössen sind links vermerkt; Spur 1, PCR mit einer Annealing-Temperatur von 62 °C; Spur 2, PCR mit einer Annealing-Temperatur von 50 °C.

Klonierung

Das amplifizierte Fragment wurde kloniert und konnte mit *Xba* I und *Pst* I aus dem Plasmid wieder herausgeschnitten werden. Die Agarosegel-Elektrophorese ergab das gleiche Bandenmuster wie das ursprüngliche PCR-

Tabelle 2: Nukleinsäuresequenz des Schweizer Isolates von FSME-Virus (Stamm I40). Je 100 Basen vom 5'-Ende und vom 3'-Ende des klonierten Fragmentes wurden bestimmt. Fett gedruckt: Abweichungen von der Sequenz des Stammes Neudörfl.

```
5'-AGAACAAGAG CTGGGGATGG TCAAGAAGGC CATCCTGAAA GGTAAGGGGG
GCGGTCCCCC TCGACGAGTG TCGAAAGAGA CGCCAACGAA GACGCGTCAA
ACTGGCITGG TTGGGCCTGA ACATGAGAAA CCTACAATG TCCATGAGCT
TTCTCTGGC TGGAGGTCTA GTCTTGCCA TGACCCTTGG
AGTGGGGGCG-3'
```


Fragment. Das Plasmid mit dem Insert hybridisierte mit der Sonde p3. Die Sequenzierung der Plasmid/Insert-Übergänge ergab die erwartete Kombination von Plasmid-, Primer- und Virussequenz, wobei sich bei der Virus-DNS bei den 100 Basen, die jeweils sequenziert wurden, eine Sequenzhomologie von 100% bzw. 98% zu Stamm Neudörfl ergab (Tab. 2).

Diskussion

Es ist uns gelungen, mit Hilfe der RT-PCR den Nukleinsäureabschnitt, der für die Strukturproteine des FSME-Virus kodiert, zu amplifizieren und ihn anschliessend zu klonieren. Als Ausgangsmaterial diente die virale RNS, die der Virusausbeute von 3 Vierteln einer 225-cm²-Zellkulturflasche entsprach. Da bereits die erste Amplifikation erfolgreich war, wurde auf weitere Amplifikationsversuche und eine Konzentrationsbestimmung des Ausgangsmaterials verzichtet. Es ist möglich, dass die Amplifikation auch mit wesentlich geringeren Mengen an RNS funktionieren würde. Eine Methode mit geringem RNS-Bedarf bedeutet bei einem Virus wie dem FSME-Virus, das schwierig zu züchten ist, einen grossen Vorteil. Hinzu kommt, dass die virale RNS sehr anfällig gegen RNasen ist, so dass es schwierig sein kann, quantitativ und qualitativ ausreichende RNS zu erhalten, um längere Fragmente zu klonieren. So konnte durch den Einsatz der RT-PCR schon zur Saatvirusproduktion der Virusbedarf und damit auch der Versuchstierbedarf reduziert werden.

Wenn von dem Virusstamm, wie in unserem Falle, keine Sequenzinformation vorliegt, kann man zur Primerauswahl bekannte Sequenzabschnitte anderer Stämme oder verwandter Viren verwenden. Ist es, wie in unserem Falle, möglich, Sequenzen verschiedener Stämme zu vergleichen, so können die gut konservierten Bereiche für das Primerdesign ausgewählt werden. Wir haben zunächst eine niedrige Annealing-Temperatur gewählt, die auch einem Primer mit einer geringeren Homologie zur cDNS eine Bindung ermöglichen sollte. Dabei erhielten wir zusätzlich zum PCR-Amplifikat der erwarteten Länge von 2369 Basenpaaren noch ein kürzeres PCR-Produkt von etwa 2000 Basenpaaren. Dies ist auf ein sogenanntes Mispriming, d.h. eine Anlagerung des Primers an einen cDNS-Abschnitt mit geringerer Sequenzhomologie zum Primer, zurückzuführen. Wie man aus der Sequenzinformation des Stammes Neudörfl entnehmen kann, findet sich in den Positionen 462–469 eine zum 3'-Ende des Primers p1 homologe Sequenz, die offensichtlich unter den gegebenen Amplifikationsbedingungen ebenfalls eine Bindung und einen Kettenstart ermöglicht. Rechnerisch ergibt sich für dieses Fragment eine Länge von 2032 Basenpaaren. Durch Erhöhen der Annealing-Temperatur auf 62 °C konnte dieses Mispriming ausgeschal-

tet werden, so dass man nur noch das PCR-Produkt der gewünschten Länge erhielt. So kann durch Modifikation der Reaktionsparameter eine PCR «massgeschneidert» werden. Die PCR bot uns weiterhin die Möglichkeit, dem Amplifikat auf beiden Seiten Restriktionsstellen anzufügen, wodurch ein gezieltes Klonieren mit definierter Orientierung des Inserts möglich war. Gleichzeitig konnten wir auch ein Stop-Kodon an das amplifizierte Fragment anhängen.

Dadurch war es uns möglich, auf einfache Weise ein rekombinantes Baculovirus zu konstruieren und im Baculovirus-Expressionssystem die Strukturproteine des FSME-Virus zu exprimieren. Diese Proteine wurden durch ihre Reaktion mit den entsprechenden Anti-Peptid-Antisera im Western Blot identifiziert (Adler et al., in Vorbereitung). Die konventionelle Diagnostik der FSME besteht aus einem Antikörpernachweis, wobei Serum- und Liquorantikörper des Patienten an das FSME-Virus binden. Für die Herstellung dieser Tests werden grosse Mengen an FSME-Virus und damit auch an Versuchstieren benötigt. In einem solchen diagnostischen Test könnten, anstelle der FSME-Viren, die im Baculovirus-System exprimierten FSME-Virus Strukturproteine als Antigene verwendet werden. Damit kann der Einsatz von Versuchstieren wie auch das Risiko einer FSME-Virus-Infektion im Labor reduziert werden.

Literatur

- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Strubel K. (1994): Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.
- Mandl C.W., Heinz F.X., Stöckl E., Kunz H. (1989): Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology* 173, 291–301.
- Pletnev A.G., Yamshikov V., Blinov V. (1990): Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the Polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 174, 250–263.
- Schmidtke W. (1973): Isolierung des Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) aus Zecken und Nachweis von Antikörpern gegen dieses Virus in Seren von Menschen und Weidetieren in der Region Schaffhausen. Inaugural-Dissertation. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Zürich.
- Waldvogel A., Matile H., Wegmann Ch., Wyler R., Kunz Ch. (1981): Zeckenzephalitis beim Pferd. Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 227–233.
- Wandeler A., Steck E., Frankbauser R., Kammermann B., Gresikova M., Blasovic D. (1972): Isolierung des Virus der zentraleuropäischen Zeckenzephalitis in der Schweiz. *Path. et Microbiol. (Basel)* 38, 258–270.
- Wyler R., Schmidtke W., Kunz Ch., Radda A., Henn V., Meyer R. (1973): Zeckenzephalitis in der Region Schaffhausen: Isolierung des Virus aus Zecken und serologische Untersuchungen. *Schweiz. med. Wschr.* 103, 1487–1492.
- Zindel W., Wyler R. (1983): Zeckenzephalitis bei einer Ziege im untern Prättigau. Schweiz. Arch. Tierheilk. 125, 383–386.

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. M. Ackermann, Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Zürich, Winterthurerstrasse 266a, CH-8057 Zürich