



(19) Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 402 897 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1352/94

(51) Int.Cl.⁶ : A61K 39/12

(22) Anmeldetag: 8. 7.1994

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 2.1997

(45) Ausgabetag: 25. 9.1997

(56) Entgegenhaltungen:

EP 0203909A1

(73) Patentinhaber:

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

HEINZ FRANZ XAVER DR.
WIEN (AT).
ALLISON STEVEN DR.
WIEN (AT).
MANDL CHRISTIAN DR.
WIEN (AT).
KUNZ CHRISTIAN DR.
WIEN (AT).

(54) VERBESSERTE VAKZINE ZUR IMMUNISIERUNG GEGEN TBE-VIRUSINFektIONEN SOWIE EIN VERFAHREN ZU
DESSER HERSTELLUNG

(57) Die Erfindung betrifft eine Vakzine zur Immunisierung gegen Tick-Borne-Enzephalitis-Virus (TBE-Virus)-Infektionen, umfassend nicht-infektiöse, subvirale Partikel, welche im wesentlichen das rekombinante Protein E in seiner vollständigen, nativen Form und gegebenenfalls das rekombinante Protein prM/M enthalten, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

B
AT 402 897
AT

Die Erfindung betrifft eine verbesserte Vakzine zur Immunisierung gegen TBE-Virusinfektionen sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Das TBE(Tick-Borne-Encephalitis)-Virus ist in vielen europäischen Ländern, der ehemaligen Sowjetunion und China, endemisch. Die Krankheit stellt in einigen zentraleuropäischen Ländern, wie Österreich, 5 Tschechien, Slowakei, Slowenien oder Ungarn, wo jedes Jahr mehrere hundert in Krankenhäuser aufgenommene Fälle registriert werden, ein signifikantes Problem für die öffentliche Gesundheit dar (WHO: EURO Reports and Studies, 104; 1983).

TEE-Virus, das in Form eines westlichen, europäischen und eines fernöstlichen Subtyps existiert, gehört zur Familie der Flavi-Viren, die sphärische lipidumhüllte RNA-Viren sind (s. Monath, T.P.: Flaviviruses. In: Fields, B.N. (ed.) Virology, Raven Press, N.Y. 1990, S. 763-814).

Die Krankheit kann durch Impfung mit einem hochgereinigten Formalin-inaktivierten Ganzvirusimpfstoff (s. Kunz et al., J.Med.Virol., 6 (1980), 103-109), der eine Immunantwort gegen die Strukturproteine des Virus induziert, effektiv verhindert werden (Kunz, Ch.Acta leidensia 60, No.2, 1-14, 1992). Dieser Impfstoff hat sich bestens bewährt, jedoch müssen große Volumina von infektiösen und potentiell gefährlichen Virussuspensionen im Verlauf des Herstellungsverfahrens gehandhabt werden. Daher sind umfangreiche und teure Sicherheitsvorkehrungen erforderlich.

Die Fähigkeit von Antikörpern, das Virus zu neutralisieren, hängt davon ab, daß sie die native Struktur der Proteine an der Virusoberfläche erkennen. Im Falle von TBE-Viren und anderen Flavi-Viren handelt es sich dabei in erster Linie um das Protein E (s. Heinz und Mandl, APMIS, 101 (1994), 735-745). Für die 20 Induktion von möglichst effizient wirksamen Antikörpern im Zuge einer Immunisierung ist es daher wünschenswert, daß der Impfstoff dieses Protein in der gleichen Form, wie es auch an der Oberfläche des infektiösen Virus vorliegt, enthält. Ganzvirustotimpfstoffe haben den Nachteil, daß das notwendige Inaktivierungsverfahren zu einer teilweisen Veränderung der nativen Proteinstruktur führen kann.

Die rekombinante DNA-Technologie bietet eine Möglichkeit, Ganzvirustotimpfstoffe durch rekombinante 25 Proteine, die die wesentlichen Teile der die Immunantwort induzierenden Proteine enthalten, zu ersetzen. Bei dieser gentechnischen Expression von einzelnen Virusproteinen ist jedoch nicht sichergestellt, daß die Antigenstruktur dieser rekombinanten Proteine jener der entsprechenden Proteine an der Virusoberfläche entspricht.

Die Expression von rekombinanten Oberflächenproteinen von TBE-Viren ist beispielsweise aus Allison 30 et al., Gemeinsame Jahrestagung ÖBG-ÖGGGT (1993) P114, bekannt. Dabei wurde festgestellt, daß Protein E und Protein M bei deren rekombinanter Expression unter bestimmten Bedingungen in verschiedener Form, u.a. auch in Form von nicht-infektiösen subviralen Partikeln, abgesondert werden.

Solche subvirale Partikel sind für entfernte Verwandte der TBE-Viren, nämlich das Japanische Enzephalitis-Virus (JEV), Gelbfiebervirus und Dengue-Virus bekannt (s. Konishi et al., Virology 188 (1992), 714-720, 35 oder WO 92/03545).

Es ist zwar in Konishi et al. beschrieben, daß solche subviralen Partikel, welche mit Freund's komplettem Adjuvans emulgisiert worden sind und das gesamte Protein E enthalten, eine gewisse Immunantwort in Mäusen auslösen, es wurde jedoch andererseits nachgewiesen, daß mit einem teilweise C-terminal verkürzten Protein E ein wesentlich effektiverer Schutz als mit dem gesamten Protein E gegen 40 eine Flavivirusinfektion erreicht werden kann (WO 92/03161).

Die EP-0 203 909-A1 betrifft eine FSME-Vakzine, welche inaktiviertes und zumindest teilweise dissoziertes FSME-Virus enthält, wobei gemäß der dort beschriebenen Vakzine das Glycoprotein E in isolierter Form, also abgetrennt und von den üblichen Proteinbestandteilen des Virus und vom Dissoziierungsmittel, vorliegen. Ein solcherart isoliertes Glycoprotein E weist jedoch nur eine geringe Immunogenität auf.

45 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht nun darin, einen verbesserten Impfstoff gegen TBE-Infektionen zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Vakzine zur Immunisierung gegen Tick-borne-Enzephalitis-Virus (TBE-Virus)-Infektionen, welches nicht-infektiöse, subvirale Partikel, die im wesentlichen das Protein E in seiner vollständigen nativen Form und gegebenenfalls das Protein prM/M enthalten, welche 50 Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind, umfaßt. Wesentlich ist dabei, daß das Protein E in seiner vollständigen nativen Form vorliegt, da nur damit ein effektiver Schutz herbeigeführt werden kann. In der erfindungsgemäßen Vakzine konnte die native Form des Protein E mit Hilfe verschiedener Analysen belegt werden, nämlich

- a) Analyse der Antigenstruktur mit monoklonalen Antikörpern,
- b) Fähigkeit zur säureinduzierten Konformationsänderungen und
- c) Hämaggglutinationsaktivität

Die Tatsache, daß die erfindungsgemäße Vakzine aufgrund ihrer Zusammensetzung nicht infektiös sein kann, stellt für die Sicherheit des Impfstoffes einen wichtigen Aspekt im Hinblick auf bekannte Vakzinen dar.

Nach einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Vakzine ist das Protein E aus dem TBE-Virus abgeleitet, wobei - je nach Anwendungsgebiet - sowohl der westliche (europäische) Subtyp als auch der fernöstliche Subtyp verwendet wird. Vorzugsweise umfaßt die Vakzine noch eine Lipidkomponente, welche vorteilhafterweise in vesikulärer Form vorliegt.

- 5 Es hat sich gezeigt, daß - entgegen der Meinung der Fachwelt (s. WO 92/03161) rekombinantes Protein E, welches aus TBE-Viren abgeleitet ist, nur in Form dieser nicht-infektiösen subviralen Partikel eine ausreichende Immunisierung gegen Infektionen bieten kann. Eine teilweise verkürzte Form des Protein E, bei welcher, wie in WO 92/03161, der C-terminale Membrananker entfernt worden ist, kann nicht zur Herstellung einer effektiven Vakzine herangezogen werden. Die erfindungsgemäße Vakzine enthält vorzugsweise nicht-infektiöse Partikel, die im wesentlichen frei sind von mittels PCR detektierbaren, von TBE-Virus abgeleiteten Nukleinsäuren. Dies kann beispielsweise mit der in Konishi et al. beschriebenen Methode gezeigt werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer TBE-Vakzine, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß

- 15 - ein Zellkultursystem zur Verfügung gestellt wird, das die Kodierungssequenzen für die Proteine prM und E, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind, enthält,
- das Protein E in seiner vollständigen, nativen Form exprimiert wird, wobei
- subvirale, nicht-infektiöse Partikel gebildet werden, welche im wesentlichen das rekombinante Protein E in seiner vollständigen, nativen Form und gegebenenfalls das rekombinante Protein prM/M enthalten und
- die Partikel gesammelt sowie direkt in eine zur Immunisierung geeignete Zusammensetzung aufgearbeitet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet den großen Vorteil, daß ein Inaktivierungsschritt für Viren, beispielsweise durch Formalin, nicht notwendig ist, was einerseits die Qualität der Vakzine erheblich verbessert (das Protein E liegt in nativer Form und nicht in durch die Formalinbehandlung veränderter und zumindest teilweise denaturierter Form vor) und andererseits die technische Produktion dieser Vakzine deutlich erleichtert werden, da die Partikel direkt (also ohne Formalinbehandlung) zu einer pharmazeutischen Präparation verarbeitet werden können.

Besonders bevorzugt bei der Durchführung des Verfahrens ist der Einsatz eines Zellkultursystems, welches die Kodierungssequenzen für die rekombinanten Proteine prM und E aus dem TBE-Virus in chromosomal integrierter Form enthält.

Es sind jedoch Zellkultursysteme, in welchen virale Vektoren zur Anwendung kommen, oder Zellkultursysteme, in welchen virusfrei, beispielsweise mit einem Plasmidvektor, gearbeitet wird, ebenfalls für die Herstellung der erfindungsgemäßen Partikel geeignet.

35 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens erfolgt sowohl die Expression der Proteine als auch die Bildung der Partikel kontinuierlich.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von nicht-infektiösen, subviralen Partikeln enthaltend im wesentlichen das rekombinante Protein E in seiner vollständigen, nativen Form und gegebenenfalls das rekombinante Protein prM/M, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind, zur Herstellung einer Vakzine zur aktiven Immunisierung gegen TBE-Virus-Infektionen.

Weiters betrifft die Erfindung die Verwendung von nicht-infektiösen, subviralen Partikeln enthaltend im wesentlichen das rekombinante Protein E in seiner vollständigen, nativen Form und gegebenenfalls das rekombinante Protein prM/M, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind, zur Herstellung von Anti-TBE-Virus-Immunglobulin-Präparationen.

45 Die Erfindung wird nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die Zeichnung noch weiter erläutert. Es zeigen: Fig. 1 eine schematische Darstellung der in den Expressionsplasmiden verwendeten Inserts, Fig. 2 eine schematische Darstellung des Plasmids pSVβ, das nach den im Anhang zur vorliegenden Beschreibung angegebenen Modifikationen zur Expression der in Fig. 1 gezeigten Konstrukte verwendet wurde; Fig. 3a, b, und c eine vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenz des in Fig. 1 dargestellten Konstrukts SV-PEwt; Fig. 4 die Immunpräzipitation von mit Triton X-100 solubilisierten Zelllysaten nach Transfektion mit den in Fig. 1 dargestellten Konstrukten sowie nach Infektion mit TBE-Virus (COS/TBE); Fig. 5 in einem Diagramm den Nachweis von Protein E mittels 4-Schicht ELISA in den Zellkulturüberständen von COS-Zellen, die mit den in Fig. 1 dargestellten Konstrukten transfiziert worden waren; Fig. 6 die Immunpräzipitation des Zellkulturüberstandes von COS-Zellen nach Transfektion mit SV-PEwt bzw. SV-PEst; Fig. 7 in einem Diagramm die Sedimentationsanalyse von COS-Zellkulturüberständen nach Transfektion mit SV-PEwt und SV-PEst sowie nach Infektion mit dem TBE-Virus. Die Sedimentationsrichtung ist von links nach rechts; Fig. 8 eine Sedimentationsanalyse von rSP ohne (SV-PEwt) bzw. nach Behandlung mit 0,5% Triton X-100. Die Sedimentationsrichtung ist von links nach rechts; Fig. 9 in einem

Diagramm die SDS-PAGE von gereinigtem TBE-Virus und gereinigten rSPs; Coomassie-Blau Färbung; Fig. 10 in einem Diagramm die Reaktivität von 19 Protein E-spezifischen monoklonalen Antikörpern im 4-Schicht ELISA mit TBE-Virus, Formalinaktiviertem TBE-Virus, rSP und rE^{*}; Fig. 11 die Reaktivität von TBE-Virus bzw. rSP im 4-Schicht ELISA mit den mAKs B3, i2, IC3 und C6 ohne (pH 8,0) bzw. nach Behandlung bei pH 5 6,0; Fig. 12 die Reaktivität von pE^{*} im 4-Schicht ELISA mit den mAKs B3, i2, IC3 und C6 ohne (pH 8,0) bzw. nach Behandlung bei pH 6,0; Fig. 13 die Strategie für die PCR-Klonierung und die Mutagenese von TBE-Virus-Membran-Proteingenen; Fig.14 die Konstruktion von Plasmidklonen, enthaltend Wildtyp-prM + E-Gene oder nur -E mit einem TAG-Stop am Codon 435; Plasmid-SV-pEst (SV-pE 04), der ein Wildtyp prM-Gen und ein modifiziertes E-Gen mit einem TAG-Stop-Codon im Carboxy-terminalen Bereich enthält (vgl. 10 Tabelle 3) unter Plasmid SV-Ewt (SV-01) ein ein Wildtyp-E-Gen ohne prM enthaltendes Konstrukt wurden mit Cfr10I vertaut, um die prM- und E-Gene auf separaten Restriktionsfragmenten zu erhalten. Diese 15 Fragmente wurden ausgewechselt und zusammen ligiert, um die Plasmide SV-pEwt (Wildtyp prM + E) und SV-Est (nur E + Stop-Codon) zu schaffen; und Fig.15 die Detektion von TBE-Virus-Strukturmembranproteinen in transfektierten COS-Zellen mittels indirekter Immunofluoreszenz; COS-Zellen, die mit den Plasmiden 20 SV-pEwt (A, C und E) oder SV-Ewt (B, D und F) transfektiert worden waren, wurden 46 h nach der Transfektion fixiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert, wie in Materialien und Methoden im Anhang beschrieben, wobei polyklonales Anti-Rosetten-Kaninchen-Antiserum (A und B), Mäuse-Anti-E MAbs 25 B3 (C und D) und anti-prM-Mab8HI (E und F) verwendet wurde.

Die Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen näher beschrieben.

20

1. Herstellung der Partikel

Zu diesem Zweck wurden 4 Expressionsplasmide konstruiert, die das E-Protein bzw. eine Membrananker-freie Form des E-Proteins allein bzw. gemeinsam mit prM enthalten (Fig.1).

25 Ein Beispiel für die Herstellung dieser Plasmide ist im Anhang 1 beschrieben, der Teil der vorliegenden Beschreibung ist.

Das dort beschriebene Ausgangsplasmid pSVβ ist in Fig.2 dargestellt.

Die vollständige Sequenz des PEwt Inserts ist in Fig.3a, b und c dargestellt.

30 COS-Zellen wurden mit den geeigneten Plasmiden transfiziert und auf die Expression rekombinanter Proteine wie folgt analysiert:

DNA-Transfektion

Die DNA-Transfektionen erfolgten unter Verwendung eines BioRad Gene Pulser-Apparates. Die COS-Zellen wurden mit Trypsin behandelt, gewaschen, in PBS bei einer Konzentration von etwa 5×10^7 Zellen/ml resuspendiert und in Anwesenheit von CsCl-Gradient gereinigtem Plasmid mit einer Konzentration von 6 µg/ml elektroporiert. Die Zellen wurden in Dulbecco's MEM, welches 10% fötales Rinderserum enthielt, während der ersten 24 Stunden nach der Transfektion gezüchtet, danach wurde das Medium durch Serum-freies Medium ersetzt, und die Inkubation wurde weitere 24 Stunden lang fortgesetzt, bis die Zellen 40 oder das Medium geerntet wurden.

Analyse der exprimierten Proteine

a. Immunopräzipitation von Zell-Lysaten
45 Transfizierte Zellen wurden mit ³⁵S-Cystein markiert, mit 1% Triton X-100 solubilisiert und einer Immunopräzipitation mit einem polyklonalen Kaninchenserum, das für TBE-Virus E und prM-Proteine spezifisch war, unterzogen. Wie aus Fig. 4 ersichtlich, führte die Expression der Konstrukte SV-PEwt und SV-Ewt zur Synthese von Protein E authentischer Größe. Die aus SV-PET und SV-Est synthetisierten Proteine waren, 50 wie erwartet, infolge ihrer C-terminalen Verkürzung etwas kleiner als das Wildtyp-E-Protein.

b. Analyse der Sekretion von rekombinantem Protein im Zellüberstand

Überstände von transfizierten Zellen wurden quantitativ auf das Vorhandensein von Protein E an den 55 Tagen 0 bis 4 nach der Transfektion unter Verwendung eines vierschichtigen ELISA, wie in Heinz et al., J.Biol.Stand. (1986), 14: 133-141 beschrieben, analysiert. Die in Fig. 5 dargelegten Ergebnisse zeigen, daß nur jene Konstrukte, die das prM-Protein co-exprimieren, zur Sekretion von Protein E führten. Immunopräzipitation aus den Überständen (Fig. 6) bestätigte, daß die abgeschiedenen Proteine dieselbe Größe hatten

wie die entsprechenden intrazellulären Proteine (vgl. Fig. 4).

Die Sekretion des rekombinanten Proteins stellt einen enormen Vorteil für Produktionszwecke dar, da damit die Notwendigkeit der Lyse der Zellen zur Gewinnung des erwünschten Proteins und des Entfernens von kontaminierendem Zellmaterial eliminiert wird. Unter geeigneten Bedingungen ermöglicht dies auch die 5 kontinuierliche Ernte des rekombinanten Proteins, ohne die Zellen zu zerstören.

c. Charakterisierung von abgeschiedenen rekombinanten Proteinen

Die in Fig. 5 gezeigten Überstände wurden einer Saccharose-Dichtegradienten-Zonalzentrifugation unter 10 Verwendung von 5 bis 30% (Masse/Masse) Saccharose-Gradienten und eines Beckman SW-40-Rotors unterzogen. Die Zentrifugation erfolgte bei 38000 U/min und 4 °C 100 Minuten lang. Die Gradienten wurden fraktioniert, und Protein E wurde in jeder Fraktion mittels vierschichtigem ELISA (s. Heinz et al., J.Biol.Stand. (1986) 14: 133-141) quantitativ bestimmt. Der Überstand aus Virus-infizierten Zellen wurde als Kontrolle verwendet, welche zwei Protein-E-hältige Peaks (Fig. 7) ergab, wovon einer dem kompletten Virus 15 und einer dem sogenannten nicht-infektiösen "langsam sedimentierenden Hämagglutinin" ("slowly-sedimenting hemagglutinin" (SHA)) (s. Russel et al. (1980), Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In: Schlesinger, R.W. (ed.) The Togaviruses, 503-529, Academic Press) entsprach. Der Überstand aus den mit SV-PEwt transfizierten Zellen enthielt eine partikuläre Form von E mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit 20 ähnlich dem viralen SHA, während das C-terminal verkürzte Protein E von SV-PEst keine stabilen Teilchen bildete und oben auf dem Gradienten verblieb.

Die partikuläre Form aus SV-PEwt wurde "rekombinantes subvirales Teilchen" ("recombinant subviral particle", rSP) genannt, und die lösliche Form aus SV-PEst "rekombinantes E""(rE").

Eine Behandlung von rSP mit 0,5% Triton X-100 dissozierte die Teilchen, wie durch die Sedimentationsanalyse von Fig. 8 gezeigt, was auf die Anwesenheit einer Lipidmembran hindeutet.

25

Präparation von rSP und rE"

a. Reinigung von rSP

Überstände von mit SV-PEwt transfizierten COS-Zellen wurden durch 30minütige Zentrifugation bei 30 10000 U/min bei 4 °C in einer Sorvall-Hochgeschwindigkeitszentrifuge geklärt, und die Teilchen wurden dann durch Zentrifugieren bei 44000 U/min, 4 °C, während 120 min geerntet, wobei ein Beckman Ti45 Rotor verwendet wurde. Die rSP-hältige Pellet-Fraktion wurde in TAN-Puffer, pH 8,0, resuspendiert und auf 35 einen 5-20% Saccharose-Gradienten, der mit demselben Puffer erzeugt worden war, aufgetragen. Nach 90minütiger Zentrifugation bei 38000 U/min und 4 °C unter Verwendung eines Beckman SW40-Rotors wurden die Proben fraktioniert, und die Peak-Fraktionen wurden durch Testen auf HA-Aktivität (Clarke und Casals, 1958, Aver.J.Trop.Med.Hyg. 7: 561-573) identifiziert. Peak-Fraktionen aus dem Zonalgradienten wurden mittels Gleichgewichts-Zentrifugation (35.000 U/min, 4 °C, über Nacht) weiter gereinigt, und die 40 Fraktionen wurden wiederum mittels HA identifiziert. Gesamtprotein E wurde mittels 4-schichtigem ELISA quantitativ bestimmt, und die Reinheit wurde unter Verwendung von Coomassie-Blau-Färbung mittels SDS-PAGE bestimmt (Fig. 9).

b. rE"-Präparation

45 Serum-freie Überstände aus SV-PEst-transfizierten COS-Zellen wurden wie oben beschrieben geklärt und durch Ultrafiltration etwa 15-fach konzentriert.

2. Charakterisierung in Bezug auf native Proteinstruktur

50 Die solcherart hergestellten Präparationen wurden den folgenden Analysen unterzogen:
a. Analyse der Antigenstruktur mit monoklonalen Antikörpern
b. Fähigkeit zu säureinduzierten Konformationsänderungen
c. Hämagglutinationsaktivität

55 zu a. Antigenstruktur

Die Antigenstruktur des Formalin-inaktivierten Ganzvirus, von rSP und rE" wurde mit jener des nativen infektiösen Virus unter Verwendung von 19 Protein-E spezifischen monoklonalen Antikörpern verglichen

(Mandl et al. 1989, J. Virol. 63: 564-571; eigene Versuche). Die Reaktivität jedes einzelnen monoklonalen Antikörpers mit jeder der obigen Präparationen wurde in einem 4-Schichten ELISA wie von Heinz et al., J.Biol.Stand. (1986), 14: 133-141 beschrieben, analysiert. Dabei wurden alle Antigenpräparationen in einer vorher bestimmten, konstanten Konzentration des Proteins E von 1 µg/ml und jeder der monoklonalen Antikörper in einer Verdünnung eingesetzt, die mit dem nativen, infektiösen Virus einen Extinktionswert im Bereich von 0,5 bis 1,6 ergab.

Wie aus der Fig. 10 hervorgeht, ist das Reaktivitätsmuster mit den mAKs bei rSP und dem infektiösen Virus praktisch identisch, sodaß davon ausgegangen werden kann, daß das Protein E in den rSPs in derselben nativen Form wie auch am infektiösen Virus vorliegt.

Die Formalininaktivierung hingegen bewirkt signifikante Veränderungen in der Antigenstruktur, von der auch Epitope betroffen sind, die neutralisierende Antikörper binden. Dies betrifft sowohl den neutralisierenden mAk i2 (Mandl et al., 1989, J.Virol. 63: 564-571), dessen Epitop durch Formalinbehandlung zerstört wird, als auch Epitope im Bereich der Domäne A sowie in der Domäne B (Mandl et al., 1989, J.Virol. 63: 564-571), die zumindest eine verringerte Reaktivität aufweisen. Diese Analyse zeigt auch, daß E* in seiner Struktur keineswegs dem nativen Protein E an der Virusoberfläche entspricht.

zu b.) Säureinduzierte Konformationsänderungen

Das TBE-Virus dringt mit Hilfe von Rezeptor-vermittelter Endocytose in Zellen ein und gelangt dadurch in Endosomen, deren saurer pH (<6,4) eine spezifische Konformationsänderung induziert, die für die Fusion der Virusmembran mit der Endosomenmembran und damit für die Infektiosität des Virus erforderlich ist. Diese strukturellen Veränderungen können durch die Änderung der Reaktivität einzelner mAKs verfolgt werden (Heinz et al., 1994, Virology 198: 109-117) und betreffen unter anderem die Epitope i2 und IC3 (starke Reduktion der Reaktivität) bzw. C6 (verstärkte Reaktivität), nicht aber das Epitop B3.

Diese Veränderungen sind für die Funktion des Proteins E essentiell. Die Fähigkeit, auf sauren pH in der beschriebenen Weise zu reagieren, stellt daher ebenfalls ein Kriterium dafür dar, ob das Protein E in einer nativen, dem infektiösen Virus entsprechenden Form vorliegt. Präparationen von rSP, rE* und infektiösem Virus in Triethanolaminpuffer pH 8,0 wurden mit Hilfe eines Puffers enthaltend 0,05 M MES, 0,1 M NaCl und 0,1% Rinderalbumin gemischt, sodaß ein pH-Wert von 6,0 entstand. 10 Min. bei 37 °C inkubiert und dann mit Hilfe von Triethanolamin wieder auf pH 8,0 eingestellt. Dann wurde die Reaktivität dieser Präparationen vor und nach Inkubation bei saurem pH mit den mAKs B3, i2, IC3 und C6 in einem 4-Schicht ELISA wie unter "Antigenstruktur" beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind in den Fig. 11 und 12 dargestellt und zeigen, daß saurer pH im Protein E der rSPs die gleichen strukturellen Veränderungen verursacht wie im infektiösen Virus (s. Fig. II), daß aber die gleiche Analyse bei rE* keinerlei Hinweise auf ähnliche Umlagerungen ergibt (s. Fig. 12).

zu c) Spezifische Hämagglutinationsaktivität

Eine charakteristische Eigenschaft des infektiösen FSME Virus ist seine Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen Gänseerythrozyten agglutinieren zu können (Hämagglutinationsaktivität). Diese Eigenschaft wird dem Virus durch das Protein E vermittelt und ist somit ein weiterer Indikator für das Vorliegen einer nativen, funktionellen Struktur dieses Proteins. Hämagglutinationstests wurden wie von Clarke und Casals (1958), Amer.J.Trop.Med.Hyg. 7: 561-573 beschrieben unter Verwendung von Gänseerythrozyten bei einem pH von 6,4 durchgeführt.

Infektiöses Virus, Formalin-inaktiviertes Virus, rSP und rE* wurden auf einen im ELISA bestimmten Antigengehalt von 5 µg/ml eingestellt und im Hämagglutinationstest analysiert. Das Ergebnis ist in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt. Daraus geht hervor, daß rSP die gleiche spezifische Hämagglutinationsaktivität besitzt wie infektiöses Virus, und daß diese durch Protein E vermittelte Aktivität bei der Formalininaktivierung fast vollständig verloren geht. Die Präparation rE* besitzt keinerlei meßbare HA-Aktivität.

Tabelle 1

HA-Aktivität		
	Präparation	HA-Titer
5	Infektiöses Virus	512
	Formalin-inakt. Virus	4
10	rSP	512
	rE*	< 2

3. Immunogenität in Mäusen

15 Die Immunogenität folgender Antigen-Präparationen wurde durch Immunisierung von Mäusen analysiert:

- Formalin-inaktiviertes gereinigtes Virus
- rSP
- rE*

20 Der Gehalt an Protein E wurde in einem Enzymimmunoassay ermittelt (Heinz et al., 1986, J.Biol.-Stand. 14: 133-141) und alle Präparationen wurden auf dieselbe Antigenkonzentration von 5 µg/ml eingestellt. Entsprechend der derzeit verwendeten TBE-Vakzine (FSME-Immun®) wurde als Verdünnungspuffer PBS pH 7,4, enthaltend 0,1% Humanalbumin verwendet und 0,2% Al(OH)₃ als Adjuvans zugegeben. Die Immunogenität von rSP und rE* wurde auch ohne Zugabe von Adjuvans getestet.

25 Immunisierungsprotokoll:

Mit jeder der Präparationen wurden Gruppen von je zehn 15 g schweren Swiss albino Mäusen (5 Weibchen und 5 Männchen) zweimal im Abstand von 14 Tagen subcutan immunisiert, wobei pro Maus und 30 Immunisierung 0,2 ml des Antigens verabreicht wurden. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung erfolgte die Blutabnahme und alle Mäuse wurden mit 500 LD₅₀ des mäusepathogenen TBE-Virusstammes Hypr intraperitoneal infiziert (Challenge Test). Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen auf das Auftreten einer zum Tode führenden Enzephalitis beobachtet.

Identische Aliquots des Serums jeder einzelnen Maus aus einer 10er Gruppe, die mit dem selben 35 Immunogen immunisiert worden waren, wurden gepoolt und der TBE-Virus-spezifische Antikörpergehalt im Enzymimmunoassay (ELISA), Hämagglutinationshemmungstest (HHT) und Neutralisationstest analysiert.

Der ELISA wurde unter Verwendung von gereinigtem TBE-Virus als Antigen wie von Heinz et al. (1984), J.Gen.Viro 65: 1921-1929 beschrieben durchgeführt. Der HHT erfolgte wie von Clarke und Casals (1958), Amer.J.Trop.Med.Hyg. 7: 561-573 beschrieben, wobei Gänseerythrozyten bei einem End-pH von 6,4 40 eingesetzt wurden. Für den Neutralisationstest wurden BHK-21 Zellen und eine Viruskonzentration von 500 infektiösen Einheiten verwendet.

Die Ergebnisse des Immunisierungsversuches sind in der nachstehenden Tabelle 2 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß rSP sowohl ohne als auch mit Adjuvans genauso wie das Formalin-inaktivierte 45 Ganzvirus alle Mäuse vor einer tödlichen Dosis des TBE-Virus schützte. Im Gegensatz dazu war nach Immunisierung mit rE* keine (ohne Adjuvans) oder nur eine minimale Schutzwirkung (mit Adjuvans) zu beobachten.

In Bezug auf die Antikörperinduktion waren die rSPs dem Formalin-inaktivierten Virus sogar überlegen, besonders deutlich bei Verwendung des Al(OH)₃ Adjuvans. Dies betrifft sowohl die im ELISA nachgewiesenen Virus-bindenden Antikörper als auch die - für eine schützende Immunantwort noch bedeutenderen - im 50 HHT und NT gemessenen Antikörper, die also spezifische Funktionen des Virus (Hämagglutination bzw. Infektiosität) blockieren.

In Übereinstimmung mit der nicht vorhandenen bzw. geringen protektiven Wirksamkeit war auch die Antikörperinduktion durch rE* sehr niedrig bzw. nicht nachweisbar.

Es zeigt sich also, daß rSPs hervorragende Immunogene darstellen, die vor der ansonsten tödlich 55 verlaufenden Enzephalitis schützen und in Bezug auf die Induktion funktioneller, virusneutralisierender Antikörper, dem Formalin-inaktivierten Ganzvirus sogar überlegen sind.

Tabelle 2

Immunisierung von Mäusen					
	Challenge Test	Anzahl Überlebende pro Gesamtzahl (= 10)	Antikörper Titer		
			ELISA	HHT	NT
Formalin-inakt. Virus + Adjuvans	10/10	10000	40	20-40	
rSP ohne Adjuvans	10/10	12000	80-160	40-80	
rSP + Adjuvans	10/10	30000	160	160	
rE* ohne Adjuvans	0/10	100	< 10	< 10	
rE* + Adjuvans	1/10	4000	< 10	< 10-10	
Puffer Kontrolle	0/10	neg	< 10	< 10	

Virus Genes 8:3. 187-198, 1994 © 1994 Kluwer Academic Publishers, Boston, hergestellt in Holland

Expression von klonierten Hüllproteingenen vom Flavivirus Tick-Borne-Encephalitis-Virus in Säugetierzellen und Zufallsmutagenese mittels PCR

STEVEN L. ALLISON, CHRISTIAN W. MANDL, CHRISTIAN KUNZ & FRANZ X. HEINZ

Institut für Virologie, Universität Wien, Wien, Österreich

Erhalten am 7. Mai 1993; angenommen am 14. Juli 1993

Ansuchen um Nachdruck sollten gerichtet werden an: Steven L. Allison, Institut für Virologie, Universität Wien, Kinderspitalgasse 15, A-1095 Wien, Österreich

Zusammenfassung. Die strukturellen Membranproteine prM und E des Flavivirus Tick-Borne-Encephalitis-(TBE)-Virus wurden in Säugerzellen zwecks Analyse der Struktur und molekularen Wechselwirkungen dieser Proteine exprimiert. Man machte sich dabei die natürliche Fehlerhäufigkeit der Taq-Polymerase zunutze, die bei der Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion PCR verwendet wurde, um eine zufällig mutierte Population von Genen zu erzeugen, die dann unter der Kontrolle eines SV40-Promotors direkt in Plasmidexpressionsvektoren kloniert wurden. Eine Analyse der Mutationsfrequenz durch direktes Sequenzieren von 22 separaten Klonen zeigte, daß die PCR Mutationen mit einer Rate produzierte, die durchschnittlich ein bis zwei Aminosäureänderungen pro Klon im 496 Aminosäure-langen Protein E lieferte. Das ist eine ideale Rate zur Bewertung der Bedeutung einzelner Aminosäurereste innerhalb von Proteindomänen, wodurch der potentielle Wert der PCR als Zufallsmutageneseverfahren gezeigt wird. Für Wildtyp-prM- und -E-Proteine sowie eine deletierte E-Form kodierende Klone wurden auch durch Vereinigung von Teilen selektierter PCR-Klone konstruiert. Die Transfektion von COS-1-Zellen mit diesen Konstrukten resultierte in der Expression der prM- und E-Proteine, was durch indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern (Mabs) nachgewiesen wurde. Der intrazelluläre Gehalt an TBE-Virusantigen, gemessen in Lysaten von transfektierten Zellen mittels ELISA, erreichte annähernd 25 % von jenem, der in virusinfizierten COS-Zellen gefunden wurde. Weiters wurde mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung einer Reihe von 19 anti-E-Mabs gezeigt, daß die Antigenstruktur der exprimierten E-Proteine nahezu identisch mit jener des E-Proteins infizierter Zellen war, wodurch die Eignung dieses Modellsystems als Werkzeug bei der Untersuchung der Flavivirus-Proteinstruktur bestätigt wurde.

Stichwörter: Flavivirus, Tick-Borne-Encephalitis-Virus, Strukturproteine, Polymerase-Kettenreaktion, Mutagenese.

Einleitung

Tick-Borne-Encephalitis-(TBE)-Virus ist ein wichtiger Krankheitserreger beim Menschen und gehört zur Gattung Flavivirus innerhalb der Familie Flaviviridae. Es ist endemisch in Zentraleuropa, Skandinavien und Teilen von Asien und stellt in diesen Gebieten ein signifikantes Problem für die öffentliche Gesundheit dar (1).

Das Flavivirus-Virion besteht aus einem Nucleocapsid, welches das positiv-Strang-RNA-Genom in Verbindung mit dem viralen Capsid(C)-Protein enthält. Das Nucleocapsid ist von einer Lipiddhülle umgeben, die die membran-assoziierten Proteine E (50-60 kD) und M (7-8 kD) enthält (2).

Das Haupthüllprotein E spielt eine zentrale Rolle in der Biologie von Flaviviren, indem es bedeutende virale Eintrittsfunktionen vermittelt und eine protektive Immunantwort im Wirt auslöst. Eine detaillierte Analyse der Struktur und der funktionellen Aktivitäten dieses Proteins ist daher von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Virulenzmechanismen, für die Gestaltung neuer Vakzine und für die Entwicklung antiviraler Strategien. Es gibt bereits eine beträchtliche Menge an Informationen betreffend die Struktur des Hüllproteins E des TBE-Virus, und es wurde ein Strukturmodell auf Basis einer Vielzahl von biochemischen und immunologischen Daten vorgeschlagen (3,4). Die Analyse von in natürlichen und im Labor erzeugten TBE-Virusisolaten vorkommenden Mutationen gab Einsicht in die Organisation des E-Proteins (5,6), doch erfordert das tiefere Eindringen in das Strukturmodell und die Identifikation spezifischer funktioneller Domänen die Schaffung und Analyse einer großen Anzahl von veränderten Proteinen.

Das prM-Protein ist der intrazelluläre Vorläufer von Protein M. Letztere Form findet sich nur in reifen Virionen, wogegen in infizierten Zellen und in unreifen Virionen die prM-Form in einem heteromeren Komplex mit Protein E auftritt (7,8). Kurz vor der Freisetzung des Virus aus der Zelle wird das prM-Protein gespaltet, u.zw. wahrscheinlich durch eine zelluläre trans- oder post-Golgi-Protease (9). Diese Spaltung induziert offensichtlich eine Reorganisation der Membranproteine, wodurch es zur Bildung von homooligomeren Formen von E kommt (7,10). Untersuchungen mit unreifen Virionen, die prM enthalten, zeigten, daß die prM-Spaltung offensichtlich notwendig für die Infektiosität und E-Protein-vermittelte Fusionsaktivität ist (11, 12). Es wird derzeit geglaubt, daß die Funktion von prM darin besteht, zu verhindern, daß das E-Protein durch einen niedrigen pH-Wert induzierte Konformitätsänderungen während des intrazellulären Transports in sauren Vesikeln durchmacht, was zu vorzeitigen Fusionsvorgängen und Inaktivierung des Virus führen würde (8,12). Derzeit weiß man jedoch wenig über spezifische Bereiche von prM und E, die bei gegenseitigen Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Eine Kartierung dieser Wechselwirkungen erfordert Co-Expressionsuntersuchungen unter Verwendung von deletierten oder mutierten Formen dieser Gene.

Eine detaillierte Analyse von prM- und E-Proteinen im Molekularbereich würde stark erleichtert durch die Erstellung eines Expressionssystems unter Verwendung einer gut charakterisierten Bank klonierter Virusgene, die zufällige Punktmutationen enthalten. Eine Expression dieser Gene und die Charakterisierung der resultierenden modifizierten Proteine könnte möglicherweise die Identifizierung bedeutender struktureller und funktioneller Elemente zulassen. Die Nützlichkeit eines solchen Systems wäre abhängig vom Grad, zu dem die Proteine in ihrer nativen Konformation erzeugt werden könnten und der Einfachheit, mit der die Gene manipuliert werden könnten.

Flavivirus-Proteine werden normalerweise als ein Einzelpolypeptid translatiert, von dem sämtliche viralen strukturellen und nicht strukturellen Proteine aufgrund von co-transkriptionaler und post-transkriptionaler Verarbeitung mittels einer Kombination von viralen und zellulären Proteasen (13) erzeugt werden. Die Membrantopologie und das Abzielen auf den Sekretionsweg der Hüllproteine werden teilweise durch interne Signale und Ankersequenzen innerhalb des Polyproteins bestimmt. Eine Anzahl von post-transkriptionalen Prozessierungs-Ereignissen, wie Disulfidbrückebildung, Glycosylierung und proteolytische Spaltung sind auch in der Bildung nativer Membranproteine involviert. Daher ist es für eine Untersuchung dieser Proteine in ihrem nativen Zustand notwendig, daß sie in eukaryontischen Zellen exprimiert werden.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (14) ist eine leistungsfähige und vielseitige Technik zum Amplifizieren und Klonieren spezifischer Bereiche eines Genoms. Die beim Amplifizierungsvorgang verwendete Taq-Polymerase besitzt keine Korrekturesefunktion und ist daher relativ fehleranfällig mit einer gemessenen Fehlerhäufigkeit von $1,1 \times 10^{-4}$ pro Nukleotid (15). Diese Fehlerhäufigkeit ist bei Verwendung in einer Mehrfachzyklus-Amplifikation dazu geeignet, Zufallsmutationen in eine Genpopulation einzuführen.

In dieser Abhandlung führen wir die Verwendung der PCR zum Klonieren des TBE-Virus E-Gens oder der prM + E-Gene und Expression dieser Gene in COS-Zellen vor. Wir evaluieren auch die Eignung der PCR zur Erzeugung von Zufallsmutationen und präsentieren eine gut charakterisierte Bank mutanter Expressionskonstrukte zur Charakterisierung von Flavivirus-Membranproteinen.

Materialien und Methoden

50

Virusproduktion und -reinigung

Primäre Hühnerembryofibroblasten wurden mit dem TBE-Virus-Prototypstamm Neudörfl aus Gehirnsuspensionen von Mäusesäuglingen infiziert. Virusnachkommen wurden 2 Tage nach der Infektion aus Zellkulturerständen mittels Ultrazentrifugation gewonnen und mit zwei Saccharose-Dichtegradientenzentrifugationszyklen gereinigt, wie früher beschrieben (16).

Isolation viraler RNA und cDNA-Synthese

Virale RNA wurde aus gereinigten Virussuspensionen durch Extraktion mit Phenol und Chloroform und anschließender Ethanolpräzipitation, wie früher beschrieben (17), isoliert. Etwa 1 µg dieser RNA und 100 ng von Hexanucleotidprimern mit Zufallssequenz wurden dann für die Doppelstrang-cDNA-Synthese mittels dem Verfahren nach Gubler und Hoffmann (18) unter Verwendung eines cDNA-Synthesesets von Boehringer Mannheim entsprechend den Instruktionen des Herstellers verwendet.

Polymerase-Kettenreaktion

Synthetische Oligonucleotidprimer wurden zur Amplifizierung von Teilen der cDNA entsprechend entweder dem TBE-Virus prM + E-Bereich oder E allein verwendet. Alle in dieser Abhandlung verwendeten Nukleotidkoordinaten sind ausgehend von Mandl et al. (17) dahingehend überarbeitet, daß sie die ersten 20 Nukleotide des TBE-Genoms (19) enthalten. Die 5'-Primer für die prM + E- und nur-E-Konstrukte waren 27-mer mit den Sequenzen AAGCGGCCGCATGGTTGGCTTGAAA bzw. AAGCGGCCGCATGGT-TACCGTTGTG. Die ersten 11 Nucleotide von jeder bestanden aus einer künstlichen Sequenz, enthaltend eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym NotI (GCGGCCGC), gefolgt von einer 16-Nucleotidsequenz entsprechend entweder den Nucleotiden 388-403 (SV-PE-Reihe) oder 883-898 (SV-E-Reihe). In jedem Fall wurde ein natürlich vorkommendes ATG-Codon stromaufwärts des entsprechenden Gens als Startcodon verwendet, und der Primer war so gestaltet, daß er AGT in einem geeigneten Kontext (GCCGCCATGG) für effiziente Translationsinitiation in COS-Zellen aufweist (20, 21). Das gleiche 28 Nukleotid-lange Oligonukleotid (ATGCGCCGCTAGTCATACCATTCTGAG) wurde als 3'-Primer für beide Konstruktionen verwendet. Dieser Primer war an seinem 3'-Ende komplementär zu den Nucleotiden 2535-2550 und enthielt an seinem 5'-Ende eine NotI-Stelle und das Komplement (CTA) eines TAG-Stoppcodons im selben Leserahmen.

Die PCR-Amplifikation wurde unter im wesentlichen Standardbedingungen gemäß dem Cetus-Protokoll (14) durchgeführt. Die Reaktionsmischungen enthielten 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, jeweils 200 µM dNTP, 10 ng jedes Primers, 10 µl einer 1000fachen Verdünnung der cDNA-Matze und 3 E AmpliTaq-Polymerase (Perkin Elmer Cetus) in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Die Proben wurden mit 100 µl Paraffinöl überdeckt und in einem Perkin Elmer Temperaturwechsler amplifiziert.

Die Proben wurden 6,5 min auf 94 °C gehalten, dann auf eine Annealing-Temperatur von 40 °C gekühlt, bevor Taq-Polymerase zugegeben wurde. Insgesamt wurden 35 Amplifikationszyklen durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus 1,5 min bei 94 °C, 3 min bei 40 °C und 7 min bei 68 °C. Die Proben wurden mittels Phenol- und Chloroformextraktion gereinigt, Ethanol ausgefällt und in sterilem doppelt destilliertem Wasser wiedergelöst. Die Qualität und Quantität der PCR-Produkte wurde mittels Agarosegelektrophorese ermittelt, und die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt, bis sie für die anschließenden Klonierschritte gebraucht wurden.

Klonierung, Transformation und DNA-Sequenzierung

Für sämtliche Klonier- und Transformationsschritte wurden Standard-DNA-Methoden verwendet (22). Restriktionsenzyme und DNA-Ligase wurden bei New England Biolabs bzw. Stratagene gekauft.

Der Plasmidvektor pSV46, der zur Konstruktion von Expressionsklonen verwendet wurde, wurde großzügigerweise von Dr. Uwe Schlokat (Immuno AG, Orth, Österreich) bereitgestellt. Der Vektor war ein Derivat des auf SV40 basierenden eukaryontischen Expressionsvektors pSVβ (Clontech), von dem das das β-Galactosidasegen enthaltende Insert (23) durch Verdau mit NotI und Religation entfernt worden war. Ein Teil des Polylinkers stromabwärts von der Translations-Stopstelle wurde auch durch Verdau mit XbaI und HindIII, Klenow-Einfüllung und Religation entfernt.

PCR-Produkte wurden zur Bildung von kompatiblen Enden mit NotI verdaut und in Plasmid psV46 ligiert, welches mit NotI linearisiert und zur Verhinderung einer Rezirkulation des Vektors dephosphoryliert wurde. Die Transformation des E. coli-Stamms HB101 wurde unter Verwendung der Ligationsmischungen ausgeführt, und es wurden ampicillinresistente Kolonien ausgewählt. Plasmide mit richtig orientierten Inserts wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert und mittels CsCl-Gradientenzentrifugation gereinigt.

Für jedes Plasmidkonstrukt wurde gereinigte doppelsträngige Plasmid-DNA aus einer einzigen Präparation für die DNA-Sequenz-Bestimmung verwendet. Die Sequenzierungsreaktionen wurden in einem Perkin-Elmer-Temperaturwechsler unter Verwendung von TBE-spezifischen Primern, AmpliTaq-Polymerase (Perkin Elmer Cetus) und mit fluoreszierendem Farbstoff markierten Didesoxyterminatoren gemäß den Instruktionen des Herstellers (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Produkte der Sequenzierungsreaktionen wurden auf

einem automatischen DNA-Sequenzer 373A von Applied Biosystems analysiert.

Infektion und Transfektion von COS-Zellen

- 5 COS-1-Zellen (24) (freundlicherweise von M. Huber und M. Billeter, Universität Zürich bereitgestellt) wurden
in "COS-Medium", bestehend aus Dulbecco's MEM (Gibco-BRL), ergänzt mit 10 % fötalem Rinderserum,
Penicillin (100 E/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten.
Plasmide, enthaltend klonierte TBE-Gene, wurden durch liposom-vermittelte Transfektion unter Verwen-
nung einer Modifikation des Verfahrens von Felgner et al. (25) in COS-1-Zellen eingebracht. Lipofectin-
10 Reagens (Gibco-BRL) wurde in Opti-MEM-I-reduziertem Serummedium (Gibco-BRL) auf 20 µg/ml verdünnt
und mit einem gleichen Volumen an OptiMEM-I, enthaltend 8 µg/ml der entsprechenden Plasmid-DNA
gemischt. Pro Transfektion wurden 5 µg Lipofectin und 2 µg Plasmid-DNA verwendet. Die Mischung wurde
15 min bei Raumtemperatur zur Bildung von DNA-Lipofectin-Komplexenstehengelassen, und 0,5 ml dieser
Mischung wurden in jede Vertiefung einer Zellkulturplatte (Nunc) mit 24 Vertiefungen, enthaltend Zellen, die
15 zur Entfernung von Spuren von Serum aus dem Wachstumsmedium zweimal mit 1 ml OptiMEM gewaschen
worden waren, zugegeben. Die Zellen wurden mit der DNA-Lipofectin-Mischung 5 h bei 37 °C, 5 % CO₂,
inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 1 ml komplettem COS-Medium, und die Inkubation wurde über Nacht
fortgesetzt. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und durch frisches COS-Medium
ersetzt, und die Inkubation wurde fortgesetzt bis ca. 46 h nach der Transfektion, zu welchem Zeitpunkt
20 Zellen entweder zur Immunfluoreszenzanalyse fixiert oder zur Analyse auf intrazelluläres Antigen mittels
ELISA aufgelöst waren.

Das Verfahren zur Infektion von COS-Zellen mit TBE-Virus für Immunfluoreszenz-Kontrollen war im
wesentlichen identisch mit dem Transfektionsverfahren, mit der Ausnahme, daß anstelle von Plasma-DNA
25 und Lipofektin TBE-Virus in Form einer Gehirnsuspension von Mäusesäuglingen, die 100fach in Opti-MEM-
I-Medium verdünnt war, verwendet wurde.

Immunfluoreszenzbestimmung

- Auf Glasdeckgläsern gezüchtete COS-Zellen wurden 46 h nach der Infektion oder nach der Transfektion in
30 einer 1:1-Mischung von Aceton und Methanol 10 min lang bei -20 °C fixiert. Eine indirekte Standardimmun-
fluoreszenz wurde unter Verwendung von entweder polyklonalem Kaninchenantiserum, das gegen TBE-
Virusprotein- "Rosetten" (26) und Fluoreszein-konjugiertes Schafanti-Kaninchen-IgG (Wellcome) gezogen
worden war, oder E- oder prM-spezifischen monoklonalen Antikörpern und FITC-konjugiertem Ziegen-anti-
35 Mäuse-IgG (Jackson ImmunoResearch) durchgeführt. Das anti-prM MAbs 8H1, das gegen das prM-Protein
von Langat-Virus, einen nah verwandten, von Zecken übertragenen Flavivirus, gerichtet war, wurde großzü-
gigerweise von L. Iacono-Connors (Fort Detrick, MD) zur Verfügung gestellt. Die Produktion und Charakteri-
sierung der Reihe von 19 E-spezifischen MAbs ist vorbeschrieben (4,27). Primärer Antikörper (Serum oder
40 AscitesFlüssigkeit wurde 50fach in PBS verdünnt, und 25µl dieser Verdünnung wurden zu jedem Deckglas
zugegeben. Die Zellen wurden dann bei 37 °C 45 min lang in einer Feuchtkammer mit Antikörper inkubiert.
Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 25µl fluoreszierender sekundärer Antikörper, 10fach in PBS
45 + 0,001% Naphthalin-Schwarz verdünnt, zugegeben und 45 min lang bei 37 °C mit Zellen inkubiert. Nach
zwei weiteren PBS-Waschungen und 30minütigem Trocknen unter einem Ventilator wurden die Deckgläser
mit DePex (Serva) auf einen Mikroskop-Objekträger befestigt. Die Präparate wurden unter Verwendung
eines Nikon FXA-Fluoreszenz-Mikroskops photographiert.

45 *ELISA*

- TBE-Virusproteine exprimierende COS-Zellen wurden durch Zugabe von 100µl eines 0,05 M Triethanolam-
min, pH 8,0, 0,1 M NaCl und 1% Triton X-100 enthaltenden Puffers direkt zu den Zellen in jeder Vertiefung
50 einer Platte mit 24 Vertiefungen gelöst. Nach 30 min auf Eis wurden die Lysate in Mikrozentrifugenröhren
transferiert, durch 5minütige Zentrifugation bei 4 °C in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge geklärt und bei
-80 °C gelagert.

TBE E-Protein wurde durch vierschichtigen ELISA wie zuvor beschrieben (28) quantitativ bestimmt,
wobei gereinigter TBE-Virus, der 1 h bei Zimmertemperatur in Lyse-Puffer vorbehandelt worden war, als
55 Standard verwendet wurde.

Ergebnisse*Klonierung und Mutagenese von TBE-Struktur-Genen durch PCR*

5 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde, wie in Materialien und Methoden beschrieben, verwendet, um eine Minibank von cDNA-Plasmid-Klonen mit Inserts zu konstruieren, die entweder dem prM + E-Bereich (SV-PE-Reihe), Nucleotide 388-2550, oder dem E-Bereich (SV-E-Reihe), Nucleotide 883-2550, des TBE-Virus-Genoms entsprachen (Fig. 13).

Da die TBE-Virus-Strukturproteine normalerweise durch Co-Translationsprozessierung eines großen Polypeptid-Vorläufers erzeugt werden, wurden die Translations-Start- und -Stop-Stellen in die Enden der PCR-Produkte eingeführt, indem sie in die Oligonukleotid-Primer eingebaut wurden. In jedes Konstrukt wurde ein natürliches ATG-Codon, das in einem geeigneten Kontext platziert war, um als Initiator-Codon zu dienen, stromaufwärts der internen Signalsequenz eingeführt, um eine natürliche Prozessierung durch die Wirts-Signalase und das richtige Hinführen in den Sekretionsweg zu ermöglichen. Auf ähnliche Weise wurde das TG-Stop-Codon in jedem Konstrukt stromabwärts der Signalase-Spaltungsstelle, die den Carboxy-Terminus von Protein E bildet, platziert. Die Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym NotI wurden ebenfalls in die Enden eingebaut, um ein nachfolgendes Klonieren der PCR-Produkte zu erleichtern.

Die PCR-DNAs wurden mit NotI geschnitten und in die NotI-Klonierungsstelle des Plasmidvektors pSV46, eine modifizierte Form von pSV β (vgl. Materialien und Methoden), ligiert, was ermöglichte, daß korrekt inserierte Gene unter der Steuerung des frühen SV40-Promoters exprimiert wurden (23). Der Vektor stellte auch ein Polyadenylierungssignal für eine effiziente Expression und einen SV40-Replikationsursprung zur Verfügung, um eine Replikation der rekombinanten Plasmide in transfektierten COS-Zellen, die konstitutiv das große SV40-T-Antigen exprimieren (24) zu ermöglichen.

Die Ligationsmischungen wurden zur Durchführung einer Transformation in *E. coli* verwendet, und einzelne Kolonien, die einzelne Klone repräsentierten, wurden isoliert. Die Orientierung des Inserts in jedem Plasmid wurde durch Verdau mit Restriktionsenzymen und Agarose-Gelektrophorese bestimmt. Klone mit richtig orientierten Inserts wurden zur weiteren Analyse behalten.

Analyse von PCR-erzeugten Mutationen

30 Um eine detaillierte Analyse der klonierten Inserts durchzuführen und die Effizienz der Mutagenese durch Taq-Polymerase zu beurteilen, wurden 13 einzelne *E. coli*-Klone, die Plasmide der SV-PE-Serie enthielten und 9, die Plasmide der SV-E-Serie enthielten, ausgewählt. Die Plasmid-DNA aus jedem Klon wurde gereinigt und durch vollständiges Sequenzieren der klonierten Inserts in beiden Strängen analysiert. Die cDNA-Sequenzen wurden dann mit der entsprechenden RNA-Sequenz des elterlichen Wildtyp-TBE-Virusstamms Neudörfel (17) verglichen.

Wie erwartet, enthielt jeder der Plasmid-Klone mehrere Nucleotidunterschiede in bezug auf die Wildtyp-TBE-Virussequenz. Mit einigen Ausnahmen (siehe unten) waren die meisten dieser Veränderungen Einzelmutationen, die offensichtlich während der PCR-Amplifikation eingeführt worden waren, und wurden nur in 40 einem einzigen Klon gefunden.

AT 402 897 B

Tabelle 3. Zusammenfassung PCR-erzeugter Mutationen

Klon	Nucleotid-änderungen ^a	Aminosäureänderungen ^b	
		prM	E
5	SV-PE		
	01	945 G→A 1122 G→C 1395 C→T 2027 T→C 2480 A→G ^c	Gln 50→His Val 353→Ala
10	02	551 T→A 1080 G→A 1153 T→C 1168 T→C 1690 A→G 2458 G→del	Val 24→Glu Ser 66→Pro Arg 240→Gly Ala 495 Leseramen- verschiebung
15	03	952 T→C 976 C→T 1163 A→G 1679 A→G 1839 T→A 1434 C→T 2275 A→T 2364 G→A	Cys 158→Arg Arg 2→Cys Lys 6→Arg Asn 236→Ser Met 306→Lys Lys 435→Stop
20	04 ^d	701 T→C 1488 C→A 1492 T→C 1893 T→A	Leu 74→Pro Cys 307→Stop
25	05 ^e		
30			
35			
40			
45			
50			

Tabelle 3 (Forts.)

Klon	Nucleotid-änderungen ^a	Aminosäureänderungen ^b	
		prM	E
06	782 T→C 865 A→G 1002 C→T 1972 G→A 1327 G→del 2248 G→A	Leu 101→Pro Lys 129→Glu Gly 334→Arg Ala 119 Leseramen- verschieb. Ala 426→Thr	
07 ^f	701 T→A 2092 A→G 2124 T→C	Leu 74→Gln Met 374→Val	
08	452 T→C 960 A→T 1746 A→G 2086 A→G 2142 T→C 2290 G→A 2361 A→G		Ile 372→Val Val 440→Ile
SV-PE	1625 A→G 2475 T→C		Asp 218→Gly
10 ^g	—		
11 ^g	1203 G→A 1366 T→C 1381 A→G 1723 G→A		Met 77→Ile Tyr 132→His Ile 137→Val Met 252→Ile
SV-E	2134 C→T 1239 C→T 1093 A→T 2301 C→T		Met 41→Leu
01 ^h	1321 G→A 1688 A→G 1717 G→A 2053 A→G 2092 A→G		Val 117→Ile Glu 239→Gly Ala 249→Thr Asn 361→Asp Met 374→Val
02	2073 T→C 2438 C→T		Ala 489→Val
03	938 T→C 973 T→C 2401 T→G	(Leu 153→Pro) ⁱ	Ser 1→Pro Ser 477→Ala
04	891 C→T 1151 G→A 1364 T→C 1567 A→G 2045 T→C		Cys 60→Tyr Val 131→Ala Ile 199→Val Ile 358→Thr
05	1257 T→C 1694 T→C 1794 A→G 2159 G→T		Leu 241→Pro Gly 396→Val
06	1806 A→G 2205 A→G 2491 A→del ^j		
07			
08			
09			

^aNucleotidkoordinaten betreffen gesamtes TBE-Genom.

^bAminosäurekoordinaten betreffen prM oder E.

^cAminosäureänderungen in NS1 oder C-Gen.

^dSV-PE04 als "SV-PEst" umbenannt und SV-E01 als "SV-Ewt." umbenannt.

^eAndere nicht durch PCR-erzeugte Mutationen nicht angeführt (vgl. Text).

^fNur der C-terminale Teil von prM war in diesem Konstrukt vorhanden.

50

Wie in Tabelle 3 dargestellt, enthielten die 22 sequenzierten Inserts (43.549 bp insgesamt) 71 einzelne Nucleotidänderungen, die auf Taq-Polymerase-Fehler zurückzuführen waren. Von diesen Änderungen führten 42 (59%) zu Substitutionen in der vorausgesagten Aminosäuresequenz und 3 zu Deletionen, die zu Rahmenverschiebungen führten (Tabelle 4).

55

Tabelle 4

PCR-Mutationshäufigkeit			
	Basenpaaränderungen	Anzahl des Auftretens ^a	Häufigkeit (pro bp)
5	G/C→A/T	20 (28%)	$4,59 \times 10^{-4}$
	G/C→T/A	2 (2,8%)	$4,59 \times 10^{-5}$
	G/C→C/G	1 (1,4%)	$2,30 \times 10^{-5}$
	A/T→G/C	37 (52%)	$8,50 \times 10^{-4}$
	A/T→C/G	1 (1,4%)	$2,30 \times 10^{-5}$
	A/T→T/A	7 (9,9%)	$1,61 \times 10^{-4}$
	G/C Deletion	2 (2,8%)	$4,59 \times 10^{-5}$
	A/T Deletion	1 (1,4%)	$2,30 \times 10^{-5}$
	Übergänge	57 (80%)	$1,31 \times 10^{-3}$
	Transversionen	11 (15%)	$2,53 \times 10^{-4}$
10	Alle Mutationen	71 (100%)	$1,63 \times 10^{-3}$
	Aminosäuresubst.	42 (59%)	$9,64 \times 10^{-4}$
	Stille Mutationen	24 (34%)	$5,51 \times 10^{-4}$
	Leserahmenverschiebungen	3 (4,2%)	$6,89 \times 10^{-5}$
	Terminationscodons	2 (2,8%)	$4,59 \times 10^{-5}$
20			

^a43549 Basenpaare sequenziert

Die Verteilung der Mutationen war stark zugunsten von A/T→G/C und G/C→A/T-Übergangsmutationen beeinflußt, wie bereits zuvor von anderen beobachtet worden war (29-31). Die Gesamtmutationshäufigkeit war $1,63 \times 10^{-3}$ pro Basenpaar bei einer 35-Zyklus-Amplifikation ($4,7 \times 10^{-5}$ pro Basenpaar pro Zyklus), was mit veröffentlichten Werten für die Fehlerhäufigkeit von Taq-Polymerase (15,32) übereinstimmt. Die durchschnittliche Aminosäuresubstitutionsrate war 0,46 pro Gen für prM (164 Aminosäuren lang) und 1,59 für E (496 Aminosäuren lang).

Eine stille Mutation am Nucleotid 930 war in allen Klonen vorhanden, und man nimmt an, daß sie als natürliche Mutation während der Virusvermehrung entstand. Außerdem wurde festgestellt, daß fünf Klonen der SV-PE-Serie, SV-PE05, SV-PE07, SV-PE11, SV-PE12 und SV-PE13, sieben identische Mutationen gemeinsam hatten, an den Nukleotiden 849, 1285, 1346, 1404, 1909, 2247 und 2255. Mit Ausnahme von SV-PE10, der drei der Mutationen (1909, 2247 und 2255) enthielt, war keine dieser in den anderen SV-PE-Klonen oder irgendeinem der SV-E-Klonen zu finden. Eine dieser Änderungen, eine Nucleotid-Deletion an der Position 1346, bewirkte eine Rahmenverschiebung am Codon 125 im E-Gen, und es wäre daher zu erwarten, daß sie ein nichtfunktionelles E-Protein ergeben. Da ein diese selben sieben Mutationen enthaltender Klon unabhängig von separaten cDNA- und PCR-Präparationen erhalten wurde (Daten nicht gezeigt), scheint es, daß diese Varianten bereits in der Virus-RNA-Population vor der Amplifikation vorhanden waren.

Diese besonderen Mutationen wurden daher in der Analyse der PCR-erzeugten Mutationen nicht inkludiert.

Konstrukte, die für Wildtyp- und deletierte E-Proteine codieren

Zusätzlich zu Klonen, die für einzelne Aminosäureänderungen codieren, waren wir auch an der Herstellung von prM + E und nur-E-Konstrukten, die für Wildtyp- und deletierte Proteine codieren, interessiert. Da jedoch alle der PCR-erzeugten Klonen der SV-PE-Serie Mutationen enthielten, die zu Änderungen in der Aminosäuresequenz führen würden, wurde eine direkte Subklonierung verwendet, um ein Wildtyp-Konstrukt herzustellen, das für unmodifizierte prM und E-Proteine sowie für eine deletierte Form des nur-E-Konstrukts codiert.

Die DNA-Sequenz des Plasmids SV-PE04 zeigte außer zwei stillen Mutationen eine Substitution von A durch T am Nucleotid 2275, wodurch das AAG-Codon für Lysin 435 von Protein E zu einem TAG-Stop-Codon geändert wurde (Tabelle 3). Es wird daher vorhergesagt, daß SV-PE04 für ein Wildtyp-prM-Protein und ein deletiertes E-Protein codiert, dem die Carboxy-terminalen 61 Aminosäurereste fehlen, welche den mutmaßlichen Membrandurchspannenden Bereich (3) beinhalten. Es zeigte sich, daß das Plasmid SV-E01, in welchem der Großteil des prM-Gens fehlt, nur eine stille Mutation im E-Gen enthielt, womit es für ein Wildtyp-E-Protein codiert.

Zur Schaffung eines prM + E-Konstrukts der gesamten Länge mit einer Wildtyp-Aminosäuresequenz und eines nur-E-Konstrukts ohne prM aber mit dem Stop-Codon am Nucleotid 2275, wurden Restriktions-

fragmente aus SV-PE04 und SV-E01 (nachfolgend SV-PEst bzw. SV-Ewt genannt) ausgetauscht, wie in Fig. 14 gezeigt. Zu diesem Zweck wurden zwei Spaltstellen für das Restriktionsenzym Cfr10I verwendet, eine zwischen den Nucleotiden 960 und 961, nahe der Grenze der prM- und E-Gene, und die andere im Ampicillin-Resistenzgen des Vektors. Eines der resultierenden Plasmidkonstrukte, SV-PEwt, enthielt das Wildtyp-prM-Gen aus SV-PEst und das Wildtyp-E-Gen aus SV-Ewt, während dem anderen, SV-Est, das prM-Gen fehlte, dieses aber das Stop-Codon-enthaltende E-Gen aus SV-PEst enthielt. Diese Änderungen wurden durch Sequenzieren der Inserts beider Plasmide bestätigt. Diese beiden Konstrukte vervollständigten ein Set aus vier Expressionsplasmiden zum Vergleichen der Struktur und der Verarbeitung von aus einem Wildtyp-Konstrukt (SV-PEwt) exprimierten E-Proteinen mit jenen, welchen prM (SV-Ewt), der E-Ankerbereich (SV-PEst) oder beides (SV-Est) fehlte.

Detection and quantitative determination of in COS-Zellen exprimierten TBE-Virus-Strukturproteinen

Zum Beweis, daß die oben beschriebenen Expressionsplasmide zur Expression von TBE-Virus-prM- und E-Proteinen in Säugerzellen verwendet werden könnten und zum Vergleich der Expressionsmengen mit Virus-infizierten Zellen wurden rekombinante Plasmide, die klonierte TBE-Virus-E- oder prM + E-Gene enthielten, durch Liposom-vermittelte Transfektion in COS-1-Zellen eingeführt. Die Expression der prM- und E-Proteine wurde durch indirekte Immunfluoreszenz (IF) nachgewiesen, wobei entweder Virusmembranprotein-spezifisches polyklonales Serum oder monoklonale Antikörper (Mabs), die gegen die Proteine prM oder E gerichtet waren, verwendet wurden. Die maximale Fluoreszenzintensität wurde etwa 46 h nach der Infektion beobachtet, wobei etwa 50% der Zellen TBE-Virus-Antigen exprimierten. Alle der in Tabelle 3 aufgezählten Plasmide ergaben in der IF-Untersuchung positive Ergebnisse, wenn polyklonales anti-TBE-Serum verwendet wurde, obwohl die Fluoreszenz schwach war bei Zellen, die mit den fünf Plasmiden transfektiert worden waren, welche die Rahmenverschiebung am Codon 125 von E enthielten. Fig. 15 zeigt, daß sowohl SV-PEwt als auch SV-Est ein E-Protein erzeugten, welches unter Verwendung von anti-E-Mab B3 in intrazellulären Membranen nachweisbar war. Erwartungsgemäß reagierten die mit SV-PEwt und SV-PEst, jedoch nicht die mit SV-Ewt und SV-Est transfektierten Zellen mit dem anti-prMK Mab 8HI, was beweist, daß das prM-Protein in diesen Zellen anwesend war.

Intrazelluläre E-Proteine in Lysaten von COS-Zellen, die mit SV-PEwt, SV-PEst, SV-Ewt und SV-Est transfektiert worden waren, sowie in COS-Zellen, die mit TBE-Virus infiziert worden waren, wurden unter Verwendung eines vierschichtigen ELISA quantitativ bestimmt, wobei mit Lyse-Puffer vorbehandelter, gereinigter TBE-Virus als Standard verwendet wurde. Wie in Tabelle 5 gezeigt, enthielten COS-Zellen, die mit SV-PEwt, dem Konstrukt mit den vollkommen intakten prM- und E-Genen, transfektiert worden waren, 46 h nach der Transfektion 13% so viel E-Protein wie die mit TBE-Virus infizierte Kontrolle. Da praktisch alle infizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz positiv waren (Daten nicht dargestellt), im Vergleich zu etwa 50% durch Transfektion, scheint die intrazelluläre Menge der E-Protein-Expression in SV-PEwt-transfektierten Zellen etwa ein Viertel von jener in Virus-infizierten COS-Zellen zu sein. SV-PEst, SV-Ewt und SV-Est, welchen der E-Anker, das prM-Gen, bzw. sowohl Anker als auch prM fehlt, enthielten alle etwas geringere Mengen an intrazellulärem Virus-Antigen zum Zeitpunkt von 46 h. (Tabelle 5).

Tabelle 5

Quantitative Bestimmung von TX-100-Lysaten von Plasmid-transfektierten und Virus-infizierten COS-Zellen mittels 4-schichtigem ELISA		
Virus oder Plasmid	E-Protein ($\mu\text{g/ml}$)	% Virus-infizierte Kontrolle
TBE-Virus	5,7	100
SV-PEwt	0,76	13
SV-Ewt	0,37	6,5
SV-PEst	0,24	4,2
SV-Est	0,16	2,8

Antigenstruktur rekombinanter E-Proteine

- Während einer natürlichen Infektion erzeugte Flavivirus-E-Proteine machen eine Anzahl posttranskriptionaler Modifikationen durch, wie eine Glykosylierung an spezifischen Asparaginresten und die Bildung von sechs Disulfidbrücken (33), die für die Erzeugung und Beibehaltung der nativen Struktur kritisch sind (2). Zur Beurteilung der strukturellen Integrität der exprimierten Proteine machten wir uns eine gut bekannte Reihe monoklonaler Antikörper zunutze, die 19 verschiedene Epitope am TBE-Virus-E-Protein erkennen. Bindungsuntersuchungen mit diesen Mabs zeigten, daß das E-Protein in mindestens drei antigenen Domänen gefaltet ist und daß die meisten dieser Domänen diskontinuierlich und konformationsspezifisch sind (3,4).
- Diese Mabs wurden daher in der Immunfluoreszenzbestimmung als Mittel verwendet, um zu testen, ob die durch Transfektion erzeugten rekombinanten Virus-Proteine richtig gefaltet und verarbeitet waren.

Mit SV-PEwt, SV-Ewt, SV-PEst und SV-Est transfektierte COS-Zellen wurden in Methanol-Aceton fixiert und mit jedem der 19 Mabs auf ihre Reaktivität getestet. Wie in Tabelle 6 gezeigt, ergaben die transfektierten Zellen alle Reaktivitätsmuster, die jenen der infizierten Zellen sehr ähnlich waren, was andeutete, daß die im vorübergehenden Expressionssystem erzeugten E-Proteine strukturell nativem, intrazellulärem E-ähnlich waren.

Tabelle 6. Antigenreaktivität von intrazellulärem E-Protein in Plasmid-transfektierten und mit TBE-Virus infizierten COS-Zellen mit E-spezifischen monoklonalen Antikörpern

MAB	SV-PEwt	SV-Ewt	SV-PEst	SV-Est	infiziert
A1	+/-	-	-	-	+/-
A2	+/-	-	-	-	+/-
A3	-	-	-	-	+/-
A4	-	-	-	-	-
A5	+	+	+/-	-	+
B1	+	+	+	+	+
B2	+	+	+	+	+
B3	+	+	+	+	+
B4	+	+	+	+	+
B5	+	+	+	+	+/-
C1	-	-	-	-	+
C2	-	-	-	+	+
C3	+	-	-	+	+
C4	+	-	-	+	+
C5	+	-	-	+	-
C6	-	-	-	-	-
i1	-	-	-	+	+
i2	+/-	-	-	-	-
i3	+	-	+/-	+	+/-

+ starke Fluoreszenz

+/- schwache Fluoreszenz

- keine Fluoreszenz

- Mabs aus den Antigen-Domänen B (B1-B5) und C (C1-C6) ergaben im allgemeinen eine starke Fluoreszenz, wogegen die Epitope der Domäne A, A1-A4, sowohl in transfektierten als auch in infizierten Zellen relativ unreaktiv waren. Dies läßt vermuten, daß diese Epitope entweder in der intrazellulären Form von E nicht exponiert waren oder durch den Fixierungsvorgang zerstört wurden. Interessanterweise ergab Mab A5 eine starke Fluoreszenz in mit SV-PEwt und SV-Ewt, jedoch nicht mit SV-PEst und SV-Est transfektierten Zellen. Dies läßt darauf schließen, daß die C-terminale Domäne von E bei der Stabilisierung des A5-Epitops irgendwie eine Rolle spielen könnte. Die Bedeutung anderer feiner Unterschiede in der Reaktivität einiger der Mabs (z.B. A1, A2, i2, B5) muß noch mittels einer quantitativeren Technik ausgewertet werden.

Diskussion

- Zum Verständnis der molekularen Wechselwirkungen, die beim Viruszusammenbau, der Antigenstruktur und den funktionellen Aktivitäten, wie der Rezeptorerkennung und der Membranfusion, eine Rolle spielen, ist es von großem praktischem Wert, ein Versuchssystem zur Verfügung zu haben, bei welchem zufällige

oder stellengerichtete Mutationen in die Strukturproteine eingeführt werden können und die Auswirkungen dieser Änderungen leicht beurteilt werden können. Wir haben nun ein solches System für den TBE-Virus erstellt.

Zu diesem Zweck erzeugten wir eine Population von zufällig mutierten TBE-Virus-prM- und E-Genen durch Zunutzemachen der natürlichen Fehlerhäufigkeit der Taq-Polymerase in der PCR. Die PCR-Produkte wurden direkt in Plasmid-Expressionsvektoren, die eukaryontische Transkriptions- und Replikations-Steuer-elemente enthielten, inseriert, und eine Anzahl von einzelnen Klonen wurde isoliert, um eine Plasmid-Minibank zu schaffen. Die Häufigkeit von Mutationen in diesen Klonen war zur Herstellung einer begrenzten Anzahl zufälliger Aminosäureänderungen in den codierten Proteinen geeignet. Wenn die Plasmide durch Transfektion in die COS-Zellen eingeführt wurden, wurden die Virus-Proteine in für die biochemische Analyse geeigneten Mengen synthetisiert. Außerdem zeigte sich, daß in diesen Zellen synthetisiertes E-Protein strukturell mit natürlichem E-Protein in infizierten Zellen fast identisch war. So wurde ein gutes Modellsystem zur Untersuchung der Auswirkungen einzelner Änderungen in den prM- und E-Proteinen und zur Kartierung struktureller und funktioneller Domänen innerhalb dieser Proteine erstellt.

Die Verwendung eukaryontischer Expressionssysteme für die Entwicklung neuer rekombinanter Vakzine gegen Flavivirus-Erkrankungen war in den jüngsten Jahren sehr vielversprechend (34). Außerdem begannen auch Untersuchungen, bei welchen die Expression klonierter Flavivirus-Gene involviert war, neue Informationen über die Verarbeitung und den Aufbau der Flavivirus-Strukturproteine zu liefern. Es zeigte sich, daß die Coexpression von prM- und E-Genen aus japanischem Encephalitis-Virus (35-39), Gelbfiebervirus (40) und Westnile-Virus (41) zum Transport und zur Sekretion leerer Virushüllpartikel, die reife E- und M-Proteine enthalten, führt. Extrazelluläre Partikel wurden jedoch nicht effizient erzeugt, wenn E ohne prM exprimiert war (35,38), oder wenn die Membranprotein-gene mit dem Capsidprotein im selben Polyprotein in Abwesenheit der Virusprotease NS3 co-exprimiert wurden (35,36,39,41). Die Virusprotease, die eine Vorläuferform des Capsidproteins spaltet, schien zur effizienten Verarbeitung des Polyproteins an der C-prM-Verbindungsstelle durch die Wirts-Signalase notwendig zu sein, wenn das gesamte C-Gen vorhanden war (39,41). Wenn jedoch Konstrukte ohne den Cytoplasmateil von C verwendet wurden, fand die Spaltung der prM-Signalsequenz in normaler Weise statt und wurden extrazelluläre Partikel erzeugt, selbst wenn NS3 fehlte. Diese Resultate deuten auf einen möglichen Mechanismus zur Koordination des Viruszusammenbaus aufgrund einer Regulierung der Polyproteinverarbeitung hin (41).

Konishi und Mason (38) berichteten kürzlich, daß die Co-Synthese der prM- und E-Proteine des Japanischen Encephalitis-Virus zur richtigen Faltung und Reifung des E-Proteins notwendig ist. Diese Autoren zeigten, daß die Expression von E aus Vaccinia-Rekombinanten in Abwesenheit von prM zu nicht richtig gefalteten Proteinen führten, die unfähig waren, in Virionen eingebaut zu werden, wogegen prM- und E-Konstrukte richtig verarbeitet wurden. In der vorliegenden Untersuchung, bei welcher monoklonale Antikörper verwendet wurden, beobachteten wir nur geringe Unterschiede zwischen E-Proteinen, die in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von prM exprimiert wurden. Zur Festlegung der genauen Rolle von prM bei der Verarbeitung von E sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

Wir verwendeten die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Verfahren für sowohl das Klonieren als auch die Mutagenese von TBE-Virus-prM- und E-Proteinen. Die PCR ist eine wertvolle Technik für das Klonieren sehr spezifischer Bereiche eines Genoms, da sie durch sorgfältige Auswahl synthetischer Oligonucleotid-Primer die Spezifizierung der genauen Grenzen des amplifizierten Bereichs ermöglicht. Sie ermöglicht auch geeignete spezifische Änderungen, wie die Einführung von Start- oder Stop-Codons, Steuerelementen oder Restriktionsstellen an den Enden klonierter Inserts, indem man sie in die Primer einbaut. Ein potentieller Nachteil der PCR ist jedoch, daß die routinemäßig in PCR-Anwendungen verwendete Taq-Polymerase fehleranfällig ist und dazu neigt, gelegentlich ein falsches Nucleotid einzubauen, was zu Punktmutationen und manchmal zu Rahmenverschiebungen führt. Während diese Eigenschaft ein Nachteil ist, wenn man will, daß die klonierte DNA eine exakte Kopie des ursprünglichen Gens ist, sind PCR-Standard- oder modifizierte Reaktionen auch zur absichtlichen Erzeugung von Plasmid-Klonenbanken, die Zufallsmutationen enthalten, geeignet.

Leung et al. (42) und Cadwell und Joyce (31) veröffentlichten kürzlich Verfahren zur Zufallsmutagenese durch PCR unter Bedingungen, die die Taq-Polymerase-Genauigkeit weiter verringern. Zu diesen zählen die Steigerung der MgCl₂-Konzentration, die Steigerung und Ungleichgewichtung der dNTP-Konzentrationen und das Inkludieren von MnCl₂ in der Reaktion. Zum Zweck der vorliegenden Untersuchung waren solche Modifikationen nicht notwendig, und die natürliche Mutationshäufigkeit unter im wesentlichen Standardbedingungen war zur Erzeugung einer begrenzten Anzahl von Mutationen enthaltenden Klonenbank passend. Tatsächlich erhielten wir für ein 496 Aminosäuren langes TBE-Virus-E-Protein im Durchschnitt ein bis zwei Aminosäureänderungen pro Klon, was eine ideale Rate für die Identifizierung wichtiger einzelner Aminosäurereste ist. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Zhao et al. (43) berichtet, die zur

Einführung von Zufallsmutationen in das 633 Nucleotide lange *crp*-Gen von *E. coli* Standard-PCR-Bedingungen verwendeten.

Wir beobachteten in unseren PCR-Klonen eine starke Mutationsbereitschaft zugunsten von G/C→A/T und A/T→G/C-Übergängen. Es wurde bereits gezeigt, daß dieses Phänomen T:G-Mißpaarungen während 5 der Amplifikation zuzuschreiben ist (15). Kürzlich wurde von Cadwell und Joyce berichtet (31), daß diese natürliche Bereitschaft durch Einstellung der relativen Konzentrationen der dNTPs in der Reaktion eliminiert werden könnte. Diese Modifikation wäre potentiell nützlich, weil sie zu einer zufälligeren Verteilung von Mutationen führen würde und die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung wichtiger Stellen dadurch zunehmen würde.

10 Die hier präsentierte Arbeit zeigte die potentielle Bedeutung der Verwendung einer PCR-Klonierung und Mutagenese zusammen mit einem eukaryontischen Expressionssystem für die Erkundung der Struktur von Virusmembranproteinen. Wir versuchen derzeit, eine Technik zum phenotypischen Screenen von Mutanten und funktionelle Untersuchungen zu entwickeln, die die Vielfältigkeit dieses Verfahrens weiter erhöhen.

Im Anhang zitierte Literaturstellen:

- 15 1. Kunz C., Acta Leidensia, **60**, 1-14, 1992
2. Heinz F.X. und Roehrig J.T. in van Regenmortel M.H.V. und Neurath A.R. (Hrsgb.) *Immunochemistry of Viruses. II. The Basis for Seradiagnosis and Vaccines*. Elsevier Science, Amsterdam, 1990, S. 289-305.
3. Mandl C.W., Guirakhoo F., Holzmann H., Heinz F.X. und Kunz C., J Virol **63**, 564-571, 1989.
4. Guirakhoo F., Heinz F.X. und Kunz C., Virology **169**, 90-99, 1989.
5. Holzmann H., Mandl C.W., Guirakhoo F., Heinz F.X. und Kunz C., J Gen Virol **70**, 219-222, 1989.
6. Holzmann H., Heinz F.X., Mandl C.W., Guirakhoo F. und Kunz C., J Virol **64**, 5156-5159, 1990.
7. Wengler G. und Wengler G., J Virol **63**, 2521-2526, 1989.
8. Heinz F.X., Auer G., Stiasny K., Holzmann H., Mandl C., Guirakhoo F. und Kunz C. in Brinton M. (Hrsgb.) *Proceedings of the Third International Positive Strand RNA Virus Meeting, Clearwater, FL, 1992*. Arch Virol. Suppl. im Druck, 1993.
9. Randolph V.B., Winkler G. und Stollar V., Virology **174**, 450-458, 1990.
10. Heinz F.X. und Kunz C., J Gen Virol **46**, 301-309, 1980.
11. Guirakhoo F., Heinz F.X., Mandl C.W., Holzmann H. und Kunz C., J Gen Virol **72**, 1323-1329, 1991.
12. Guirakhoo F., Bolin R.A. und Roehrig J.T., Virology **191**, 921-931, 1992.
13. Chambers T.J., Hahn C.S., Galler R. und Rice C.M., Annu Rev Microbiol **44**, 649-688, 1990.
14. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. und Erlich H.A., Science **239**, 487-491, 1988.
15. Tindall K.R. und Kunkel T.A., Biochemistry **27**, 6008-6013, 1988.
16. Heinz F.X. und Kunz C., J Gen Virol **57**, 263-274, 1981.
17. Mandl C.W., Heinz F.X. und Kunz C., Virology **166**, 197-205, 1988.
18. Gubler U. und Hoffmann B.J., Gene **25**, 263-269, 1983.
19. Mandl C.W., Heinz F.X., Stöckl E. und Kunz C., Virology **173**, 291-301, 1989.
20. Kozak M., Cell **44**, 283-292, 1986.
21. Kozak M., J Mol Biol **196**, 947-950, 1987.
22. Maniatis T., Fritsch E.F. und Sambrook J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
23. MacGregor G.R. und Caskey C.T., Nucleic Acids Res **17**, 2365, 1989.
24. Gluzman Y., Cell **23**, 175-182, 1981.
25. Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M. Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M. und Daniels M., Proc Natl Acad Sci USA **84**, 7413-7417, 1987.
26. Heinz F.X. und Kunz C., J Gen Virol **49**, 125-132, 1980.
27. Heinz F.X., Berger R., Tuma W. und Kunz C., Virology **126**, 525-537, 1983.
28. Heinz F.X., Tuma W., Guirakhoo F. und Kunz C., J Biol Stand **14**, 133-141, 1986.
29. Dunning A.M., Talmud P. und Humphries S.E., Nucleic Acids Res **16**, 10393, 1988.
30. Chen J., Sahota A., Sambrook P.J. und Tischfield J.A., Mutat Res **249**, 169-176, 1991.
31. Cadwell R.C. und Joyce G.F., PCR Methods Applic **2**, 28-33, 1992.
32. Eckert K.A. und Kunkel T.A., PCR Methods Applic **1**, 17-24, 1991.
33. Nowak T. und Wengler G., Virology **156**, 127-137, 1987.
34. Brandt W.E., J Infect Dis **162**, 577-583, 1990.
35. Mason P.W., Pincus S., Fournier M.J., Mason T.L., Shope R.E. und Paoletti E., Virology **180**, 294-305, 1991.

36. Konishi E., Pincus S., Fonseca B.A.L., Shope R.E., Paoletti E. und Mason P.W., Virology 185, 401-410, 1991.
37. Konishi E. Pincus S., Paoletti E., Shope R.E., Burrage T. und Mason P.W., Virology 188, 714-720, 1992.
- 5 38. Konishi E. und Mason P.W., J Virol 67, 1672-1675, 1993.
39. Sato T., Takamura C., Yasuda A., Miyamoto M., Kamogawa K. und Yasui K., Virology 192, 483-490, 1993.
40. Pincus S., Mason P.W., Konishi E., Fonseca B.A.L., Shope R.E., Rice C.M. und Paoletti E., Virology 187, 290-297, 1992.
- 10 41. Yamshchikov V.F. und Compans R.W., Virology 192, 38-51, 1993.
42. Leung D.W., Chen E. und Goeddel D.V., Technique 1, 11-15, 1989.
43. Zhou Y., Zhang X. und Ebright R.H., Nucleic Acids Res 19, 6052, 1991.

Patentansprüche

- 15 1. Vakzine zur Immunisierung gegen Tick-Borne-Enzephalitis-Virus (TBE-Virus)-Infektionen, umfassend nicht-infektiöse, subvirale Partikel, welche im wesentlichen das rekombinante Protein E in seiner vollständigen, nativen Form und gegebenenfalls das rekombinante Protein prM/M enthalten, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind.
- 20 2. Vakzine nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das rekombinante Protein E aus dem europäischen oder fernöstlichen Subtyp des TBE-Virus abgeleitet ist.
- 25 3. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nicht-infektiösen Partikel weiters eine Lipidkomponente umfassen, welche vorzugsweise in vesikulärer Form vorliegt.
- 30 4. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nicht-infektiösen Partikel im wesentlichen frei von mittels PCR detektierbaren, von TBE-Viren abgeleiteten Nukleinsäuren sind.
- 35 5. Verfahren zur Herstellung eines TBE-Vakzins, **dadurch gekennzeichnet**, daß
- ein Zellkultursystem zur Verfügung gestellt wird, das die Kodierungssequenzen für die Proteine prM und E, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind, enthält,
 - das Protein E in seiner vollständigen, nativen Form exprimiert wird, wobei
 - subvirale, nicht-infektiöse Partikel gebildet werden, welche im wesentlichen das rekombinante Protein E in seiner vollständigen, nativen Form und gegebenenfalls das rekombinante Protein prM/M enthalten und
 - die Partikel gesammelt sowie direkt in eine zur Immunisierung geeignete Zusammensetzung aufgearbeitet werden.
- 40 6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Zellkultursystem zur Verfügung gestellt wird, welches die Kodierungssequenzen für die Proteine prM und E, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind, in chromosomal integrierter Form enthält.
- 45 7. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Zellkultursystem virale Vektoren zur Anwendung kommen.
8. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Zellkultursystem virusfrei gearbeitet wird.
- 50 9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Plasmidvektor zur Anwendung kommt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Expression der Proteine und die Bildung der Partikel kontinuierlich erfolgt.
- 55 11. Verwendung von nicht-infektiösen, subviralen Partikeln enthaltend im wesentlichen das rekombinante Protein E in seiner vollständigen, nativen Form und gegebenenfalls das rekombinante Protein prM/M, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind, zur Herstellung eines Vakzins zur aktiven

AT 402 897 B

Immunisierung gegen TBE-Virus-Infektionen.

12. Verwendung von nicht-infektiösen, subviralen Partikeln enthaltend im wesentlichen das rekombinante Protein E in seiner vollständigen, nativen Form und gegebenenfalls das rekombinante Protein prM/M, welche Proteine aus dem TBE-Virus abgeleitet sind, zur Herstellung von Anti-TBE-Virus-Immunglobulin-Präparationen.

Hiezu 17 Blatt Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

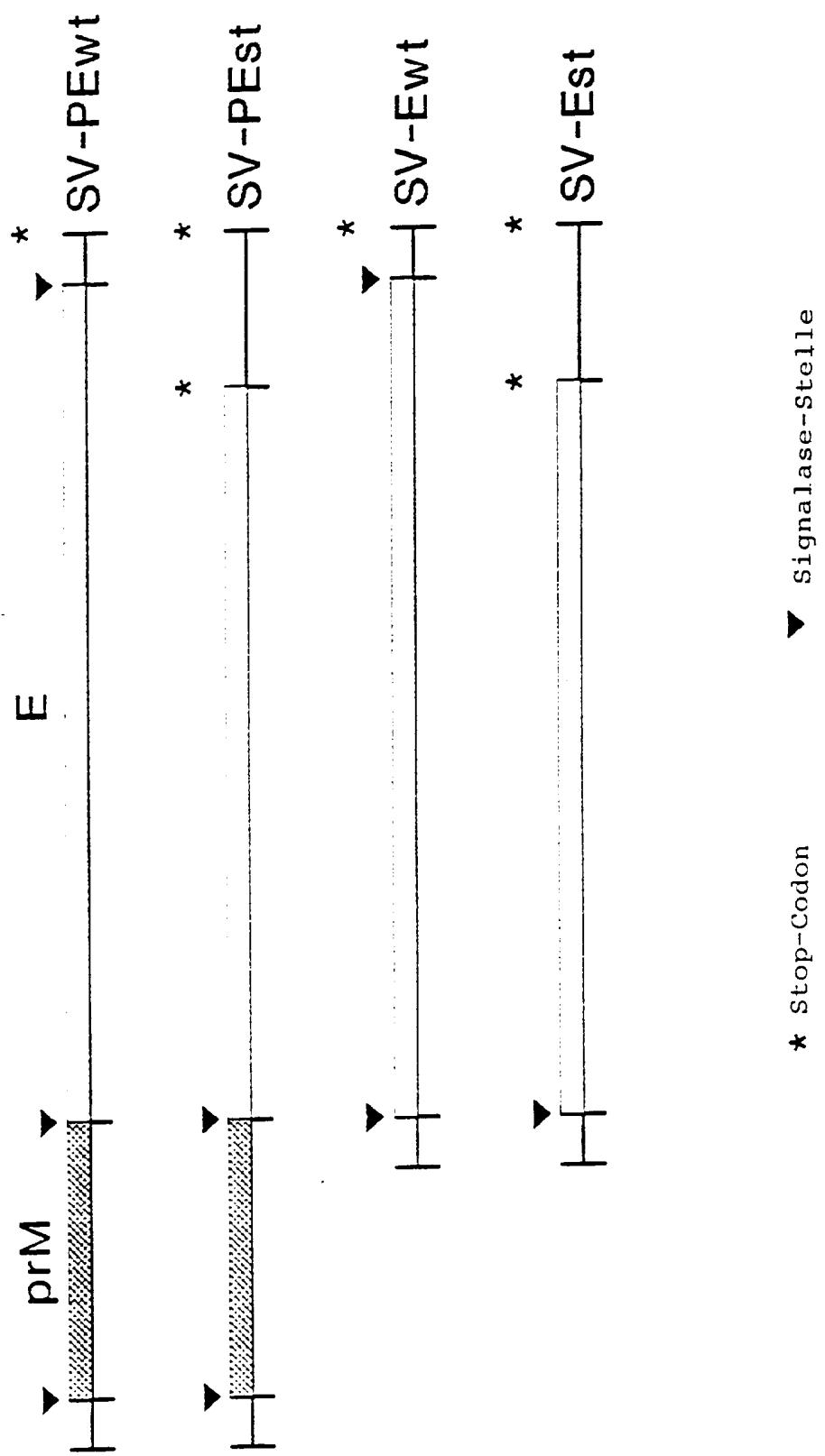


Fig. 1

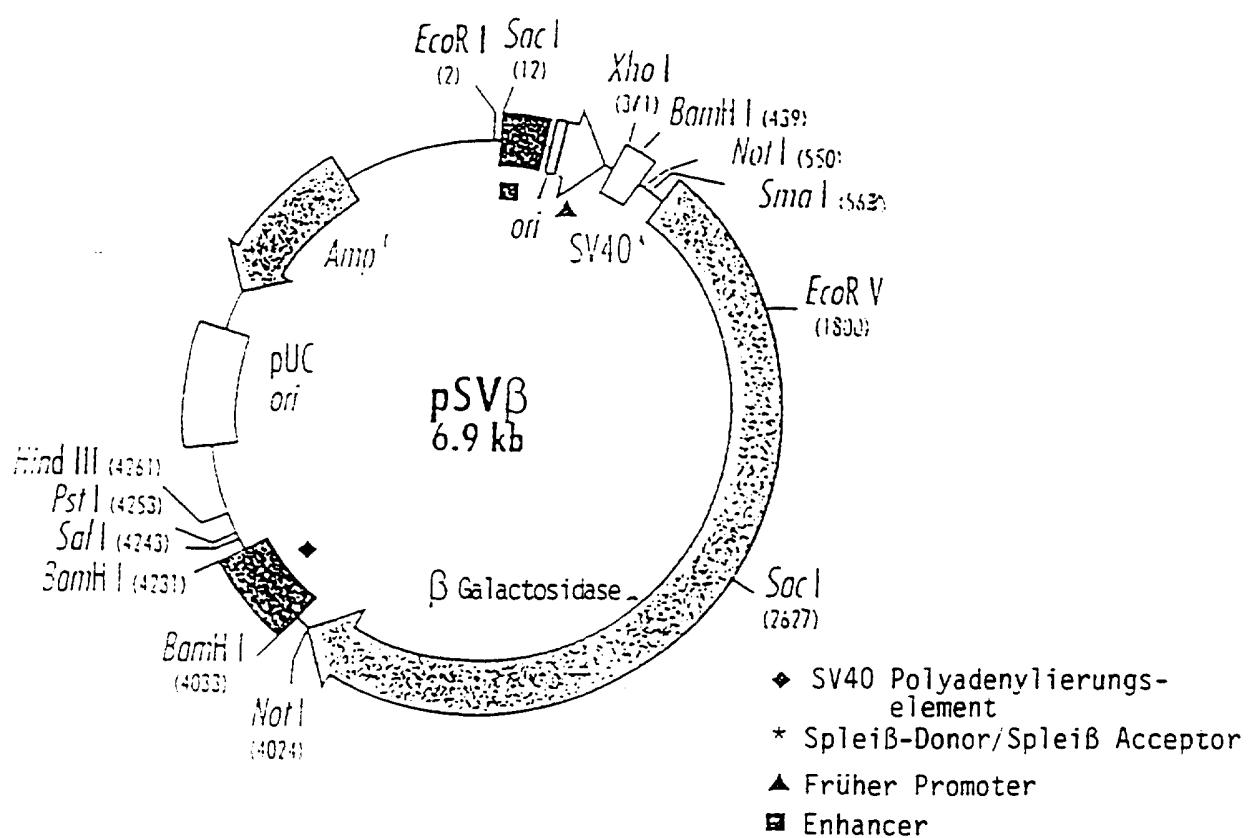


Fig. 2

Fig. 3a

ATG GTT GGC TTG CAA AAA CGT GGG AAA AGG AGG TCA GCG ACG GAC	432
MET Val Gly Leu Gln Lys Arg Gly Lys Arg Arg Ser Ala Thr Asp	C10C
433 TGG ATG AGC TGG TTG CTG GTC ATC ACT CTG TTG GGG ATG ACG CTT GCT	480
C101 Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Ile Thr Leu Leu Gly Met Thr Leu Ala	C116
—>prM	
481 GCA ACG GTG AGG AAA GAA AGG GAT GGC TCA ACT GTG ATC AGA GCT GAA	528
p1 Ala Thr Val Arg Lys Glu Arg Asp Gly Ser Thr Val Ile Arg Ala Glu	p16
529 GGA AAG GAT GCA GCA ACT CAG GTG CGT GTG GAG AAT GGC ACC TGT GTG	576
p17 Gly Lys Asp Ala Ala Thr Gln Val Arg Val Glu Asn_Gly_Thr Cys Val	p32
577 ATC CTG GCT ACT GAC ATG GGG TCA TGG TGT GAT GAT TCA CTG TCC TAT	624
p33 Ile Leu Ala Thr Asp Met Gly Ser Trp Cys Asp Asp Ser Leu Ser Tyr	p48
625 GAG TGT GTG ACC ATA GAT CAA GGA GAA GAG CCT GTT GAC GTG GAT TGT	672
p49 Glu Cys Val Thr Ile Asp Gln Gly Glu Pro Val Asp Val Asp Cys	p64
673 TTT TGC CGG AAC GTT GAT GGA GTC TAT CTG GAG TAC GGA CGC TGT GGG	720
p65 Phe Cys Arg Asn Val Asp Gly Val Tyr Leu Glu Tyr Gly Arg Cys Gly	p80
—>M	
721 AAA CAG GAA GGC TCA CGG ACA AGG CGC TCA GTG CTG ATC CCA TCC CAT	768
p81 Lys Gln Glu Gly Ser Arg Thr Arg Ser Val Leu Ile Pro Ser His	p96
769 GCT CAG GGA GAG CTG ACG GGA AGG GGA CAC AAA TGG CTA GAA GGA GAC	816
p97 Ala Gln Gly Glu Leu Thr Gly Arg His Lys Trp Leu Glu Gly Asp	p112
817 TCG CTG CGA ACA CAC CTT ACT AGA GTT GAG GGA TGG GTC TGG AAG AAC	864
p113 Ser Leu Arg Thr His Leu Thr Arg Val Glu Gly Trp Val Trp Lys Asn	p128
865 AAG CTA CTT GCC TTG GCA ATG GTT ACC GTT GTG TGG ACC CTG GAG	912
p129 Lys Leu Leu Ala Ala Met Val Thr Val Val Trp Leu Thr Leu Glu	p144
913 AGT GTG GTG ACC AGG GTC GCC GTT CTT GTT GTG CTC CTG TGT TTG GCA	960
p145 Ser Val Val Thr Arg Val Ala Val Val Val Leu Leu Cys Leu Ala	p160
—>E	
961 CGG GTT TAC GCT TCG CGT TGC ACA CAC TTG GAA AAC AGG GAC TTT GTG	1008
p161 Pro Val Tyr Ala Ser Arg Cys Thr His Leu Glu Asn Arg Asp Phe Val	E12
1009 ACT GGT ACT CAG GGG ACT ACG AGG GTC ACC TTG GTG CTG GAA CTG GGT	1056
E13 Thr Gly Thr Gln Gly Thr Thr Arg Val Thr Leu Val Leu Glu Leu Gly	E28
1057 GGA TGT GTT ACT ATA ACA GCT GAG GGG AAG CCT TCA ATG GAT GTG TGG	1104
E29 Gly Cys Val Thr Ile Thr Ala Glu Gly Lys Pro Ser Met Asp Val Trp	E44
1105 CCT GAC GCC ATT TAC CAG GAG AAC CCT GCT AAG ACA CGT GAG TAC TGT	1150
E45 Leu Asp Ala Ile Tyr Gln Glu Asn Pro Ala Lys Thr Arg Glu Tyr Cys	E60
1153 TTA CAC GCC AAG TTG TCG GAC ACT AAG GTT GCA GCC AGA TGC CCA ACA	1200
E61 Leu His Ala Lys Leu Ser Asp Thr Lys Val Ala Ala Arg Cys Pro Thr	E76
1201 ATG GGA CCA GCC ACT TTG GCT GAA GAA CAC CAG GGT GGT ACA GTG TGT	1248
E77 Met Gly Pro Ala Thr Leu Ala Glu Glu His Gln Gly Thr Val Cys	E92
1249 AAG AGA GAT CAG AGT GAT CGA GGC TGG GGC AAC CAC TGT GGA CTG TTT	1296
E93 Lys Arg Asp Gln Ser Asp Arg Gly Trp Gly Asn His Cys Gly Leu Phe	E108

(Fortsetzung in Fig. 3b)

Fig. 3t

1297 GGA AAG GGT AGC ATT GTG GCC TGT GTC AAG GCG GCT TGT GAG GCA AAA 1344
E109 Gly Lys Gly Ser Ile Val Ala Cys Val Lys Ala Ala Cys Glu Ala Lys E124
1345 AAG AAA GCC ACA GGA CAT GTG TAC GAC GCC AAC AAA ATA GTG TAC ACG 1392
E125 Lys Lys Ala Thr Gly His Val Tyr Asp Ala Asn Lys Ile Val Tyr Thr E140
1393 GTC AAA GTC GAA CCA CAC ACG GGA GAC TAT GTT GCC GCA AAC GAG ACA 1440
E141 Val Lys Val Glu Pro His Thr Gly Asp Tyr Val Ala Ala Asn_Glu_Thr E156
1441 CAT AGT GGG AGG AAG ACG GCA TCC TTC ACA ATT TCT TCA GAG AAA ACC 1488
E157 His Ser Gly Arg Lys Thr Ala Ser Phe Thr Ile Ser Ser Glu Lys Thr E172
1489 ATT TTG ACT ATG GGT GAG TAT GGA GAT GTG TCT TTG TTG TGC AGG GTC 1536
E173 Ile Leu Thr Met Gly Glu Tyr Gly Asp Val Ser Leu Leu Cys Arg Val E188
1537 GCT AGT GGC GTT GAC TTG GCC CAG ACC GTC ATC CTT GAG CTT GAC AAG 1584
E189 Ala Ser Gly Val Asp Leu Ala Gln Thr Val Ile Leu Glu Leu Asp Lys E204
1585 ACA GTG GAA CAC CTT CCA ACG GCT TGG CAG GTC CAT AGG GAC TGG TTC 1632
E205 Thr Val Glu His Leu Pro Thr Ala Trp Gln Val His Arg Asp Trp Phe E220
1633 AAT GAT CTG GCT CTG CCA TGG AAA CAT GAG GGA GCG CAA AAC TGG AAC 1680
E221 Asn Asp Leu Ala Leu Pro Trp Lys His Glu Gly Ala Gln Asn Trp Asn E236
1681 AAC GCA GAA AGA CTG GTT GAA TTT GGG GCT CCT CAC GCT GTC AAG ATG 1726
E237 Asn Ala Glu Arg Leu Val Glu Phe Gly Ala Pro His Ala Val Lys Met E252
1729 GAC GTG TAC AAC CTC GGA GAC CAG ACT GGA GTG TTA CTG AAG GCT CTC 1776
E253 Asp Val Tyr Asn Leu Gly Asp Gln Thr Gly Val Leu Leu Lys Ala Leu E268
1777 GCT GGG CTT CCT GTG GCA CAC ATT GAG GGA ACC AAG TAC CAC CTG AAG 1824
E269 Ala Gly Val Pro Val Ala His Ile Glu Gly Thr Lys Tyr His Leu Lys E284
1825 AGT GGC CAC GTG ACC TGC GAA GTG GGA CTG GAA AAA CTG AAG ATG AAA 1872
E285 Ser Gly His Val Thr Cys Glu Val Gly Leu Glu Lys Leu Lys Met Lys E300
1873 AGT CTT ACG TAC ACA ATG TGT GAC AAA ACA AAG TTC ACA TGG AAG AGA 1920
E301 Gly Leu Thr Tyr Thr Met Cys Asp Lys Thr Phe Thr Trp Lys Arg E316
1921 GCT CCA ACA GAC AGT GGG CTT GAT ACA GTG GTC ATG GAA GTC ACA TTC 1968
E317 Ala Pro Thr Asp Ser Gly His Asp Thr Val Val Met Glu Val Thr Phe E331
1969 TCT GGA ACA AAG CCC TGT AGG ATC CCA GTC AGG GCA GTG GCA CAT GGA 2016
E333 Ser Gly Thr Lys Pro Cys Arg Ile Pro Val Arg Ala Val Ala His Gly E348
2017 TCT CCA GAT GTG AAC GTG GCC ATG CTG ATA ACG CCA AAC CCA ACA ATT 2064
E349 Ser Pro Asp Val Asn Val Ala Met Leu Ile Thr Pro Asn Pro Thr Ile E364
2065 GAA AAC AAT GGA GGT GGC TTC ATA GAG ATG CAG CTG CCC CCA GGG GAT 2112
E365 Glu Asn Asn Gly Gly Phe Ile Glu Met Gln Leu Pro Pro Gly Asp E380
2113 AAC ATC ATC TAT GTT GGG GAA CTG AGT CAA TGG TTC CAA AAA GGG 2160
E381 Asn Ile Ile Tyr Val Gly Glu Leu Ser His Gln Trp Phe Gln Lys Gly E396
2161 AGC AGC ATC GGA AGG GTT TTC CAA AAG ACC AAG AAA GGC ATA GAA AGA 2208
E397 Ser Ser Ile Gly Arg Val Phe Gln Lys Thr Lys Lys Gly Ile Glu Arg E412

(Fortsetzung in Fig. 3c)

0209 CTG ACA GTG ATA GGA GAG CAC GCC TGG GAC TTC GGT TCT CCT GGA GGC 2256
E413 Leu Thr Val Ile Gly Glu His Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ala Gly E428

0257 TTT CTG AGT TCA ATT GGG AAG GCG GTA CAT ACG GTC CTT GGT GGC GCT 2304
E429 Phe Leu Ser Ser Ile Gly Lys Ala Val His Thr Val Leu Gly Gly Ala E444

0305 TTC AAC AGC ATC TTC GGG GGA GTG GGG TTT CTA CCA AAA CTT TTA TTA 2352
E445 Phe Asn Ser Ile Phe Gly Gly Val Gly Phe Leu Pro Lys Leu Leu E460

0353 GGA GTG GCA TTG GCT TGG TTG GGC CTG AAC ATG AGA AAC CCT ACA ATG 2400
E461 Gly Val Ala Leu Ala Trp Leu Gly Leu Asn Met Arg Asn Pro Thr Met E476

0401 FCC ATG AGC TTT CTC TTG GCT GGA GGT CTG GTC TTG GCC ATG ACC ACC CTT 2448
E477 Ser Met Ser Phe Leu Leu Ala Gly Gly Leu Val Leu Ala Met Thr Leu E492
—>NS1

0449 GGA GTG GGG GCG|GAT GTT GGT TGC GCT GTG GAC ACG GAA CGA ATG GAG 2496
E493 Gly Val Gly Ala Asp Val Gly Cys Ala Val Asp Thr Glu Arg Met Glu N12

0497 CTC CGC TGT GGC GAG GGC CTG GTC GTG TGG AGA GAG GTC TCA GAA TGG 2544
N13 Leu Arg Cys Gly Glu Gly Leu Val Val Trp Arg Glu Val Ser Glu Trp N28

0545 TAT GAC TAG CGGCCGCGGGATCC
N29 Tyr Asp *

Fig.3c

Immunopräzipitation
von mit Triton X-100-solubilisierten Zell-Lysaten

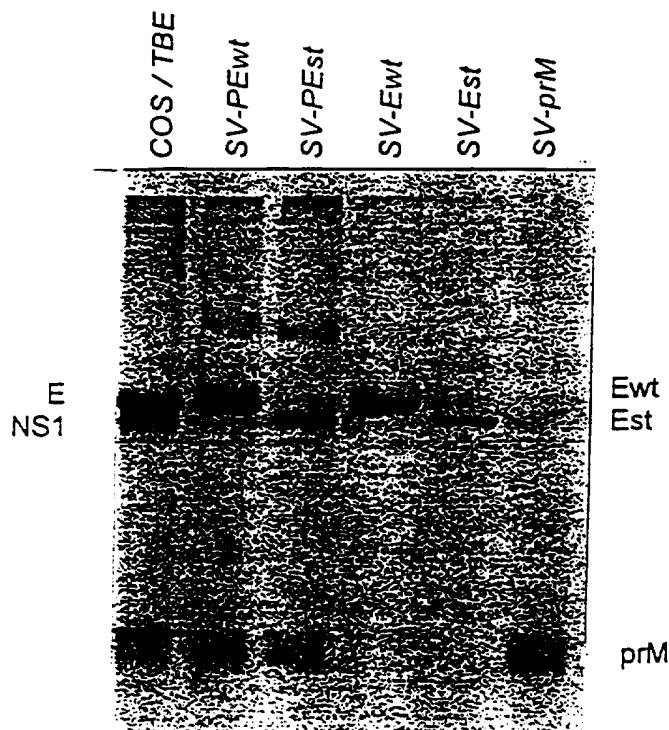


Fig.4

SEKRETION VON E-PROTEIN DURCH TRANSFEKTIERTE
COS-ZELLEN

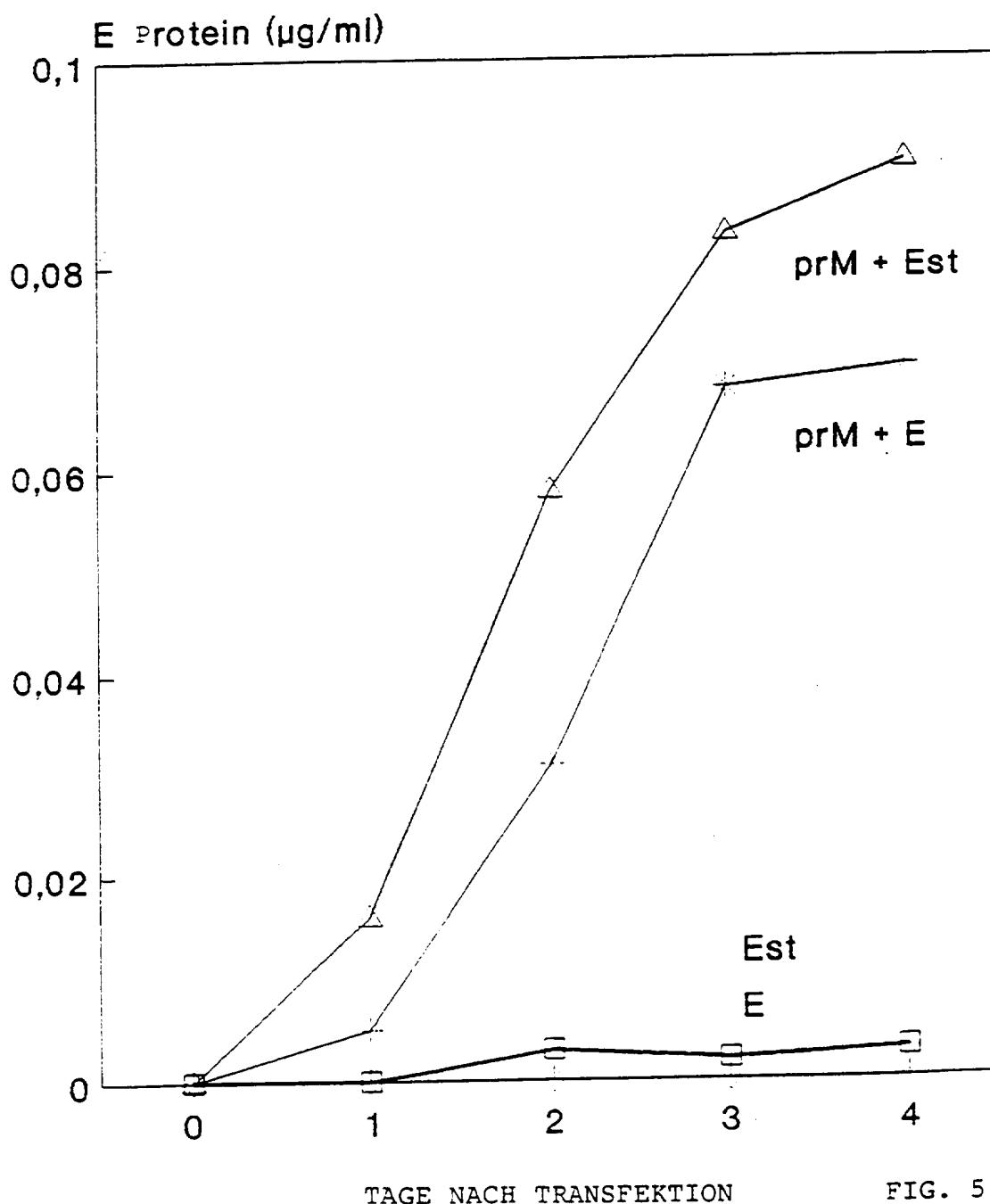


FIG. 5

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Ausgegeben 25. 9. 1997
Blatt 8

Patentschrift Nr. AT 402 897 B
Int. Cl.: A61K 39/12

IMMUNOPRÄZIPITATION VON ABGESCHIEDENEN TBE-VIRUS-PROTEINEN
AUS ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN

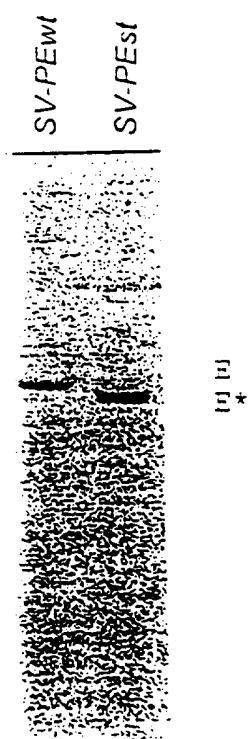


FIG. 6

SEDIMENTATIONSANALYSE VON EXTRAZELLULÄREM
E-PROTEIN

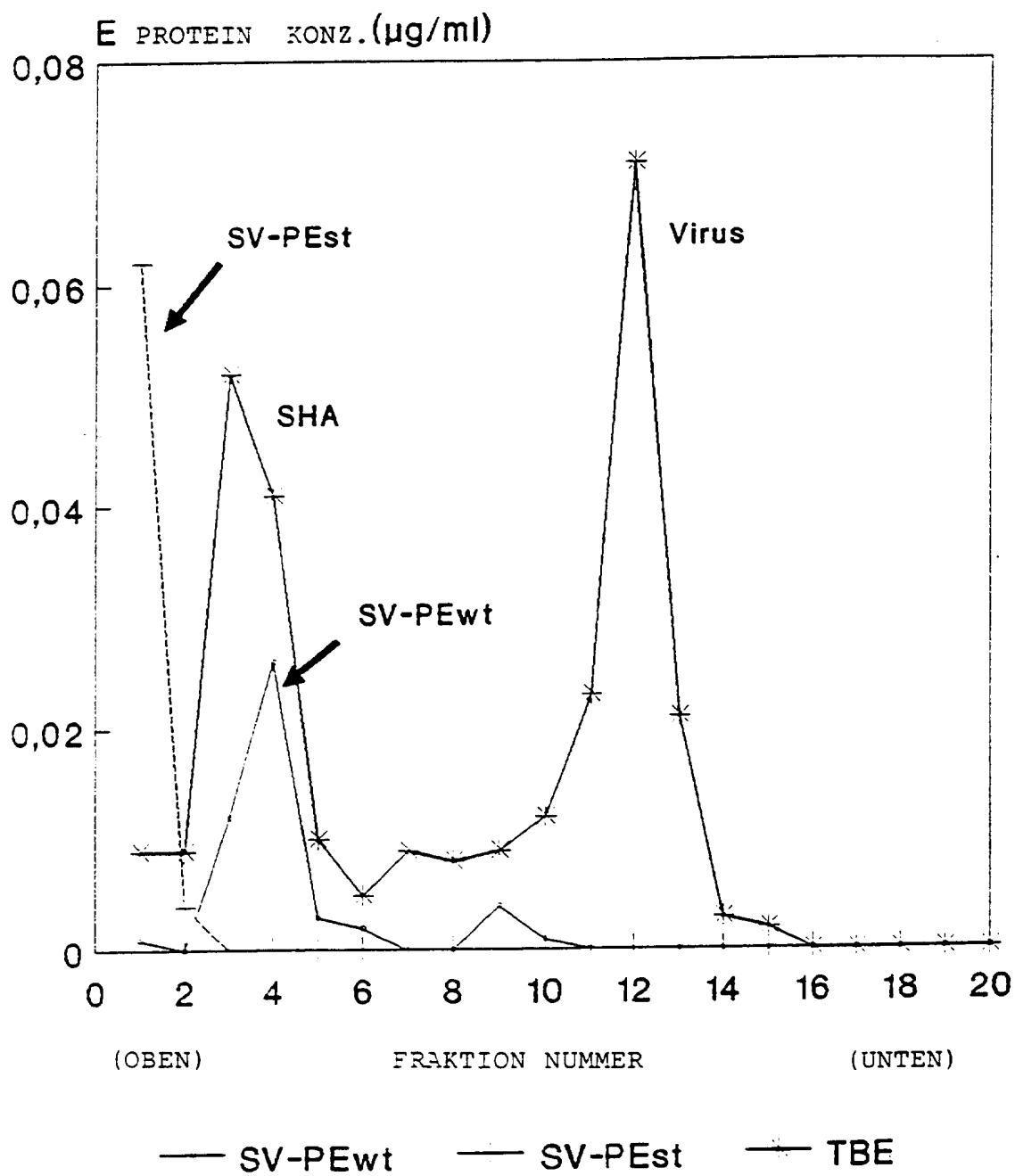


FIG. 7

SEDIMENTATIONSANALYSE VON EXTRAZELLULÄREM E-PROTEIN

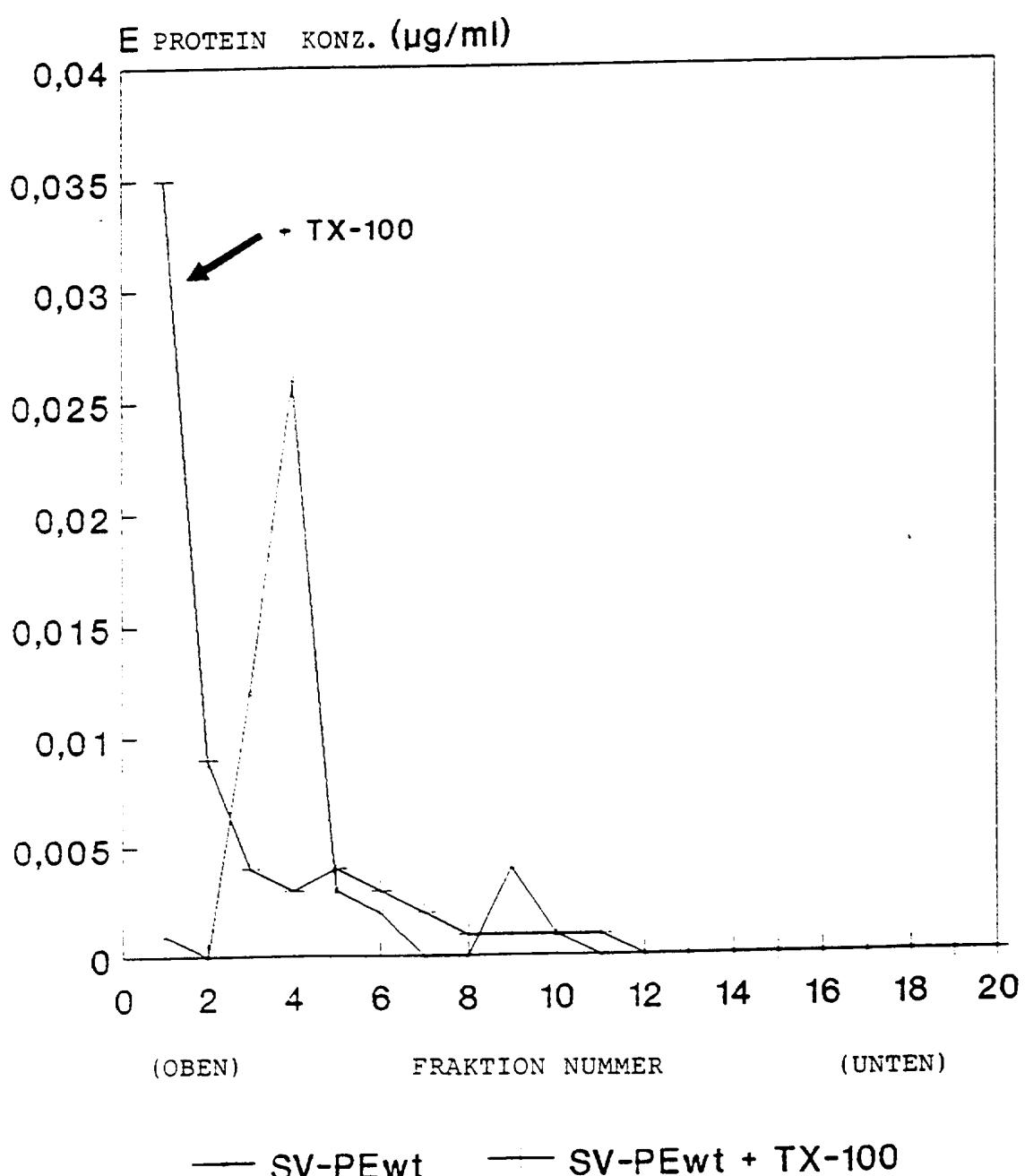


FIG. 8

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Ausgegeben 25. 9. 1997
Blatt 11

Patentschrift Nr. AT 402 897 B
Int. Cl. : A61K 39/12

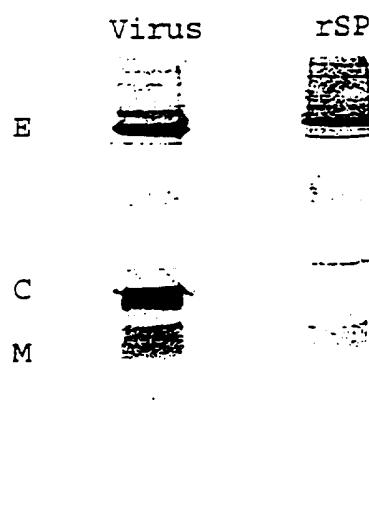


FIG. 9

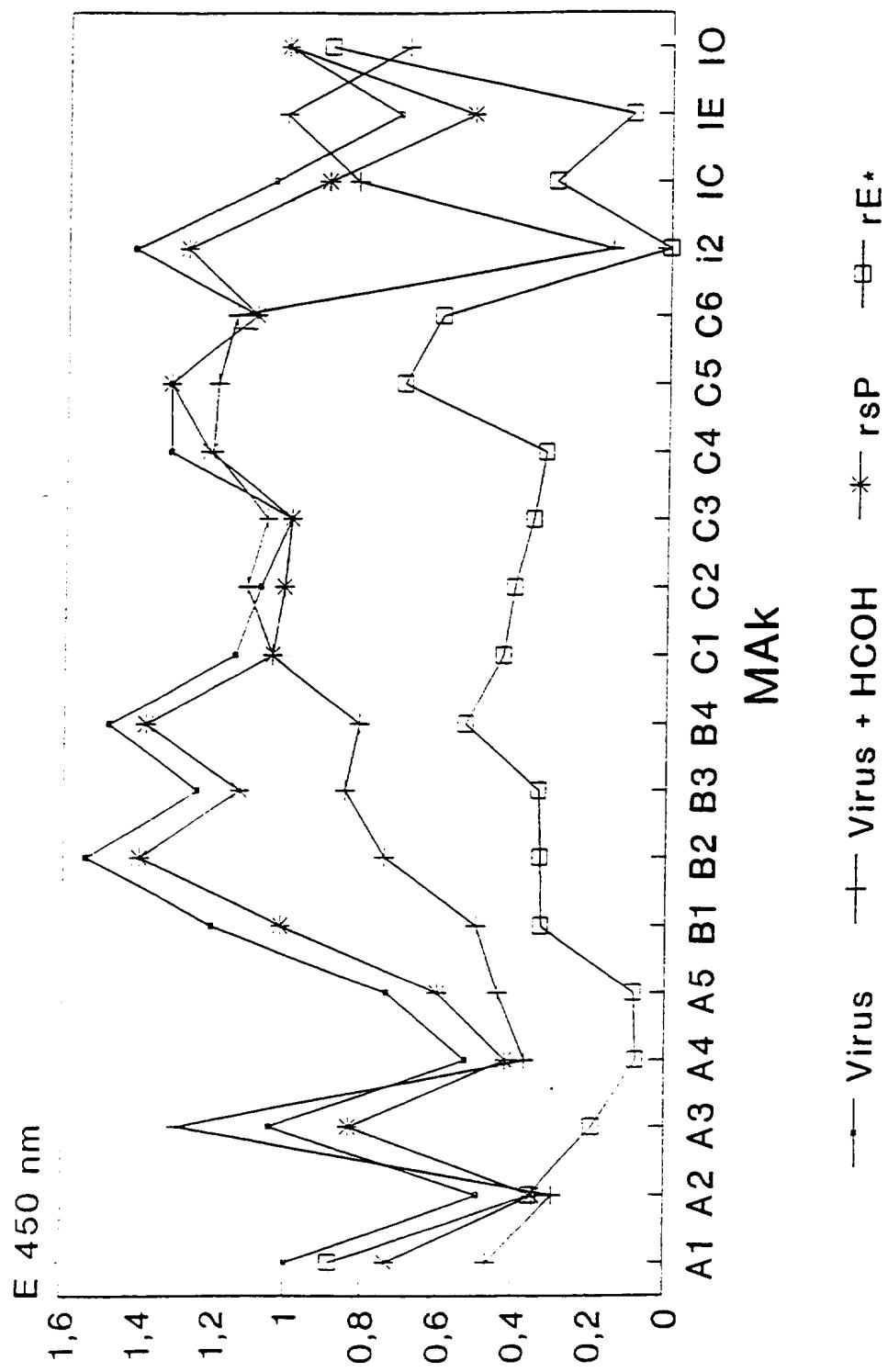


FIG. 10

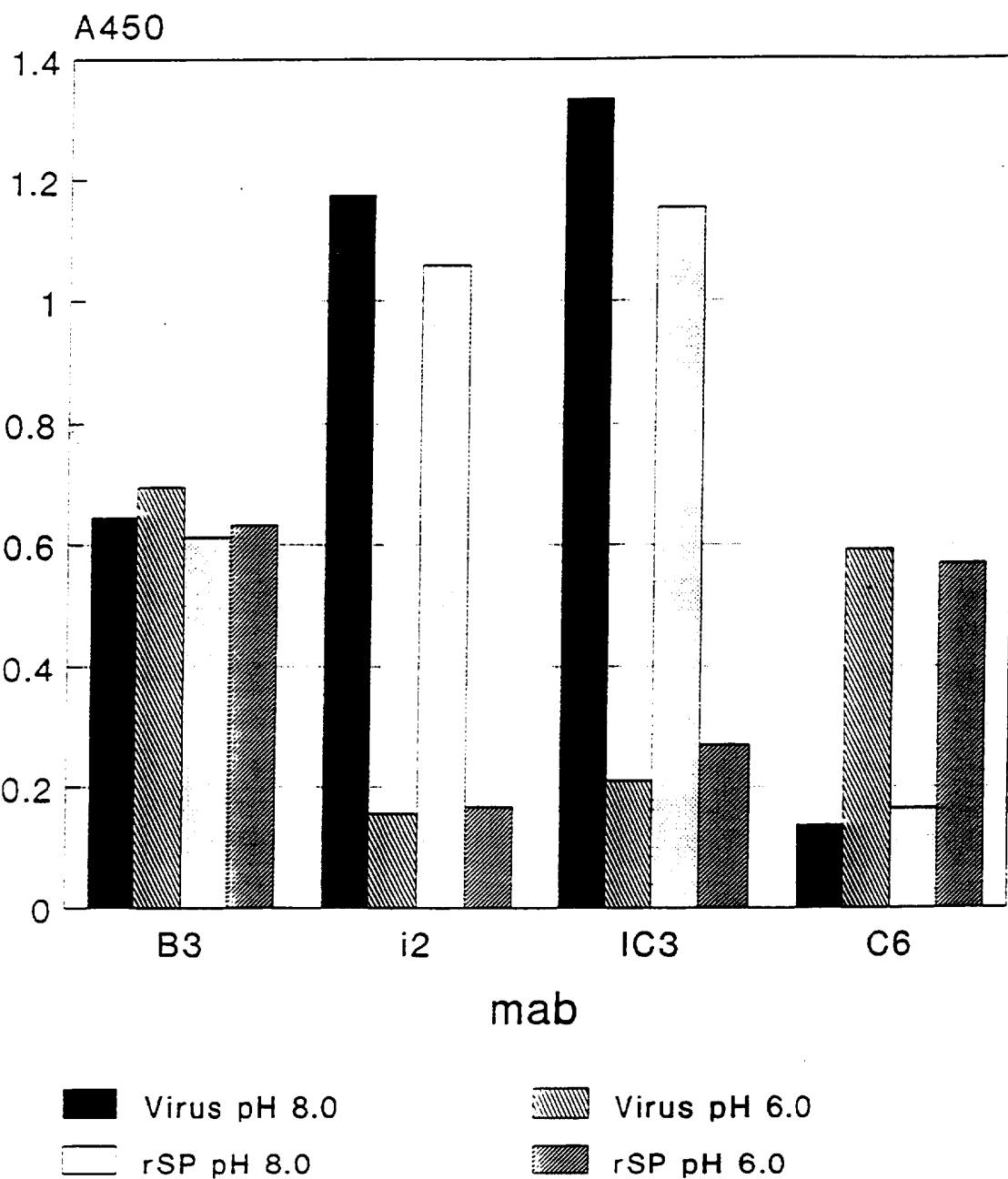


FIG. 11

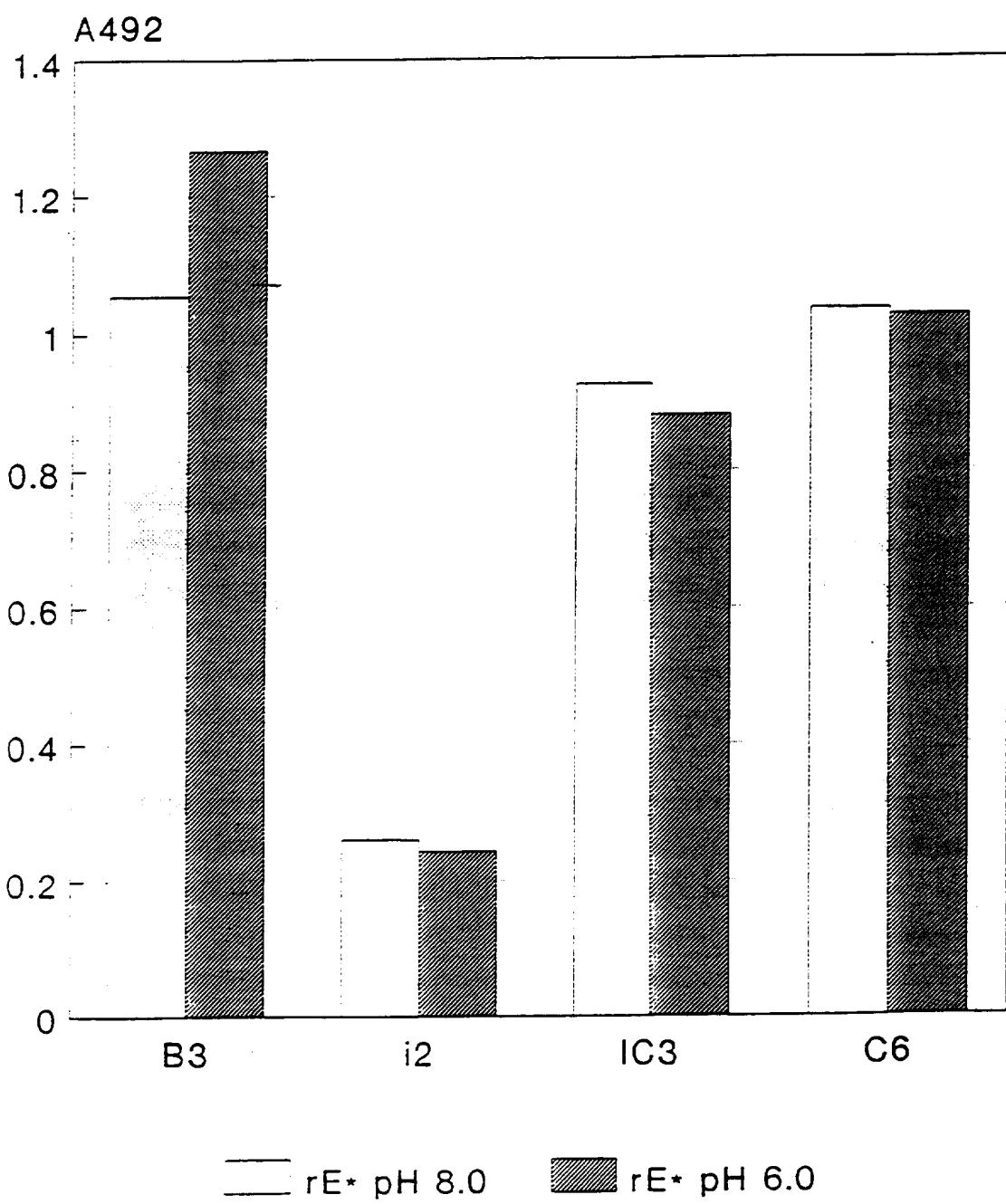


FIG. 12

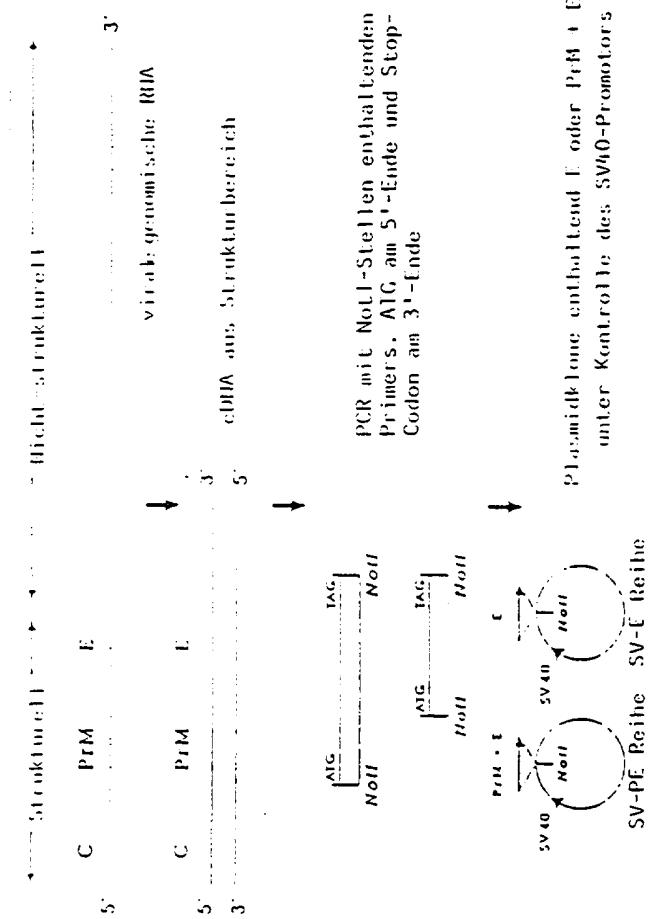


Fig. 13

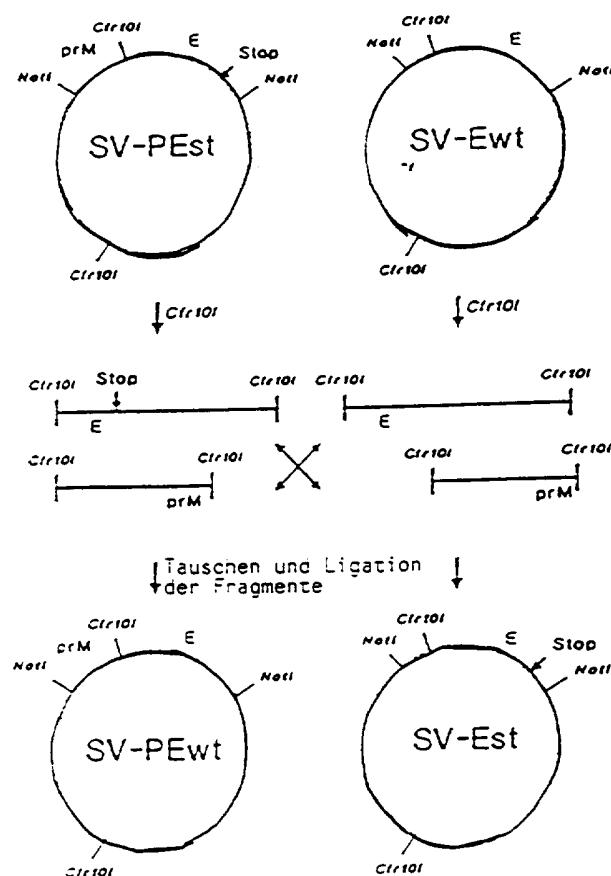


Fig.14

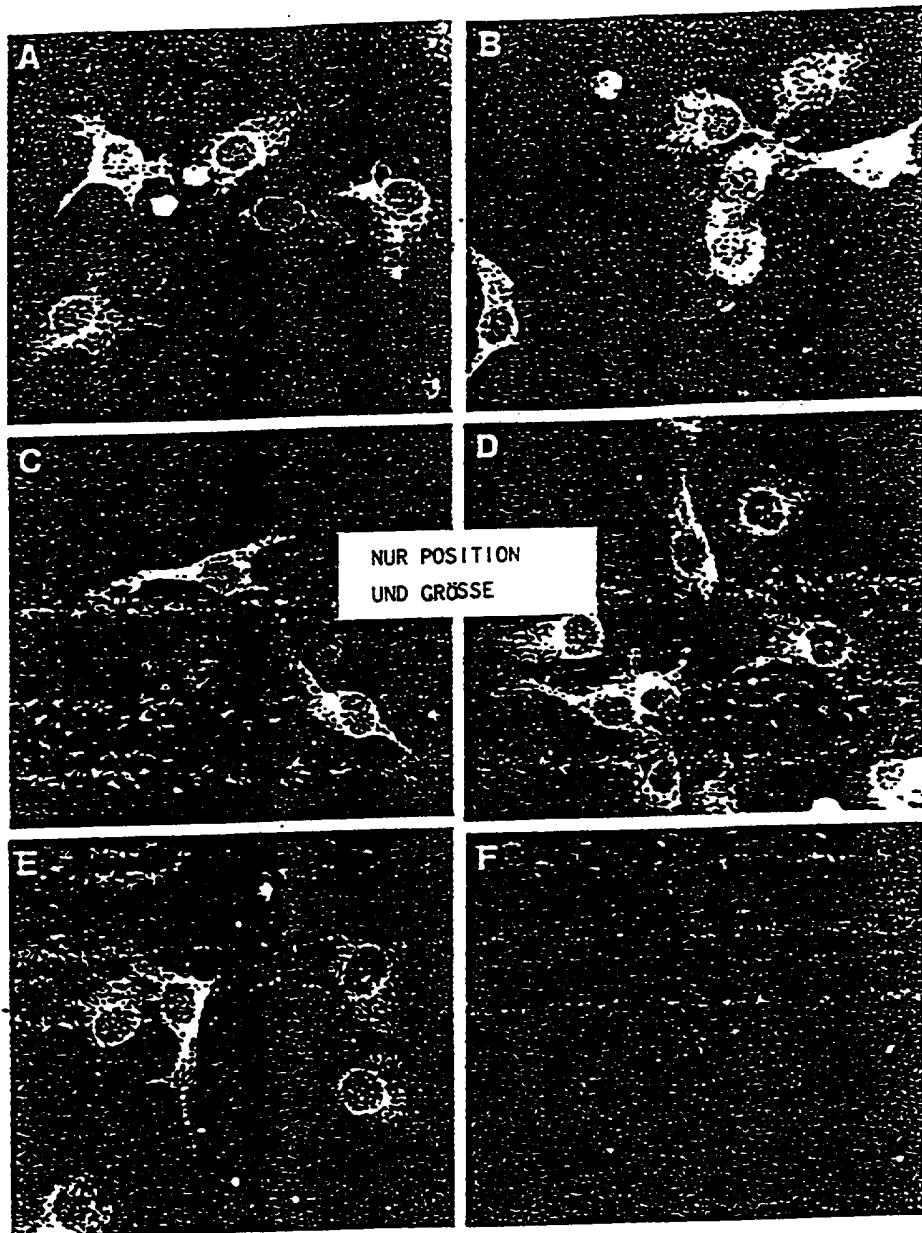


Fig.15