

Potenzierung der Suizidgen-Wirkung durch VP22-Fusionsproteine

Dissertation

DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
DER EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2001

vorgelegt von
Wolfgang Wybranietz

Tag der mündlichen Prüfung:

12.02.2001

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Gebhardt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Schwarz

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Wybranietz, W.A. & Lauer, U. (1998) Distinct combination of purification methods dramatically improves cohesive-end subcloning of PCR products. *BioTechniques* **24**, 578-580.

Wybranietz, W.A., Prinz, F., Spiegel, M., Schenk, A., Bitzer, M., Gregor, M. & Lauer, U.M. (1999) Quantification of VP22-GFP spread by direct fluorescence in 15 commonly used cell lines. *J.Gene Med.* **1**, 265-274.

zur Veröffentlichung eingereicht:

Wybranietz, W.A., Gross, C.D., Phelan, A., O'Hare, P., Spiegel, M., Prinz, F., Bitzer, M., Stähler, P., Gregor, M. & Lauer, U.M. (2000) Enhanced suicide gene effect by adenoviral transduction of a VP22-Cytosine deaminase (CD) fusion gene.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Somatische Lebergentherapie von Dr. Ulrich Lauer an der Medizinischen Klinik, Abteilung für Innere Medizin I, der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die diese Doktorarbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Rolf Gebhardt, jetzt Direktor des Biochemischen Instituts der Universität Leipzig, danke ich ganz herzlich für die bereitwillige Übernahme der Leitung und Betreuung meiner Doktorarbeit. Bei Prof. Dr. Michael Gregor, ärztlicher Direktor der Abteilung für Innere Medizin I der Medizinischen Klinik, bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung.

Meinem Betreuer Dr. Ulrich Lauer danke ich für das stete Interesse an meiner Arbeit. Seine Vorschläge und Hilfestellungen waren ein entscheidender Beitrag zu meiner Arbeit; seine außergewöhnliche Gabe, komplexe Fragestellungen auf den Punkt zu bringen, hat mir oft das weitere Vorgehen erleichtert. Weiterhin bin ich sehr dankbar, dass mir großzügige Freiräume gewährt wurden, eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt für die sehr nette und entspannte Arbeitsatmosphäre. Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Martin Spiegel für seine unerschöpfliche Geduld, seine wissenschaftlichen Anregungen und fachkundige Hilfe bei allen Computerfragen. Bei Christine Groß bedanke ich mich für die Hilfe bei der Herstellung einer Vielzahl rekombinanter Adenoviren. Lars Stolze danke ich für die Durchführung der immunologischen Untersuchungen. Peer Stähler verdanke ich die Idee, VP22-Transportproteine in der Gentherapie zu verwenden. Bei Andrea Schenk, Irina Smirnow, Gülüzar Turan und Shirley Lambrecht bedanke ich mich für die zuverlässige technische Assistenz.

Für das aufmerksame Korrekturlesen der Dissertation bedanke ich mich bei Dr. Florian Graepler, Dr. Michael Bitzer, Dr. Martin Spiegel und Florian Prinz.

Schließlich gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von Dr. Peter O'Hare, insbesondere Dr. Anne Phelan, am Marie Curie Research Institut in Oxted, UK, für die exzellente Einführung in die Arbeitstechniken des VP22-Transports.

Innerhalb des Physiologisch-Chemischen Instituts (PCI) der Universität Tübingen sowie der San Francisco State University (SFSU) und des Lawrence Berkeley Laboratoriums (LBL) danke ich allen, die mir meine ungebrochene Faszination an der Biochemie vermittelt haben.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, dass Sie mir großzügig mein Studium ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Gentransfer-Systeme	3
1.1.1	Retrovirale Vektoren	3
1.1.2	Adenovirale Vektoren	4
1.1.2.1	Generierung rekombinanter Adenoviren durch homologe Rekombination	5
1.1.2.2	Adenovirus-Rezeptor	5
1.1.2.3	Immunantwort auf adenovirale Vektoren	6
1.1.2.4	<i>gutless</i> -Vektoren	6
1.1.2.5	Replikations-kompetente Adenoviren	7
1.1.3	Andere virale Vektorsysteme	7
1.1.4	Nicht-virale Gentransfer-Verfahren	8
1.1.5	DNA-RNA-Chimäre	8
1.1.6	Der „ideale Vektor“	9
1.2	Suizidgentherapie	10
1.2.1	Cytosin-Desaminase (CD) aus <i>E. coli</i> und Thymidin-Kinase (TK) aus Herpes simplex-Virus Typ-1	10
1.3	Interzellulärer Protein-Transport	15
1.3.1	Zellpermeable Peptide	15
1.3.2	VP22 aus Herpes simplex-Virus	17
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Molekularbiologische Materialien und Methoden.....	21
2.1.1	Verwendete Plasmide	21
2.1.1.1	pLXSN	21
2.1.1.2	pWZLneo	22
2.1.1.3	pCD2	22
2.1.1.4	pHSV106	22
2.1.1.5	pcDNA3	22
2.1.1.6	pTG3602	23
2.1.1.7	pTG6600	23
2.1.1.8	pTG8347	23

Inhaltsverzeichnis

2.1.2	Verwendete Bakterienstämme.....	24
2.1.3	Herstellung kompetenter Bakterien.....	24
2.1.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	25
2.1.5	Anlegen von Glycerolkulturen.....	25
2.1.6	Plasmidpräparationen.....	26
2.1.6.1	Mini-Präparation zur Charakterisierung transformierter Bakterien.....	26
2.1.6.2	Maxi-Präparation zur Plasmidgewinnung.....	27
2.1.7	Spektrometrische Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen.....	28
2.1.8	Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	28
2.1.9	Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA.....	29
2.1.10	Glätten überhängender Enden von doppelsträngiger DNA.....	29
2.1.10.1	Auffüllen 5'-überhängender Enden mit Klenow-Enzym.....	29
2.1.10.2	Abbau 3'-überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase.....	30
2.1.11	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	30
2.1.12	Reinigung von DNA aus präparativen Agarose-Gelen.....	31
2.1.13	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase.....	32
2.1.13.1	Ligation Gel-eluierter DNA-Fragmente.....	32
2.1.13.2	„Ein-Topf“-Ligation.....	33
2.1.14	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion).....	34
2.1.14.1	Primer-Design.....	34
2.1.14.2	PCR-Reaktion.....	34
2.1.14.3	Colony-PCR.....	35
2.1.15	Reinigung von PCR-Reaktionsprodukten (Wybranietz & Lauer 1998).....	36
2.1.15.1	Proteinase K-Verdau.....	38
2.1.15.2	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	38
2.1.15.3	Aufreinigen von PCR-Reaktionen und Restriktionsverdauen.....	39
2.1.16	Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	39
2.2	Zellbiologische Materialien und Methoden.....	40
2.2.1	Verwendete Zelllinien.....	40
2.2.2	Zellkultur.....	42
2.2.2.1	Allgemeines.....	42
2.2.2.2	Auftauen von Zellen.....	42
2.2.2.3	Zellpassage.....	43
2.2.2.4	Kryokonservierung von Zellen.....	43
2.2.2.5	Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer.....	43
2.2.2.6	Kristallviolett-Färbung.....	44
2.2.3	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	44
2.2.3.1	Lipofektion mit LipofectAMINE™.....	44
2.2.3.2	Transfektion mit LipofectIN™.....	45
2.2.4	Proliferationstest: SRB-Assay.....	45
2.2.5	FACS-Analyse.....	46
2.2.6	Immunfluoreszenz-Färbung.....	47

2.3	Virologische Materialien und Methoden	49
2.3.1	Generierung rekombinanter Adenoviren	49
2.3.1.1	Herstellung rekombinanter Adenoviren durch homologe Rekombination in <i>E. coli</i> BJ5183	50
2.3.1.2	Propagation rekombinanter Adenoviren	52
2.3.1.2.1	<i>Herstellung von Rohextrakt</i>	52
2.3.1.2.2	<i>Herstellung gereinigter Adenovirus-Lösungen durch CsCl-Zentrifugation</i>	53
2.3.1.3	Plaque-Assay zur Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren	54
2.3.1.3	Untersuchung rekombinanter Adenoviren auf RCA	54
2.3.1.3.1	<i>Isolierung der adenoviralen DNA</i>	55
2.3.1.3.2	<i>PCR der E1A- und E2B-Genregion</i>	55
2.3.1.4	Transduktion von adhärenen Zellen mit rekombinanter Adenoviren	55
2.3.2	Generierung rekombinanter Retroviren.....	56
2.3.2.1	Retrovirale Verpackungszelllinien.....	56
2.3.2.1.1	<i>PE501 und PA317: Verpackungszellen der zweiten Generation</i>	56
2.3.2.1.2	<i>Phoenix-eco und Phoenix-ampho: Verpackungszellen der dritten Generation</i>	57
2.3.2.2	Generierung transienter Retrovirus-Produzentenzellen und Transduktion adhärenen Zellen mit rekombinanter Retroviren.....	57
2.3.2.3	Bestimmung des retroviralen Titers	58
2.3.2.3.1	<i>Titerbestimmung mittels Selektion auf Antibiotika-Resistenz (G418-Selektion)</i>	58
2.3.2.3.2	<i>Titerbestimmung mittels Nachweis der GFP-Expression (FACS-Analyse)</i>	59
2.4	Proteinchemische Materialien und Methoden	60
2.4.1	Zellaufschluss von adhärenen Zellen	60
2.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	60
2.4.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	61
2.4.4	Western-Blotting	63
2.4.4.1	<i>Wet-Blotting</i>	63
2.4.4.2	<i>ECL-Detektion</i>	64
2.5	Immunologische Materialien und Methoden	66
2.5.1	Immunisierung von BALB/c-Mäusen: Generierung von CTLs.....	66
2.5.2	<i>Chrom-release-Assay</i>	67
3	ERGEBNISSE	69
3.1	Klonierung.....	69
3.1.1	Retrovirale Plasmidkonstrukte	69
3.1.2	Adenovirale Plasmidkonstrukte.....	73
3.1.3	VP22-Expressions- und Reporter-Konstrukte.....	78
3.1.4	Sequenzierung der Konstrukte	80
3.1.4	Expressions-Analyse der Plasmidkonstrukte durch Western-Blotting.....	83
3.2	Herstellung rekombinanter Adenoviren	88
3.2.1	Homologe Rekombination.....	88
3.2.2	Expressions-Analyse der Adenovirus-Vektoren durch Western-Blotting	89

3.3	Quantifizierung von VP22-vermitteltem <i>spread</i> in Säugerzelllinien	95
3.3.1	VP22-GFP als Modellprotein	95
3.3.2	FACS-Analyse des VP22-vermittelten <i>spread</i>	98
3.4	Immunfluoreszenz-Detektion des VP22-vermittelten Transports.....	104
3.4.1	VP22-GFP-Kontrolle.....	104
3.4.2	Adenovirale Plasmidkonstrukte.....	106
3.4.3	Rekombinante Retroviren.....	113
3.4.4	Rekombinante Adenoviren	115
3.5	Quantifizierung des Suizidgen-Effektes	123
3.5.1	Adenovirale CD-VP22-Vektoren	124
3.5.2	Adenovirale TK-VP22-Vektoren	127
3.6	Immunogenität von VP22	129
3.6.1	MHC I-Epitop-Vorhersagen	129
3.6.2	CTL-Antwort.....	132
4	DISKUSSION	136
4.1	VP22-vermittelter <i>spread</i> als allgemeines biologisches Phänomen.....	136
4.2	Herstellung viraler VP22-Suizidgen-Vektoren.....	138
4.3	Immunfluoreszenz-Detektion des VP22-vermittelten Transports.....	139
4.4	Quantifizierung des Suizidgen-Effektes	142
4.5	Immunreaktion auf VP22	144
4.6	Vergleich von VP22 mit anderen Protein-Transportern.....	145
4.7	Mechanismus des VP22-Protein-Transports	147
4.8	Weiterführende Suizidgen-Strategien	151
4.8.1	Verbesserte Versionen der HSV-1 TK	151
4.8.2	Wirkungsverstärkung der CD-Suizidgen-Strategie.....	152
4.8.3	CD-TK Doppel-Strategie.....	153
4.8.4	Ausblick.....	154
5	ZUSAMMENFASSUNG	157
	LITERATUR.....	161
	ANHANG.....	175
	Liste der verwendeten Abkürzungen.....	175
	Firmenverzeichnis	178

1 Einleitung

Die Gentherapie versucht Erkrankungen durch Einbringung genetischer Informationen in spezifische Zellen eines Patienten zu behandeln. Damit wird das klassische Heilungskonzept des „Mensch wird krank, erhält Medikament, wird gesund“ zum „Mensch wird krank, erhält Gen, wird gesund“ umgedacht. Die Idee, Krankheiten mittels Korrektur von defekter Gene zu therapieren, wurde bereits 1971 von W. French Anderson und Marshall Nirenberg aufgebracht. Nach einem langjährigen Moratorium, welches zum einen der Erarbeitung eines Evaluations- und Kontrollsystems diente, zum anderen die Erforschung von Vektorsystemen mit ausreichenden Sicherheitskriterien für die Anwendung am Menschen ermöglichte, wurde der erste gentherapeutische Eingriff 1990 zur Behandlung der Adenosindesaminase (ADA)-Defizienz vorgenommen (Anderson 1992). Bis heute wurden über 390 gentherapeutische Protokolle genehmigt (Stand: August 2000), davon circa 200 Studien begonnen, wobei mehr als 2500 Patienten beteiligt waren (Human Gene Therapy Editor 2000). Während die Behandlung klassischer monogenetischer Erbkrankheiten wie etwa der Cystischen Fibrose, ADA-Defizienz, familiären Hypercholesterinämie (FH) und Hämophilie weniger als ein Zehntel der eingeleiteten klinischen Studien ausmacht, dienen mehr als zwei Drittel aller Gentherapie-Ansätze zur Behandlung von Krebs. Die eingesetzten Strategien beruhen auf einer selektiven Zerstörung von Tumorzellen, indem die tumorspezifische Immunantwort verstärkt oder toxische Metabolite in den Tumorzellen (Suizidgentherapie) erzeugt werden.

Definitive Erfolge beim Einsatz gentherapeutischer Strategien wurden dabei erst vor kurzem vermeldet: mittels adeno-assoziierten Viren (AAV) konnte bei Hämophilie B-Patienten der für die Blutgerinnung wichtige Faktor IX dauerhaft stabil in körpereigene Skelettmuskelzellen eingebracht werden (Kay *et al.* 2000); weiterhin wurden zwei Patienten mit der schweren Immundefizienz SCID-X1 mittels retroviraler Vektoren erfolgreich behandelt (Cavazzana *et al.* 2000).

Kurz zuvor war die Gentherapie als medizinische Einsatzstrategie stark in die Kritik geraten, als es bei einer klinischen Phase II-Studie der Ornithin-Transcarbamoylase (OTC)-

Defizienz in Philadelphia, USA, zu einem Todesfall gekommen war. Während eines Dosis-Eskalierungs-Tests entwickelte der Patient Jesse Gelsinger bei Verwendung der höchsten Dosis von $3,8 \times 10^{13}$ Partikeln eines adenoviralen Vektors eine akute Immunreaktion, so dass er wenige Tage später an Multi-Organ-Versagen starb (Übersicht in: Marshall 2000). Bei einer eingehenden Untersuchung des Unglücksfalles stellte sich heraus, dass mehrfach vom genehmigten Protokoll abgewichen worden war. Als Konsequenz wurde das Dilemma deutlich, dass die verwendeten adenoviralen Vektoren der ersten Generation wissenschaftlich längst nicht mehr dem „Stand der Forschung“ entsprachen, jedoch wegen der aufwändigen Genehmigungsverfahren der klinischen Studien – wie mehrere Jahre zuvor beantragt – zum Einsatz kamen. Darüber hinaus war der virale Vektor nicht ausreichend getestet worden, was auf mangelnde Sicherheitsmaßnahmen hinweist.

Größtes Defizit der bisherigen gentherapeutischen Anwendungen bei Patienten ist die unzureichende Gentransfer-Effizienz *in vivo*. So wurde selbst bei der höchsten jemals verwendeten Dosis von $3,8 \times 10^{13}$ adenoviralen Vektorpartikeln (Gelsinger-Todesfall) eine Transduktionsrate von unter 1% der Leberzellen detektiert. Zudem werden die eingebrachten Fremdgene meist nur kurz oder schwach exprimiert. Ein weiterer Nachteil der bestehenden Verfahren ist darüber hinaus die mangelnde Gewebespezifität der Vektorsysteme, weshalb bislang *ex vivo*-Ansätze bevorzugt wurden. Dabei werden dem Patienten die relevanten Zielzellen entnommen, der Gentransfer *in vitro* vorgenommen und die genetisch modifizierten Zellen wieder in den Patienten eingebracht. Sollen bestimmte Zellpopulationen *in vivo* behandelt werden, muss eine größtmögliche Gewebespezifität gewährleistet sein. Vor allem soll verhindert werden, dass es zu einem unbeabsichtigten Gentransfer in Keimbahnzellen kommt. Diese Geweberestriktion kann prinzipiell auf drei Ebenen erreicht werden, was für das Beispiel der Lebergentherapie detailliert diskutiert wurde (Lauer *et al.* 1998). Bei lokaler Applikation, z.B. über die *Arteria hepatica*, kann eine limitierte Verteilung des Genvektors erreicht werden. Zudem ist die gezielte Behandlung eines Organs auf Basis der spezifischen Oberflächenrezeptoren möglich; so können Leberzellen durch die Wechselwirkung des F-Hüllproteins von Sendai-Virus mit dem Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGP-R), der ausschließlich in der Leber gebildet wird, spezifisch angesteuert werden. Kommt es dennoch zur Transduktion von unerwünschten Geweben, kann eine organspezifische Regulation der Transkription bei Verwendung leberspezifischer Genregulationselemente für eine Limitierung der Expression sorgen. Bisher verwendete Fragmente aus natürlich vorkommenden Promotoren erwiesen sich als nicht genügend selektiv oder

zeigten *in vivo* keine therapeutisch ausreichende Expressionsstärke. In den vergangenen Jahren wurden jedoch elegante Selektions-Assays entwickelt, in denen synthetische Designer-Promotoren gezielt auf die jeweiligen Anforderungen des Zielgewebes abgestimmt werden können (Edelman *et al.* 2000; Li *et al.* 1999). Werden beispielsweise in den Promotor- und Enhancer-Bereichen der therapeutischen Gene multimere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren verwendet, welche nur in den Zielorganen vorkommen, ist potenziell eine ausreichend starke und dennoch gewebespezifische Expression möglich (Wybranietz 1996). Die zentrale Herausforderung der Gentherapie ist somit, sichere Vektorsysteme zu entwickeln, welche therapeutische Gene in ausreichendem Maße in die gewünschten Zielzellen hinein transportieren und deren effiziente Expression gewährleisten.

1.1 Gentransfer-Systeme

DNA- und RNA-Viren sind in der Lage, ihr genetisches Material in Fremdzellen effektiv einzubringen und zu exprimieren. Für den Einsatz in der Gentherapie wurden diese dahingehend verändert, dass sie ohne Fähigkeit zur Replikation insertierte DNA in spezifische Zielzellen übertragen können. Folglich wurden Viren aller Klassen auf ihre Eignung als Gentransfer-Systeme untersucht (Übersicht in: Mulligan, 1993; Anderson, 1984), wobei Retroviren neben Adenoviren bisher am häufigsten als rekombinante Genvektoren eingesetzt wurden.

1.1.1 Retrovirale Vektoren

Das *Moloney Murine Leukemia-Virus* (MoMLV), ein Retrovirus, das normalerweise nur Mäuse infiziert, dient als Grundlage der meisten retroviralen Systeme. In neuerer Zeit sind jedoch auch lentivirale Vektoren auf Basis des *Human Immunodeficiency-Virus* (HIV) entwickelt worden (Naldini *et al.* 1996), die im Gegensatz zu anderen Retroviren auch den Gentransfer in ruhende, sich nicht aktiv teilende, Zellen erlauben (Gallay *et al.* 1995 & 1997). Das übertragene genetische Material wird nach Transduktion mit retroviralen Vektoren stabil und effizient in die chromosomale DNA der Wirtszelle eingebaut. Durch Verwendung von Verpackungszelllinien, die neben den Sequenzen für die virale Replikation alle essenziellen Struktur- und Regulator-Proteine zur Verfügung stellen, ist es möglich, rekombinante, replikations-defiziente Viren in hohen Konzentrationen ohne Kontamination von Wildtyp-Virus zu erhalten (Yang *et al.* 1999; Grignani *et al.* 1998; Danos & Mulligan,

1988). Mit dem Einbau heterologer Hüllproteine („Pseudotypisierung“) kann die Spezifität für Zielzellen eingeschränkt oder erweitert und der Tropismus retroviraler Gentransfer-Systeme prinzipiell verändert werden. Wird das ursprüngliche *envelope*-Gen (*env*-Gen) des MoMLV in der Verpackungszelllinie durch das des murinen Retrovirus 4070A oder des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) ersetzt (Burns *et al.* 1993), lässt sich das Wirtsspektrum von Mäuse- und Rattenzellen (ecotropes Spektrum) auf andere, auch humane Säugerzellen erweitern (amphotropes bzw. pantropes Spektrum) und ermöglicht so den Einsatz in der Gentherapie an Patienten. Andererseits wird durch den Einbau des F-Hüllproteins von Sendai-Virus, welches mit dem leberspezifischen Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGP-R) spezifisch wechselwirkt, ein gewebespezifischer hepatotroper Retrovirus-Vektor erzeugt (Spiegel *et al.* 1998).

1.1.2 Adenovirale Vektoren

Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Viren mit einem linearen Genom von etwa 36 kb Länge. Das unbehüllte ikosaedrische Viruscapsid wird von den Proteinen Hexon, Penton und Fiber aufgebaut. Adenoviren können sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen effektiv infizieren, so dass davon abgeleitete adenovirale Vektoren prinzipiell das größte Potential für einen *in vivo*-Einsatz an Patienten bieten. Wildtyp-Adenoviren sind verantwortlich für etwa 5-15% aller viral bedingten Erkältungen, so dass mehr als 95% der Bevölkerung seropositiv für Antikörper gegen adenovirale Proteine sind. Auf Grund dieser Vorstimulation des Immunsystems mit Bildung von neutralisierenden Antikörpern kann die Wirksamkeit des Gentransfers grundsätzlich negativ beeinflusst werden (Knowles *et al.* 1995).

Trotz der vermeintlichen Ungefährlichkeit kann eine Infektion mit Adenoviren – im Gegensatz zu Retroviren – zur Zell-Lyse führen, so dass auch bei der Entwicklung des adenoviralen Vektor-Systems die Propagation in der Wirtszelle verhindert werden musste. Dies wird erreicht durch Entfernen der adenoviralen E1A-E1B-Region. Stellt man die darin enthaltenen Gene *in trans* zur Verfügung, werden replikations-defiziente Adenoviren erzeugt (Jones & Shenk 1979). Die bislang in der Gentherapie eingesetzten rekombinanten Adenoviren basieren auf der E1A-E1B-deletierten Sequenz des humanen Serotyps 5 (Ad5), welcher nach derzeitigem Wissensstand – im Gegensatz zu anderen adenoviralen Serotypen – keine Transformationen auslöst (Trapnell 1993). Fremd-Gene werden als komplette Expressions-Kassetten meist in die deletierte E1-Region inseriert (Berkner & Sharp 1984).

Nach Propagation in E1A-E1B-komplementierenden Zellen wie 293 (Louis *et al.* 1997; Aiello *et al.* 1979; Graham *et al.* 1977; Graham *et al.* 1974), 911 (Fallaux *et al.* 1996) oder PER-C6 (Fallaux *et al.* 1998) können infektiöse rekombinante Adenoviren gebildet werden. Bei E1-Deletion besitzen derartige Vektoren der ersten Generation eine Kodierungskapazität von 5.2 kb, bei zusätzlicher E3-Deletion bis 8.3 kb.

1.1.2.1 Generierung rekombinanter Adenoviren durch homologe Rekombination

Infektiöse Virus-Partikel werden durch homologe Rekombination zweier nicht-infektiöser Plasmide mit überlappenden Sequenzen erzeugt (Graham & Prevec 1995; Berkner 1988). Eines der Plasmide dient als Klonierungsvektor und enthält zusätzlich zur insertierten Fremd-DNA Ad5-Sequenzen, welche die Transgen-Kassette flankieren. Das andere Rekombinations-Plasmid enthält ein vollständiges adenovirales Genom oder Derivate davon: Vektoren der ersten Generation (pFG140; Ghosh *et al.* 1986; Graham 1984), zweiten Generation (pJM17 für Insertionen in E1: McGrory *et al.* 1988) oder neuester Generationen (pBHG-Serie: Bett *et al.* 1994; pTG3602: Chartier *et al.* 1996; pAdEasy-Serie: He *et al.* 1998).

Die homologe Rekombination der Plasmide kann nach Co-Transfektion in 293-Zellen (Haj & Graham, 1986) oder effektiver durch Co-Transformation von *rec*-positiven *E. coli*-Stämmen (Chartier *et al.* 1996) erfolgen.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an alternativen Protokollen beschrieben, in denen wahlweise die homologe Rekombination in *E. coli* oder Hefen stattfindet, oder Klonierungen mit Hilfe von Cosmiden, *bacterial artificial chromosomes* (BACs) oder *rare cutting* Intron-kodierten Restriktionsendonukleasen (Mizuguchi & Kay 1998) durchgeführt werden. Im Wesentlichen stellen diese nur minimale Modifikationen der oben beschriebenen Prinzipien dar, so dass hier nicht eigens darauf eingegangen wird.

Adenovirale Partikel können auf Grund ihrer Stabilität gut gereinigt und aufkonzentriert werden, so dass hochtitrige Lösungen für den Gentransfer zur Verfügung stehen.

1.1.2.2 Adenovirus-Rezeptor

Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) für Adenoviren ist ubiquitär (Bergelson *et al.* 1997), weshalb eine Vielzahl von Zelltypen durch adenoviralen Gentransfer effizient transduziert werden kann. Rekombinante Adenoviren werden durch Rezeptor-vermittelte Endo-

zytose aufgenommen. Durch eine lytische Aktivität können sie dem endosomal-lysosomalen Kreislauf in der Zelle entkommen und verbleiben episomal im Zellkern, so dass die Expression mitgeführter Fremd-Gene meist nur transienter Natur ist. Nur in seltenen Fällen kommt es zu einer Integration in die Wirts-DNA, so dass Schädigungen durch Tumorinduktion weitgehend ausgeschlossen werden können. Bei Verwendung von Adenoviren im Nagetiermodell wurde ein Leber-Tropismus beschrieben, da eine Injektion von rekombinanten Adeno-Vektoren in die Schwanzvene von Mäusen und Ratten in einer hohen Genexpression in der Leber resultiert (Huard *et al.* 1995).

1.1.2.3 Immunantwort auf adenovirale Vektoren

Die Gabe hoher Dosen rekombinanter Viren erzeugt eine inflammatorische Reaktion, die direkt auf die sog. *leaky* Expression adenoviraler Proteine zurückzuführen ist (Engelhardt *et al.* 1994; Yang *et al.* 1994). Zusätzlich scheint auf Grund des Antigen-Gedächtnisses des Immunsystems eine wiederholte Gabe adenoviraler Vektoren nicht sinnvoll, da eine immer stärkere Immunantwort beobachtet wird. Somit ergibt sich derzeit folgende Problematik: bei niedrigen Dosierungen bilden nur wenige Zellen das gewünschte Transgen-Produkt, bei hohen wird eine akute Immunreaktion ausgelöst. Die Immunogenität des adenoviralen Vektorsystems stellt zur Zeit ein Haupthindernis für eine breitere Anwendung dar. Der tragische Todesfall des Patienten Gelsinger bei einer klinischen Phase II-Studie ist ebenfalls im Wesentlichen auf eine inflammatorische Antwort gegen den verwendeten rekombinanten Adenovirus zurückzuführen.

Auf verschiedenen Wegen wird versucht, die Immunreaktion auszuschalten: Induktion von Immuntoleranz (Ilan *et al.* 1998; DeMatteo *et al.* 1995; Yang *et al.* 1994), Antikörper-vermittelte Modulation der Abwehrzellen (Kay *et al.* 1997; Yang *et al.* 1996), Verwendung alternativer humaner oder explizit nicht-humaner Adenovirus-Serotypen (Hofmann *et al.* 1999; Yang *et al.* 1996; Kass *et al.* 1996).

1.1.2.4 *gutless*-Vektoren

Eine neuartige Strategie wird bei den sog. *gutless*-Vektoren verwendet, bei denen alle kodierenden Elemente des Virus entfernt wurden, so dass eine Immunreaktion gegen endogen exprimierte adenovirale Proteine ausgeschlossen wird (Fisher *et al.* 1996; Kochanek *et al.* 1996). Als Klonierungskapazität stehen ca. 40 kb zur Verfügung, was die Einbeziehung kompletter Promotor-Regionen sowie Intron-Exon-Strukturen, wie sie in natürlichen Gen-

loci vorkommen, ermöglicht. Die zur Replikation und Verpackung der rekombinanten Adenoviren benötigten Proteine werden dabei in *trans* durch einen Adeno-Helfervirus zur Verfügung gestellt (Sandig *et al.* 2000; Parks *et al.* 1996; Mitani *et al.* 1995). Im Mausmodell konnte so nach Leber-gerichtetem Transfer eines *gutless*-Vektors eine über mehr als 10 Monate dauernde Expression des therapeutischen Gens humanes α_1 -Antitrypsin (hAAT) beobachtet werden, ohne dass komprimierende Immunreaktionen oder toxische Effekte auftraten (Schiedner *et al.* 1998). Durch Wechsel des Serotyps bei wiederholter Gabe dieses Vektors, womit die humorale Immunantwort umgangen wurde, wurden in Pavian-Affen physiologische Serumspiegel für länger als ein Jahr nach Erstinjektion gefunden (Morrall *et al.* 1999). Da jedoch in Patienten cytotoxische T-Lymphocyten (CTLs) gefunden wurden, die gegen die viralen Capsid-Proteine Penton, Hexon und Fiber gerichtet waren (Molinier *et al.* 2000), bleibt der Erfolg von multi-deletierten oder *gutless*-Vektoren im klinischen Modell noch abzuwarten.

1.1.2.5 Replikations-kompetente Adenoviren

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen replikations-defizienten Adenovirus-Vektoren, wird ein attenuierter Adenovirus (ONYX-015), der kein therapeutisches Transgen besitzt, in der Krebstherapie getestet. Durch die Deletion des E1B-55kD Gens im Adenovirus-Genom wird eine selektive Replikation dieser Viren in Tumorzellen, welche Mutationen im p53-Gen aufweisen, postuliert (Bischoff *et al.* 1996). Dagegen wird eine Vermehrung in normalen, nicht malignen Zellen, verhindert (Heise *et al.* 1997). Zusätzlich kann die Transduktionseffizienz der infizierten Tumorzellen durch Vermehrung des Virus und Neu-Infektion der Nachbarzellen verbessert werden. Während diese onkolytische Aktivität gegenwärtig in einer klinischen Phase III-Studie bei Patienten mit Kopf- und Nacken-Tumoren getestet wird (Kirn, 2000; Vile *et al.* 2000), wird die Tumorselektivität der Replikation des ONYX-Virus wie auch die Abhängigkeit vom p53-Status der Tumorzellen von anderen Studien bestritten (Harada & Berk, 1999; Hay *et al.* 1999; Hall *et al.* 1998).

1.1.3 Andere virale Vektorsysteme

Obleich mehr als 80% der bisher in klinischen Versuchen verwendeten viralen Vektoren auf Retro- oder Adenoviren basieren, wurden potenziell vorteilhaftere alternative Vektorsysteme weiterentwickelt (Übersicht in: Anderson, 1998). Dabei zeigen Herpesvirus-Systeme beispielsweise einen definierten Neuro-Tropismus. Während Polio-, Sendai-, Ra-

bies-, Alpha-, Sindbis- und andere RNA-Virus-Vektoren noch in den Anfängen ihrer Entwicklung stehen, waren mit Adeno-assoziierten Viren (AAV) bereits erste klinische Erfolge zu verzeichnen (Kay *et al.* 2000): in einer klinischen Phase I-Studie konnte nach Übertragung des Blutgerinnungsfaktors IX in Skelettmuskelzellen hämophiler Patienten eine langdauernde therapeutische Wirksamkeit mit erhöhten Proteinspiegeln im Blut und verkürzter Blutgerinnungszeit ohne gleichzeitige Toxizität des Gentransfersystems beobachtet werden.

1.1.4 Nicht-virale Gentransfer-Verfahren

Die meisten nicht-viralen Methoden des Gentransfers beruhen auf der Rezeptor-vermittelten Endozytose und der Membranfusion mit Hilfe von Liposomen (Übersicht in: Cotten & Wagner 1993). Indem die zu übertragende DNA mittels Polykationen wie Polylysin an Liganden (z.B. Transferrin, Antikörper gegen Zelloberflächenproteine, Asialo-Orosomucoid, *nerve growth factor* (NGF)) gekoppelt wird, kann der Ligand von entsprechenden Rezeptoren der Zelloberfläche erkannt werden. Zusätzlich wird versucht, dem lysosomalen Abbau der endozytotisch aufgenommenen Komplexe durch zusätzlichen Einbau von inaktivierten Adenovirus-Hüllen oder synthetischen Peptiden, die ein Ausbrechen aus dem Endosom ermöglichen, entgegenzuwirken (Übersichten in: Phillips 1995; Curiel 1994).

Kationische Lipide wie Polyethylenimin (PEI) (Boussif *et al.* 1995), Lipofectamine™, aktivierte Dendrimere (Tang *et al.* 1996) oder Lipidgemische (Felgner *et al.* 1994) kondensieren die DNA mittels positiver Ladung und werden durch Membranfusion in die Zellen aufgenommen. Weitere mechanische Verfahren des Gentransfers sind die Elektroporation (Heller *et al.* 2000), Mikroinjektion (Davis *et al.* 2000) und die Injektion DNA-bedeckter Partikel mit Hilfe der „gene gun“ (Yang & Sun, 1995). Hauptnachteile dieser physikalisch-chemischen Systeme sind die geringe Transfektionseffizienz *in vivo* und die meist nur transiente Expression des Transgens, da keine Verankerung im Wirtszellgenom stattfindet.

1.1.5 DNA-RNA-Chimäre

Einen völlig neuartigen Ansatz verfolgt die Strategie der *targeted gene repair* (zielgerichtete Reparatur von Genen), bei der durch Verwendung chimärer, doppelsträngiger und hochstabiler RNA-DNA-Oligonukleotide der gezielte Basenaustausch einer bestimmten

Mutation erfolgt. Anstatt die Funktion defekter DNA-Abschnitte durch Einbringung eines zusätzlichen, funktionellen Gens zu ersetzen, können mutierte Nukleotide in den Chromosomen selbst durch das zelleigene *mismatch*-Reparatur-System dauerhaft genetisch korrigiert werden (Übersichten in: Kmiec, 1999; Kren *et al.* 1999). Im Ratten-Tiermodell des Crigler-Najjar-Syndroms konnte nach Injektion in die Schwanzvene eine spezifische und dauerhafte *in vivo*-Korrektur der zugrundeliegenden Mutation in rund 20% der Leberzellen erreicht werden (Kren *et al.* 1999). Als Carrier der chimären RNA-DNA-Oligonukleotide dienen entweder Liposomen-Gemische oder Polyethylenimin (PEI) als Polykation, so dass durch zusätzlichen Einbau von Galactocerebroside bzw. Lactose-Resten spezifisch der Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGP-R) der Hepatozyten angesteuert werden kann (Kren *et al.* 1998).

1.1.6 Der „ideale Vektor“

Der ideale Vektor für alle Anforderungen der humanen *in vivo*-Gentherapie ist bisher nicht gefunden, und es zeichnet sich ab, dass sich für die verschiedenen Anwendungen alternative Systeme als Methode der Wahl erweisen werden. Ist nur eine kurzzeitige Expression des Transgens notwendig – wie im Falle eines toxischen Genprodukts in Tumorzellen (Suizid-gentherapie) –, scheinen adenovirale Vektoren geeignet. Für eine dauerhafte Expression zur Korrektur genetischer Krankheiten ist jedoch ein integrierender Vektor ohne immunologische Komplikationen wünschenswert. Ein hypothetischer idealer Vektor sollte Eigenschaften viraler und synthetischer Systeme besitzen (Verma & Somia, 1997):

- einfache und reproduzierbare Herstellung
- Fähigkeit der zielgerichteten Integration ins Wirtsgenom bzw. stabiles episomales Stadium
- Infektion sowohl mitotischer als auch ruhender Zellen gleichermaßen möglich
- hohe Vektorkonzentration ($>10^8$ Partikel pro ml Vektorsuspension)
- regulierbare Transkription zur gezielten Steuerung der Expression von außen
- Gewebe- bzw. Zell-spezifischer Gentransfer
- Ausbleiben einer Immunreaktion.

Derzeit besitzt kein gentherapeutischer Vektor alle diese Eigenschaften, jedoch ist jede Anforderung einzeln in den verschiedenen Gentransfersystemen erfüllt.

1.2 Suizidgentherapie

Das Wirkungsprinzip der Suizidgentherapie basiert auf der Möglichkeit des gezielten Transfers von Genen, die für körperfremde Enzyme kodieren, in die Tumorzellen. Nach systemischer Gabe ungiftiger Substrate (sog. *prodrugs*) werden diese spezifisch von den genetisch manipulierten Krebszellen in toxische Metabolite konvertiert (Lal *et al.* 2000; Moolten, 1994). Damit werden lokal, im Bereich des erfolgten Gentransfers, sehr hohe Konzentrationen des toxischen Metaboliten erzielt, während eine systemische Toxizität, die üblicherweise bei einer konventioneller Chemotherapie auftritt, vermieden werden kann. Die in der Suizidgentherapie verwendeten Enzyme stammen meist aus Viren, Bakterien und Pilzen, in denen Stoffwechselwege vorkommen, die bei Säugetieren nicht vorhanden sind (Übersicht Suizidgen-Systeme in: Deonarain & Epenetos, 1994). Bislang am besten untersucht sind die Cytosin-Desaminase (CD) aus *Escherichia coli* (EC 3.5.4.1) und die Thymidin-Kinase (TK) aus Herpes simplex-Virus Typ-1 (HSV-1).

1.2.1 Cytosin-Desaminase (CD) aus *E.coli* und Thymidin-Kinase (TK) aus Herpes simplex-Virus Typ-1

Das **Cytosin-Desaminase** (CD)-Gen kommt in einer Vielzahl von Bakterien, Hefen und Pilzen vor, wird jedoch nicht in Säugetieren gefunden (Andersen *et al.* 1989). Auf Grund der spezifischen enzymatischen Funktion kann 5-Fluorcytosin (5-FC) in 5-Fluoruracil (5-FU) umgewandelt werden, welches ein gebräuchliches Chemotherapeutikum darstellt. Während 5-FU in der Chemotherapie relativ toxisch wirkt, ist 5-FC in der üblichen, z.B. zur Pilzbekämpfung verwandten Dosis für den Menschen weitgehend unschädlich (Bennett 1994). 5-Fluoruracil wird anschließend von zellulären Kinasen phosphoryliert, so dass das entstehende Triphosphat 5-Fluor-UTP einen Abbruch der RNA-Synthese verursacht. Gleichzeitig vermag 5-Fluor-dUMP als Antifolat-Agens das Enzym Thymidylat-Synthase zu hemmen, welches im *De novo*-Synthese-Weg der Desoxyribonukleotide die Methylierung von dUMP zu dTMP katalysiert. Damit wird per Cytosin-Desaminase/5-FC-Weg auch in die DNA-Synthese eingegriffen (siehe Abbildung 1.1).

Analoges gilt für die HSV-1 **Thymidin-Kinase** (McKnight 1980) (ATP: Thymidin-5-phosphotransferase; EC 2.7.1.21) und die entsprechende *prodrug* Ganciclovir (GCV). Im Gegensatz zu zellulären Kinasen wird das Guanosin-Analogon GCV spezifisch phos-

phoryliert und wirkt in der Triphosphat-Stufe inhibierend auf die Elongation der DNA-Synthese (Abbildung 1.1).

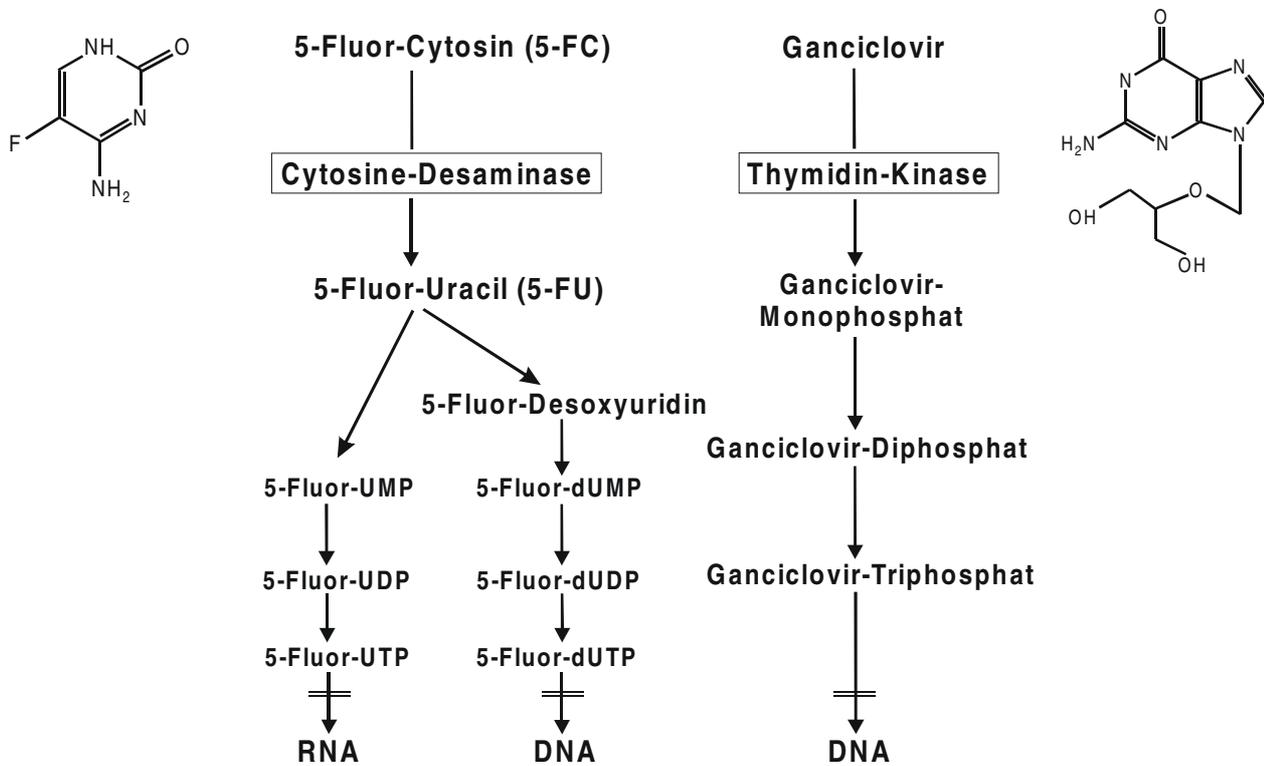


Abbildung 1.1: Prodrug-Toxifizierung durch die Suizidgenprodukte *E. coli* CD und HSV-1 TK.

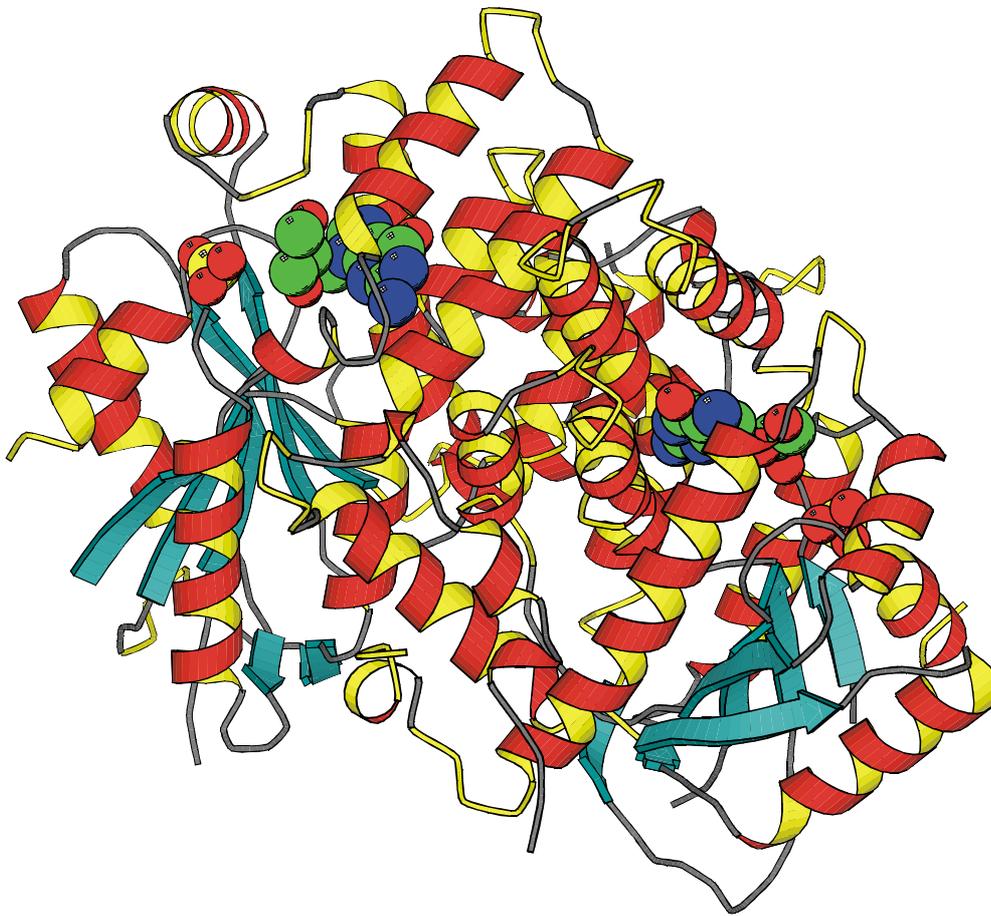


Abbildung 1.2: Kristallstruktur der HSV-1 Thymidin-Kinase.

Bei Deletion der N-terminalen 10 Aminosäuren (aa) kristallisiert das Enzym als Dimer und besteht aus 15 α -Helices und 7 β -Faltblatt-Strukturen. Das aktive Zentrum mit der Nucleosid-Substrat-Bindungstasche (aa 161-192 mit Arg163, Ala167, Tyr172 und Pro173 als hochkonservierte Positionen; GCV ist als Kugelmodell dargestellt) und der ATP-Nucleotid-Bindungsstelle (*strand-turn-helix*, aa 48-69) wird von 5 parallel angeordneten β -Faltblatt-Strukturen gebildet.

Cartoon in der *ribbon*-Darstellung; aus der *imb* Jena (*Image Library of Biological Macromolecules*): <http://www.imb-jena.de/cgi-bin/ImgLib.pl?CODE=1ki2>; *Thumbnail* generiert durch das Programm **RasMol**: Sayle, R. & Milner-White, E.J. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 374.

Berechnung der Kristallstruktur durch Champness *et al.* 1998; abgelegt in der Brookhaven Protein Data Bank #**1KI2**.

Die Kristallstruktur der Thymidin-Kinase aus HSV-1 zeigt im Komplex mit GCV als Substrat eine hohe Struktur-Homologie zu anderen Adenylat-Kinasen (siehe Abbildung 1.2; Brown *et al.* 1995; Champness *et al.* 1998).

Die antitumorale Wirkung von Suizidgenen wird durch den sog. *bystander effect* verstärkt. Darunter versteht man den Transport der in der transduzierten Zelle hergestellten toxifizierten Substanzen in die Nachbarzellen. So kann 5-FU, welches in CD-positiven Zellen produziert wurde, über einfache Diffusionsprozesse auch in benachbarte Tumorzellen gelangen (Domin *et al.* 1993) und dort ebenfalls wirksam werden (Lawrence *et al.* 1998; Trinh *et al.* 1995; Huber *et al.* 1994; Mullen *et al.* 1992). Wird dagegen Thymidin-Kinase als Suizidgen verwendet, treten phosphorylierte Zwischenprodukte auf, die nicht frei diffundieren können. Als Mechanismen des *bystander effects* der HSV-1 Thymidin-Kinase werden entweder eine Immunantwort des Wirtsorganismus oder Zell-Zell-Kommunikation postuliert. Dabei können zum einen die toxischen Metabolite über *gap junctions* transferiert werden (Bi *et al.* 1993). Zum anderen erfolgt ein Transport von GCV-Triphosphat, des TK-Enzyms oder durch Zelltod-Kaskaden gebildete Hydrolasen in apoptotischen Vesikeln (Freeman *et al.* 1993), welche dann direkt durch Membranfusion oder durch Phagozytose aufgenommen werden. Der Transport über *gap junctions* wurde in Zellkultur-Modellen als essenziell nachgewiesen, da Zelllinien die ohne Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation keine Toxizität gegenüber Nachbarzellen zeigten. Nach Transfektion von Transportkanal-Proteinen wie Connexin-43 wurde dagegen ein ausgeprägter *bystander effect* beobachtet (Dilber *et al.* 1997). Da jedoch in Tumoren *in vivo* die Expression dieser Verbindungskanäle oft aktiv herunterreguliert ist, treten je nach Tumorart unterschiedliche Ausmaße des *bystander effects* auf. So kann nicht endgültig abgeschätzt werden, welcher Anteil des *bystander effects* durch direkte Zell-Zell-Kontakte und welcher der systemischen Immunantwort zukommt. Insgesamt geht man davon aus, dass in Zellkultur apoptotische Mechanismen, *in vivo* dagegen Nekrose sowie inflammatorische und immunologische Reaktionen überwiegen (Mullen *et al.* 1998). Vorläufige Vergleiche der beiden Suizidgen-Strategien ergaben, dass das CD/5-FC-System sowohl in Zellkultur (Hoganson *et al.* 1996) als auch bei implantierten Tumoren (Trinh *et al.* 1995) effektiver als das TK/GCV-System war.

Anhand von Tiermodellen wurde bereits in verschiedenen präklinischen Studien gezeigt, dass die Metabolisierung von 5-FC durch die Cytosin-Desaminase eine Hemmung des Tumorwachstums bewirken kann (Uckert *et al.* 1998; Topf *et al.* 1998; Ge *et al.* 1997; Kanai *et al.* 1997; Ohwada *et al.* 1996; Trinh *et al.* 1995; Consalvo *et al.* 1995; Richards *et al.* 1995; Mullen *et al.* 1994; Huber *et al.* 1994; Huber *et al.* 1993). Unter optimalen Bedingungen kann *in vivo* bereits eine CD-Gentransfer-Effizienz von 5% zur Erzielung eines

signifikanten anti-Tumoreffektes ausreichen. Dies erklärt sich aus den hohen Mengen an 5-FU, die in CD-positiven Zellen produziert werden und die *per bystander effect* in benachbarte, nicht-transduzierte Tumorzellen gelangen und dort ebenfalls wirksam werden (Uckert *et al.* 1998; Dong *et al.* 1996; Hirschowitz *et al.* 1995; Huber *et al.* 1994). Die Verwendung von TK in retroviralen Vektoren oder Produzentenzellen zur Behandlung von Gehirntumoren ergab in klinischen Phase I-Studien einen kurzfristigen Rückgang der Tumormasse (Shand *et al.* 1999; Klatzmann *et al.* 1998; Ram *et al.* 1997; Izquierdo *et al.* 1996).

Es finden sich jedoch zahlreiche Fälle, bei denen die angestrebte Tumoreradikation fehlschlug bzw. die Tumore nach beendeter *prodrug*-Applikation ihr Wachstum wieder nahezu ungebremst aufnahmen (Cool *et al.* 1996; Hirschowitz *et al.* 1995; Richards *et al.* 1995; Mullen *et al.* 1994; Huber *et al.* 1993; Takamiya *et al.* 1993; Golumbek *et al.* 1992). Dies könnte auf eine ungünstige Pharmakokinetik, einen Verlust der Transgenexpression oder eine Resistenzentwicklung gegen die Toxifikationsprodukte zurückzuführen sein. Darüber hinaus wurde in den meisten präklinischen Studien die Gabe der *prodrugs* zu einem Zeitpunkt begonnen, zu dem die Tumoren noch ausgesprochen klein waren. Nach Injektion von hohen Dosen eines für HSV-1 TK kodierenden adenoviralen Vektors (Ad-TK) in Patienten mit pleuralen Mesotheliomen wurden dagegen keine Anzeichen eines Tumor-Rückgangs beobachtet (Serman *et al.* 1998).

In Tierversuchen ergaben sich in den verschiedenen Tumormodellen bei Einsatz verschiedener Vektorsysteme höchst unterschiedliche Gentransfer-Effizienzen. Bei Verwendung retroviraler Vektoren wurden in Lebertumoren Transduktionsraten von unter 2% beobachtet (Kay *et al.* 1994; Grossman *et al.* 1994). Obwohl Adenoviren auch ruhende Zellen infizieren können und damit prinzipiell höhere Effizienzen postuliert wurden, wurde das Transgen bei der höchsten jemals verwendeten Dosis von mehr als 10^{13} Partikeln im tragischen Todesfall des Patienten Gelsinger in weniger als 1% der adressierten Leberzellen detektiert. Bei derart niedrigen Transduktionsraten vermag auch der Transport der toxisierten *prodrugs* in die Nachbarzellen im Rahmen des *bystander effects* keinen messbaren additiven Effekt zu vermitteln.

Diese Beispiele belegen die unzureichende Effizienz der verfügbaren Gentherapie-Vektorsysteme und zeigen, dass der Entwicklung von alternativen Methoden zur Potenzierung des therapeutischen Suizidgen-Effektes eine zentrale Bedeutung für einen wirkungsvolleren Einsatz in der humanen Tumor-Gentherapie zukommt.

1.3 Interzellulärer Protein-Transport

1.3.1 Zellpermeable Peptide

In den letzten Jahren wurde eine ständig wachsende Zahl von Proteinen und Peptiden beschrieben, deren gerichteter Transport vom klassischen intrazellulären membran-gebundenen Transport abweicht. Für naszierende Proteine gilt der klassische Sekretionsweg vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat zur Exozytose oder zum Weitertransport innerhalb der Zelle mittels spezifischer Zielsequenzen. Für die Rezeptor-vermittelte Endozytose führt der Weg über das lyso-endosomale System. Neuartige, d.h. Golgi-unabhängige Sekretionswege, finden dagegen ohne klassische Signalsequenzen statt, wobei beträchtliche Unterschiede zwischen diesen nicht-klassischen Transportwegen bestehen (Übersichten in: Muesch *et al.* 1990; Kuchler & Thorner, 1990):

- Das **Tat**-Peptid aus HIV-1 ist ein 87 Aminosäuren (aa) großer Transaktivator, welcher die Zielzellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose betritt (Mann & Frankel, 1991) und nicht-klassischen Austransport zu den Nachbarzellen zeigt (Ensoli *et al.* 1993; Helland *et al.* 1991). Nach Aufnahme in die Zellen wird Tat jedoch spezifisch im Cytoplasma detektiert, obwohl ein Kernlokalisationssignal (NLS) vorliegt (Elliott & O'Hare 1997). Die transaktivierende Wirkung ist unter diesen Bedingungen sehr schwach (Ensoli *et al.* 1993). Die Translokation durch die Plasmamembran wird einer 11 aa umfassenden basischen *protein transduction domain* (PTD) zugeschrieben. Als Mechanismus wird die Ausbildung invertierter Micellen vermutet (Vives *et al.* 1997). Fluoreszein-markierte Fusionspeptide, bestehend aus der Tat-PTD und β -Galactosidase, konnten nach intraperitonealer Injektion in Mäuse in allen untersuchten Geweben, inklusive des Gehirns, detektiert werden (Schwarze *et al.* 1999).
- Der Austransport von **Fibroblasten-Wachstumsfaktoren** (FGFs) findet ebenfalls Golgi-unabhängig statt (Jackson *et al.* 1992). Die FGFs werden anschließend mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose wieder in die Zellen aufgenommen, was bislang jedoch nicht in Zellkultur nachvollzogen werden konnte (Cao *et al.* 1993; Cao & Pettersson, 1990). Mit der h-Region des *Kaposi Fibroblast Growth Factors* (K-FGF) wurde eine Peptidfamilie innerhalb der Signalsequenz beschrieben, die eine hohe Hydrophobizität aufweist (Rojas *et al.* 1998).

- Die nicht-klassische Aufnahme der DNA-bindenden **Homöo-Domäne** von **Antennapedia**, einem Transkriptionsfaktor aus *Drosophila* (Derossi *et al.* 1994; Joliot *et al.* 1991), und der davon abgeleiteten **Penetratine** (Derossi *et al.* 1998) bleibt nach exogener Zugabe auf einen Teil des Polypeptids beschränkt. Dabei wurde eine 16, hauptsächlich basische Aminosäuren umfassende amphiphile α -Helix (**pAntp**) als Vermittler der Internalisierung gefunden. Der Mechanismus des Eintransports erfolgt Energie- und Rezeptor-unabhängig und scheint über die Bildung von Dimeren zu funktionieren, so dass die basischen, positiv geladenen Reste mit den negativ geladenen Phospholipiden interagieren und mittels invertierter Micellen den Inhalt ins Zellinnere freisetzen. Das pAntp-Peptid wurde in verschiedenen Studien zum Transport anderer Peptide verwendet (Hildt & Oess, 1999; Schutze *et al.* 1996). Bislang liegen jedoch keine Anzeichen für eine nachfolgende Sekretion der Peptide vor.
- **Transportan** ist ein chemisch-synthetisiertes, chimäres 27 aa-Peptid, bestehend aus den 12 N-terminalen Aminosäuren des Neuropeptides Galanin und den 14 C-terminalen Aminosäuren von Mastoparan, welche durch einen Lysin-Rest verbunden sind (Pooga *et al.* 1998). Mastoparan kann sich mittels Ausbildung von kurzlebigen Poren durch Zellmembranen translozieren, wirkt jedoch bei hohen Konzentrationen cytotoxisch. Die zell-penetrierende Wirkung von Transportan geschieht Rezeptor- und Zelllinien-unabhängig und erreicht bereits nach 20 Minuten die maximale intrazelluläre Konzentration. Während dieser initialen Phase findet sich markiertes Transportan an der Plasmamembran und im Cytoplasma, nach einer Umverteilung sind anschließend präferentiell die Kernmembran und die Nukleoli angefärbt. Als Internalisierungs-Mechanismus wird wie bei den Penetrativen die Ausbildung invertierter Micellen diskutiert.
- Im Bereich der **PreS2-Region** des mittleren Oberflächenproteins (MHBs) des Hepatitis-B-Virus (HBV) wurde ein 11 aa umfassendes α -helikales Peptid-Motiv identifiziert. Die Peptide des *translocation motif* (**TLM**) können als amphiphile α -Helix dimerisieren und zum Transport von Proteinen eingesetzt werden (Oess & Hildt, 2000; Saher & Hildt, 1999). Dem interzellulären TLM-Transport liegt eine strenge Struktur-Funktionsbeziehung zugrunde: eine Zerstörung der α -helikalen Struktur unterbindet den Transport. Im Unterschied zu anderen zellpermeablen Peptiden weist das TLM keine Spezifität für bestimmte subzelluläre Strukturen oder Vesikel auf und wird im ganzen

Cytoplasma, nicht aber im Zellkern gefunden. Der Transportmechanismus ist Rezeptor- und Zelllinien-unabhängig und wurde sogar in Pflanzenzellen beobachtet. Im Tiermodell von Maus, Ratte und Kaninchen konnte nachgewiesen werden, dass Wildtyp-PreS2-Protein sich über mehrere Zellschichten hinweg anreichert (Saher & Hildt 1999).

1.3.2 VP22 aus Herpes simplex-Virus

Das Strukturprotein VP22 aus der Tegument-Region des Herpes simplex-Virus Typ-1 (HSV-1) wird durch das Gen UL49 kodiert (Elliott & Meredith 1992). Die Länge von 301 Aminosäuren entspricht einem Molekulargewicht von 38 KDa. In der infizierten Zelle wird VP22 durch Nukleotidylierung und Phosphorylierung modifiziert: während VP22 unphosphoryliert in die Virionen eingebaut wird, zeigen sich unterschiedliche Phosphorylierungsmuster während Infektion und Transfektion (Elliott *et al.* 1996; Leslie *et al.* 1996; Elliott *et al.* 1995). Die Relevanz und Funktion dieser Modifikationen innerhalb des Infektionszyklus sind bislang nicht verstanden.

VP22 zeigt einen neuartigen und ungewöhnlichen inter-zellulären Mechanismus des Protein-Transports auf: im Rahmen einer nicht-klassischen (also Golgi-unabhängigen) Sekretion wird VP22 aus der Zelle, in der das Protein synthetisiert wurde, exportiert und ist in der Lage, mit hoher Effizienz in die umgebenden Nachbarzellen einzuwandern. Dabei zeigt sich eine Zweiteilung der subzellulären Lokalisation: während VP22 in der Produzentenzelle hauptsächlich als filamentöses Muster im Cytoplasma gefunden wird, ist der Eintransport in die umgebenden Zellen zum Kern gerichtet, ohne dass bislang ein klassisches Kernlokalisierungssignal beschrieben wurde. Ausgehend von nur einer Produzentenzelle wird VP22 dabei in die Kerne von mehr als 500 benachbarten Zellen transportiert, wo es an Chromatin bindet und bei folgenden Zellteilungen auf neu entstandene Tochterzellen weitergegeben wird. Dadurch wird nach endogener Synthese in einer kleinen Subpopulation an Zellen eine Transfektions-Effizienz von nahezu 100% eines Monolayers erreicht (Elliott & O'Hare 1997). Der entstandene Gradient der Proteinmenge über bis zu 12 Zellschichten wird in der Immun-Fluoreszenzmikroskopie als *focus* (Plural: *foci*) bezeichnet.

Die Eigenschaft des inter-zellulären Protein-Transports (*spread*) wird dabei nicht nur beim Wildtyp-VP22-Protein nach Transfektion, Mikroinjektion und Virus-Infektion mit Replikations-defizienten Viren beobachtet, sondern auch bei Verwendung von VP22-Fusionsproteinen. Dies konnte bislang mit den Modell-Fusionen *Green fluorescent protein*

(GFP) (Elliott & O'Hare 1998), p53 (Phelan *et al.* 1998) und HSV-1 Thymidin-Kinase (Dilber *et al.* 1999) nach Transfektion in kultivierte Säugerzellen gezeigt werden. Darüber hinaus wurde nach Zugabe von Lysaten aus VP22-produzierenden Zellen ins Kulturmedium das Protein bereits nach 5 Minuten in allen Zellen detektiert. Da die beschriebenen Transportprozesse auch bei 4°C stattfinden, kann Rezeptor-vermittelte Endozytose als Mechanismus ausgeschlossen werden (Elliott & O'Hare 1997). Der Aufnahmeweg scheint über das Aktin-Zytoskelett zu funktionieren, während Ein- und Austransport Golgi-unabhängig stattfinden. In der Produzentenzelle bindet VP22 an Mikrotubuli und stabilisiert diese dadurch (Elliott & O'Hare 1998), was das filamentöse Muster der cytoplasmatischen Anfärbung erklärt. Die biologische Funktion dieser Stabilisierung und des Transports in die Nachbarzellen sind nicht bekannt. Da VP22 während einer Infektion mit Herpes simplex-Viren bereits nach vier Stunden detektiert werden kann, wird spekuliert, dass VP22 die nachfolgende Infektion in den Zellkernen der benachbarten Zellen durch bislang noch unbekannte Mechanismen vorbereitet.

Durch Experimente mit Trunktations-Mutanten konnten die heterogenen Funktionen von VP22 auf verschiedene Domänen grob lokalisiert werden (siehe Abbildung 1.3). Eine Deletion der C-terminalen 134 Aminosäuren führt zum Ausbleiben des inter-zellulären Protein-Transports (*spread*) (Elliott and O'Hare 1997), während der N-Terminus für die Kernlokalisation in den Nachbarzellen verantwortlich ist. Die mittleren Bereiche des Proteins dienen der Bindung an die Mikrotubuli (MT-Bindung) und der Retention im Cytoplasma.

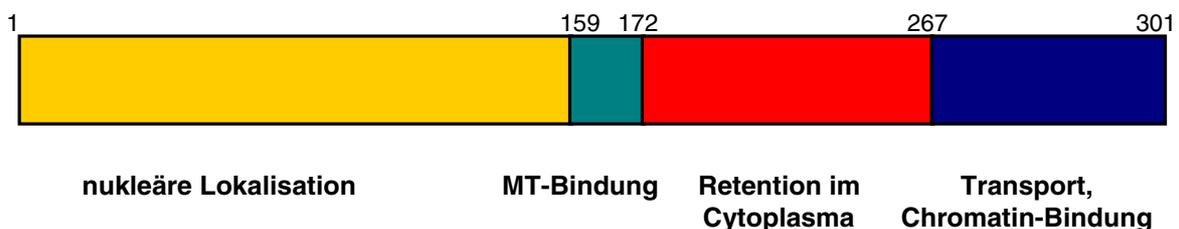


Abbildung 1.3: Domänenstruktur von HSV-1 VP22.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Bei den bisherigen gentherapeutischen klinischen Studien an Patienten erwies sich die mangelnde Transduktionseffizienz als größte Schwierigkeit eines therapeutischen Erfolges. Bei den bisher erreichten Effizienzen von ca. 1% der adressierten Zielzellen kommen die angestrebten therapeutischen Effekte nicht zur Wirkung; im Falle der Suizidgentherapie ist ein *bystander effect* nicht additiv messbar.

Im Mittelpunkt der hier dargestellten Arbeiten stand das Ziel, die limitierten primären Transduktionsraten der Gentransfer-Vektoren *in vivo* durch Ausnutzung der interzellulären Transporteigenschaften von VP22-Suizidgen-Fusionsproteinen zu verbessern.

Im Einzelnen sollte untersucht werden

- ob der VP22-Transport ein generelles biologisches Phänomen, unabhängig von den adressierten biologischen Systemen und Geweben, darstellt,
- ob chimäre VP22-Suizidgen-Fusionen (bestehend aus Fusionen der Suizidgene *E. coli* CD bzw. HSV-1 TK mit HSV-1 VP22), ebenfalls einen hocheffizienten interzellulären Transport – wie VP22 alleine – bewirken können,
- ob die Suizidgen-Wirkung von CD und TK nach retroviral bzw. adenoviral vermittelter Expression von VP22-Suizidgen-Fusionen verbessert werden kann.

2 Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Chemikalien von Merck. Alle Chemikalien hatten mindestens den Reinheitsgrad „zur Analyse, ACS“; sofern erhältlich, wurde der Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“ bzw. „für die Zellkultur“ verwendet.

Der Begriff „ddH₂O“ wird im folgenden für bidestilliertes Wasser verwendet, das über eine Milli-Q-Plus Filtrieranlage (Millipore) gereinigt wurde.

Als „steril“ oder „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien wurden für 20 min bei 120°C und 2 bar Überdruck autoklaviert (Stand-Autoklav FVD 3, Fedegari).

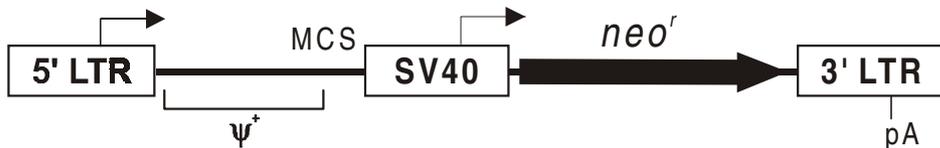
Als „sterilfiltriert“ bezeichnete Lösungen wurden durch ein 0,22 µm Filter (Millex-GS, Millipore, oder Falcon Bottle Top Filter, Becton Dickinson) filtriert.

2.1 Molekularbiologische Materialien und Methoden

Grundlage für die folgenden Arbeitsvorschriften stellen die entsprechenden Abschnitte aus Sambrook *et al.* (1989) bzw. Ausubel (1989) dar. Modifikationen dieser Protokolle folgten den Empfehlungen der Hersteller.

2.1.1 Verwendete Plasmide

2.1.1.1 pLXSN



Retroviraler Basis-Vektor (Miller & Rosman 1989), abgeleitet vom *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMLV) bei Deletion der viralen Strukturgene. Wichtige Komponenten:

- **5'-Hybrid- und 3'-LTR:** der 5'-LTR setzt sich aus Sequenzen des *Moloney Murine Sarcoma Virus* (MoMSV) und des MoMLV zusammen; die U3-Region wirkt als Promotor (Pfeil), die R-Region als polyA-Signal.
- **Verpackungssignal Ψ⁺:** ermöglicht Verpackung des retroviralen Transkripts zu Retrovirus-Partikeln durch Verpackungszelllinien.
- **multiple Klonierungs-Stelle (MCS: multiple cloning site)** mit singulären Schnittstellen zum Einfügen des zu transferierenden Gens.
- **Neomycin-Resistenzgen** (Aminoglycosid-Phosphotransferase des Transposons Tn5; Neo^r): dient als Selektionsmarker; vermittelt Resistenz gegen Neomycin und G418 (Geneticin); hier unter der Kontrolle des Simian Virus 40-Promotors (SV40).
- **pBR322-Sequenzen**, die einen bakteriellen „Origin of Replication“ (ORI) und das β-Lactamase-Gen (Ampicillin-Resistenz; Amp^r) enthalten und so die Propagation in *E. coli* ermöglichen (nicht in der Darstellung gezeigt).

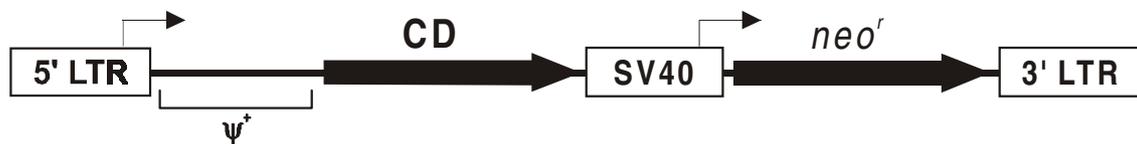
2.1.1.2 pWZLneo



Retroviraler Basis-Vektor (Rogulski *et al.* 1997), abgeleitet von den retroviralen pBabe-Vektoren (Morgens-tern & Land 1990), bei Deletion der viralen Strukturgene. Gleiche Vektorkomponenten wie pLXSN (s. 2.1.1.1) mit folgenden Unterschieden:

- **IRES**: *internal ribosomal entry site* aus EMCV (Encephalo-Myocarditis-Virus); ermöglicht die Bindung eukaryontischer Ribosomen an das monocistronische mRNA-Transkript und somit die Expression eines zweiten Gens ohne zusätzlichen Promotor.
- bakterielle Sequenzen aus **pBluescript**: enthalten **ORI** und Ampicillin-Resistenz-Gen (**Amp^r**) (nicht in der Darstellung gezeigt).

2.1.1.3 pCD2



Retroviraler Vektor, abgeleitet vom Basis-Vektor pLXSN (s. 2.1.1.1) durch Insertion des *E. coli* **Cytosin-Desaminase** (CD)-Gens (Mullen *et al.* 1992). Zusätzlich wurde der bakterielle Start-Codon GTG durch die für die Expression in Säugerzellen optimierte Kozak-Startsequenz CCACCATG(G) ersetzt (Kozak 1986), siehe auch 3.1.1.

2.1.1.4 pHSV106



Klonierungs-Vektor, der 3.6 kb Sequenzen aus Herpes simplex-Virus Typ-1 (HSV-1) enthält (dicke schwarze Linie), die das **Thymidin-Kinase** (TK)-Gen flankieren (Life Technologies). Entstanden durch Insertion eines HSV-1-Fragments in pBR322, das einen ORI (nicht in der Darstellung gezeigt) und das Ampicillin-Resistenz-Gen (**Amp^r**) enthält und so die Propagation in *E. coli* ermöglicht. Die kodierende Sequenz der HSV-1 TK kann durch gleichzeitigen Verdau mit *Bgl*II und *Pvu*II herausgelöst werden (s. 3.1.2).

2.1.1.5 pcDNA3



Genereller Klonierungs-Vektor für die Expression in Säugerzellen (Invitrogen). Wichtige Komponenten:

- **hCMV-Promotor**: „*immediate early*“-Promotor des humanen Cytomegalie-Virus (hCMV).
- multiple Klonierungs-Stelle (**MCS**: *multiple cloning site*) mit singulären Schnittstellen zum Einfügen des zu transferierenden Gens.
- Polyadenylierungs-Signal des Rinder-Wachstums-Hormons (*bovine growth hormone*, **BGH**).
- **SV40-Enhancer/Promotor**: gekoppeltes Enhancer/Promotor-Fragment aus Simian Virus 40.
- **Neomycin-Resistenzgen** (Aminoglycosid-Phosphotransferase des Transposons Tn5; **Neo^r**): dient als Selektionsmarker; vermittelt Resistenz gegen Neomycin und G418 (Geneticin).

- Polyadenylierungs-Signal aus Simian Virus 40 (**SV40-pA**).
- bakterielle pUC19-Sequenzen: enthalten ORI (nicht gezeigt) und Ampicillin-Resistenz-Gen (**Amp^r**).

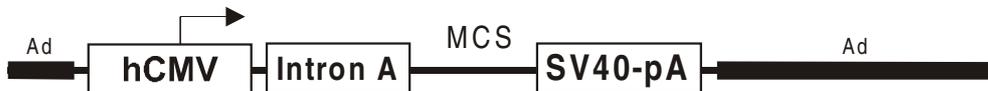
2.1.1.6 pTG3602



Das Plasmid pTG3602 (Transgene; Chartier *et al.* 1996) enthält neben dem vollständigen Genom (nicht maßstäblich dargestellt, Unterbrechung durch Schrägstriche angezeigt) von Adenovirus, Serotyp 5 (**Ad5**) das Ampicillin-Resistenz-Gen (**Amp^r**) sowie einen bakteriellen ORI (nicht gezeigt); wird als Genom-Plasmid zur homologen Rekombination bei der Herstellung rekombinanter Adenoviren zusammen mit Transfer-Plasmiden (z.B. pTG6600, pTG8347, siehe unten) verwendet. Durch Verdau mit *ClaI* wird das Plasmid zur Rekombination linearisiert, ein *PacI*-Verdau setzt dagegen die adenoviralen Sequenzen vor der Transfektion in 293-Zellen frei (s. 2.3.1.1).

2.1.1.7 pTG6600

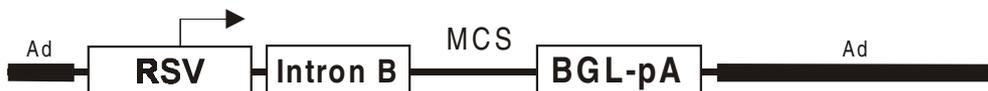
Für die Herstellung adenoviraler Vektoren mittels homologer Rekombination in *E. coli* wurden die Plasmide pTG6600 und pTG8347 (Transgene; Chartier *et al.* 1996) als Basisstrukturen verwendet. Diese Vektoren enthalten stromaufwärts und stromabwärts der Expressionskassette adenovirale Sequenzen, die den E1-Bereich umgeben. Bei gleichzeitiger Transfektion des Plasmids pTG3602, welches das vollständige adenovirale Genom enthält (siehe oben), entsteht durch homologe Rekombination ein Konstrukt, das anstatt des E1-Bereichs die Expressionskassette des gewünschten Transgens enthält. Die zur Herstellung adenoviraler Partikel notwendigen E1-Genprodukte werden anschließend von der 293-Zelllinie zur Verfügung gestellt.



Adenoviraler Basis-Vektor (Transgene; Chartier *et al.* 1996). Wichtige Komponenten:

- **Ad**: adenovirale Sequenzen, die den E1-Bereich umgeben.
- **hMCV-Promotor**: „immediate early“-Promotor des humanen Cytomegalie-Virus (hCMV).
- **chimäres Intron** aus humanem β -Globin (BGL) und Immunglobulin G (IgG) der Maus.
- multiple Klonierungs-Stelle (**MCS**: *multiple cloning site*) mit singulären Schnittstellen zum Einfügen des zu transferierenden Gens.
- Polyadenylierungs-Signal aus Simian Virus 40 (**SV40-pA**).
- bakterielle pUC19-Sequenzen: enthalten ORI und Ampicillin-Resistenz-Gen (**Amp^r**) (beide nicht gezeigt).

2.1.1.8 pTG8347



Die adenoviralen Rekombinationsplasmide pTG6600 und pTG8347 (Transgene; Chartier *et al.* 1996) unterscheiden sich nur im folgenden Elementen:

- **RSV-Promotor**: LTR-Promotor aus *Rous Sarcoma Virus* (**RSV**).
- **Intron** des β -Globin-Gens (BGL) des Kaninchens.
- Polyadenylierungs-Signal des β -Globin-Gens (BGL) des Kaninchens (**BGL-pA**).

2.1.2 Verwendete Bakterienstämme

- ***E. coli* XL1-Blue** (Stratagene):
Genotyp: *RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacZΔ M15 Tn10*(Tet^r)];
Einsatz: generelle Klonierung; verbesserte Ausbeute und Qualität der DNA durch endA1-Mutation.
- ***E. coli* JM110** (Stratagene):
Genotyp: *RpsL* (Str^r) *thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44Δ (lac-proAB)* [F'*traD36 proAB lacZΔ M15*];
Einsatz: Klonierung unmethylierter DNA (Mutation der Adenin- und Cytosin-Methylase-Gene).
- ***E. coli* BJ5183** (Transgene):
Genotyp: *EndA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR* (Str^r).
Einsatz: homologe Rekombination; sbcBC-Mutation betrifft die Exonuclease I.

2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Vermehrung rekombinanter Plasmide erfolgt in *E. coli*-Zellen. Es existieren verschiedene Methoden, um *E. coli*-Bakterien für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bakterien für Transformationen entweder bereits kompetent vom Hersteller bezogen (siehe 2.1.2), oder mit Hilfe der FSB-Methode nach Hanahan (1983) kompetent gemacht:

Materialien:

- **FSB-Transformationspuffer:**
10 mM CH₃COOK
100 mM KCl
45 mM MnCl₂·4H₂O
10 mM CaCl₂·2H₂O
3 mM Co(NH₃)₆Cl₃;
pH-Wert mit 0,1 M HCl auf 6,4 einstellen, anschließend sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern.
- **DMSO** (Sigma-Aldrich)
- **SOB-Medium:**
10 g Select-Pepton (Life Technologies)
2,5 g Hefe-Extrakt (Life Technologies)
295 mg NaCl
95 mg KCl;
in ddH₂O lösen, pH mit 1 M HCl auf 6,8-7,0 einstellen, auf 490 ml auffüllen und autoklavieren;
nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C noch 10 ml 1 M MgSO₄-Lösung (s. u.) zusetzen.
- **1 M MgSO₄-Lösung, steril:**
250 g MgSO₄·6H₂O unter Erwärmen in ddH₂O lösen, Volumen auf 125 ml einstellen und sterilfiltrieren.
- **SOB-Platten** (ohne Antibiotikum):
10 g Select-Pepton (Life Technologies)
2,5 g Hefe-Extrakt (Life Technologies)
295 mg NaCl
95 mg KCl
in ddH₂O lösen, pH mit 1 M HCl auf 6,8-7,0 einstellen; 7,5 g Bacto-Agar (Life Technologies) zugeben,
auf 490 ml auffüllen und autoklavieren; nach Abkühlen auf ca. 60 °C noch 10 ml 1 M MgSO₄-Lösung
(s. o.) zusetzen; fertige SOB-Lösung sofort in Petrischalen (Greiner Labortechnik) gießen.

Durchführung:

- 50 µl einer Glycerolkultur eines *E. coli*-Stammes auf einer SOB-Platte so ausstreichen, dass Einzelkolonien erhalten werden
- am nächsten Tag mit einer Einzelkolonie 1 ml SOB-Medium animpfen
- mit dieser Kultur 100 ml SOB-Medium beimpfen und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 anziehen
Kultur in vorgekühlte 50 ml Falcon Polypropylenröhrchen überführen, für 10 min auf Eis inkubieren
- Bakterien für 10 min mit 3400 x g (Heraeus Megafuge 2.0 R mit Ausschwingrotor 8250) bei 4 °C abzentrifugieren und Überstand vollständig dekantieren

- Bakterienpellet vorsichtig in 20 ml eiskalter FSB-Lösung (je Falcon-Röhrchen) resuspendieren, für 10 min auf Eis inkubieren
- Bakterien erneut zentrifugieren (s. o.), Überstand vollständig entfernen und in 4 ml eiskalter FSB-Lösung (je Falcon-Röhrchen) resuspendieren
- resuspendierte Bakterien vorsichtig mit je 140 µl DMSO mischen und für 15 min auf Eis inkubieren; anschließend weitere 140 µl DMSO zugeben, vorsichtig mischen, und auf Eis zurückstellen; sofort in vorgekühlte, sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotieren (je 200 µl), bei -80 °C lagern

2.1.4 Transformation von *Escherichia coli*

Materialien:

- **SOC-Medium:**
2 g Select-Pepton
500 mg Hefe-Extrakt
59 mg NaCl
19 mg KCl
in ddH₂O lösen, pH mit 1 M HCl auf 6,8-7,0 einstellen, auf 97 ml auffüllen und autoklavieren; nach Abkühlen auf ca. 60 °C noch 2 ml MgSO₄-Lösung (s. u.) und 1 ml Glucose-Lösung (s. u.) zusetzen.
- **1 M MgSO₄-Lösung, steril:**
250 g MgSO₄·6H₂O unter Erwärmen in ddH₂O lösen, Volumen auf 125 ml einstellen und sterilfiltrieren.
- **2 M Glucose:**
36 g Glucose in ddH₂O lösen, Volumen auf 100 ml einstellen, sterilfiltrieren.
- **Ampicillin-Lösung (25 mg/ml)** zur Selektion:
10 g Ampicillin-Natriumsalz (Sigma) in 400 ml ddH₂O lösen, sterilfiltrieren und aliquotieren; Vorratslösung bei -20 °C, Gebrauchslösung bei 4 °C aufbewahren.
- **LB-Platten mit Antibiotikum** (100 µg/ml Ampicillin) zur Selektion:
10 g Bacto-Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
in ddH₂O lösen, pH mit 5 M NaOH auf 7,5 einstellen; 15 g Bacto-Agar zugeben, auf 1 l auffüllen und autoklavieren; nach Abkühlen auf ca. 60 °C noch 4 ml Ampicillin-Lösung zugeben

Durchführung:

- bei -80°C gelagerte kompetente Zellen kurz vor der Verwendung auf Eis auftauen und in vorgekühlte 15 ml Falcon-Polypropylenröhrchen (Becton Dickinson) zu 100 µl aliquotieren
- DNA zugeben (25-250 ng Ligationsansatz oder 0,1-1 ng Plasmid-DNA), vorsichtig mischen
- Ansätze 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock: 45 sec im 42°C-Wasserbad (ohne Schütteln)
- Ansätze 2 min auf Eis abkühlen
- mit 900 µl SOC-Medium versetzen und 60 min bei 37°C und 225 Upm im Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific) inkubieren
- je 100 µl der Transformationansätze auf LB-Agarplatten, die das geeignete Selektions-Antibiotikum enthalten, ausstreichen (10%-Platte)
- die verbleibenden 900 µl der Ansätze für 2 min mit 2000 g (Heraeus Megafuge 2.0 R mit Ausschwingrotor) zentrifugieren, Überstand verwerfen, Bakterien-Sediment in je 100 µl SOC-Medium resuspendieren und ebenfalls auf LB-Agarplatten ausstreichen (90%-Platte)
- LB-Platten über Nacht bei 37 °C inkubieren (Heraeus-Inkubator VT 5042)

2.1.5 Anlegen von Glycerolkulturen

Zur Aufbewahrung von Bakterien über längere Zeiträume müssen Dauerkulturen angelegt werden. In Glycerol-haltigem Medium lassen sich Bakterien bei tiefen Temperaturen praktisch unbegrenzt lange lagern, ohne ihre Vitalität zu verlieren.

Durchführung:

- je 850 µl Bakterienkultur mit 150 µl sterilem Glycerol mischen, in sterilen 1.5 ml Reaktionsgefäßen bei -20 °C aufbewahren sowie bei -70°C als Dauerkultur lagern
- zum Animpfen mit einer Impföse einen kleinen Teil der gefrorenen Glycerolkultur abnehmen und in das gewünschte Medium überführen oder auf einer Agarplatte austreichen.

Um eine hohe Zelldichte in den Glycerolkulturen zu erreichen, empfiehlt es sich, zunächst ein Aliquot einer 7 ml LB-Amp-Kultur in eine 50 ml LB-Amp-Kultur anzupfen und bei Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} : 0.5-0.6) die Zellen abzuzentrifugieren und in einem kleineren Volumen (ca. 10 ml) LB-Amp-Medium aufzunehmen, um daraus Glycerolkulturen herzustellen.

2.1.6 Plasmidpräparationen

Allen im folgenden beschriebenen Methoden liegt dasselbe Prinzip zugrunde: nach Anzucht im geeigneten Selektionsmedium werden die Bakterien, die das gewünschte Plasmid enthalten, durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und einer alkalischen Lyse mit NaOH/SDS unterworfen (Birnboim 1983). Dies führt zum Platzen der Zellen und zur Denaturierung der bakteriellen Proteine. Sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA werden freigesetzt und ebenfalls denaturiert. Anschließend erfolgt die Neutralisierung des alkalischen Lysats unter Hochsalzbedingungen. Hierbei renaturiert die Plasmid-DNA, während alle anderen makromolekularen Komponenten als Präzipitat ausfallen.

2.1.6.1 Mini-Präparation zur Charakterisierung transformierter Bakterien

Die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly ist eine zuverlässige, jedoch arbeits- und zeitaufwendige Standardmethode. Zudem tritt durch die Verwendung von Phenol und Chloroform eine ökologische Belastung in Form von organischen Lösungsmitteln auf. Als verlässliche Schnellmethode hat sich eine Kurzform der alkalischen Lyse herausgestellt, die nach Fällung und Renaturierung mit den üblichen Puffern P1 bis P3 auf organische Extraktion verzichtet und gleich die Fällung der DNA mit Isopropanol (Volumenvorteil gegenüber Ethanol: 0,7 Vol. zu 2,5 Vol.) anschließt. Die Reinheit der so gewonnenen Plasmid-DNA ist für Restriktionsanalysen ausreichend.

Materialien:

- **Resuspendierungspuffer P1** (Qiagen):
50 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A, pH 8,0
- **Lysepuffer P2** (Qiagen):
200 mM NaOH
1 % SDS
- **Neutralisierungspuffer P3** (Qiagen):
3 M Kaliumacetat, pH 5,5
- **LB-Medium mit Selektions-Antibiotikum** (50 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin):
10 g Select-Pepton 140 (Life Technologies)
5 g Select Hefe-Extrakt (Life Technologies)
10 g NaCl
in 950 ml ddH₂O lösen und pH mit 5 M NaOH auf 7.0 einstellen;
auf 1 l auffüllen und autoklavieren;
nach Abkühlen auf ca. 60°C 2 ml Ampicillin-Stammlösung oder 2.5 ml Kanamycinsulfat-Stammlösung zusetzen, so dass die Konzentration an Antibiotikum 50 µg Ampicillin pro ml Medium bzw. 25 µg Kanamycinsulfat pro ml Medium beträgt
- **Ampicillin-Lösung (25 mg/ml)** zur Selektion (siehe 2.1.4)
- **Kanamycin-Lösung (10 mg/ml)** zur Selektion:
5 g Kanamycinsulfat (Sigma) in 500 ml ddH₂O lösen, sterilfiltrieren und aliquotieren;
Vorratslösung bei -20 °C, Gebrauchslösung bei 4 °C aufbewahren;
Endkonzentration im Medium ist 25 µg/ml (400-fache Stammlösung), bei Platten 50 µg/ml (200-fach).
- **Ethanol, 100 %**
- **Ethanol, 70 % (w/v)**

Durchführung:

- je 7 ml LB-Medium, die das geeignete Selektions-Antibiotikum enthalten, mit Einzelkolonie animpfen
- Kulturen über Nacht bei 37°C mit 225 Upm im Bakterienschüttler inkubieren
- je 1.5 ml der ÜNK in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen, 5 min mit 1500 x g (ca. 4000 Upm) bei 4°C (Heraeus Biofuge 15 R mit Winkelrotor HFA 14.2) zentrifugieren
- Überstand absaugen und Bakterien-Sedimente in je 200 µl P1 resuspendieren
- je 200 µl P2 zugeben, mischen und für (maximal) 5 min bei RT inkubieren
- je 200 µl P3 zugeben, schnell und gründlich mischen und für 10 min auf Eis inkubieren
- 10 min mit 18000 x g (ca. 14000 Upm) bei 4°C zentrifugieren
- Überstände vorsichtig in frische 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen, zur Fällung der DNA mit je 450 µl (0.7 Vol.) Isopropanol versetzen, 20 min mit 18000 x g (ca. 14000 Upm) bei 4°C zentrifugieren
- Überstand absaugen, je 500 µl kaltes 70% Ethanol zugeben (Salzentfernung) und für 5 min mit 18000 x g (ca. 14000 Upm) bei 4°C zentrifugieren
- Überstand absaugen, gefällte DNA 5 min bei 37°C (Wärmeblock) inkubieren, abschließend DNA in je 20 µl ddH₂O lösen

2.1.6.2 Maxi-Präparation zur Plasmidgewinnung

Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe einer Anionen-Austauschersäule (Qiagen). Auf Grund der hohen Ladungsdichte des Säulenmaterials kann doppelsträngige Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen bei neutralem bis schwach alkalischem pH-Wert selektiv eluiert werden.

Materialien:

- **LB-Medium mit Selektions-Antibiotikum** (siehe 2.1.6.1)
- **Anionenaustauscher-Säulen Qiagen-tip 500**
- **Äquilibriumspuffer QBT** (Qiagen):
750 mM NaCl
50 mM MOPS; pH 7,0
15% Ethanol
0,15% Triton X-100
- **Waschpuffer QC** (Qiagen):
1 M NaCl
50 mM MOPS; pH 7,0
15% Ethanol
- **Elutionspuffer QF** (Qiagen):
1,25 M NaCl
50 mM Tris-HCl; pH 8,5
15% Ethanol
- **Isopropanol**
- **Ethanol, 70 % (w/v)**

Durchführung:

- 250 ml LB-Medium incl. Selektions-Antibiotikum mit 250 µl ÜNK oder Glycerolkultur animpfen und über Nacht bei 37°C mit 225 Upm im Bakterienschüttler inkubieren
- ÜNK für 20 min mit 3400 x g (4000 Upm) bei 4°C zentrifugieren (Heraeus Megafuge 2.0 R)
- Bakterien-Sediment in 10 ml P1 resuspendieren
- 10 ml P2 zusetzen, mischen und für (maximal) 5 min bei RT inkubieren
- 10 ml P3 zusetzen, mischen und für 20 min auf Eis inkubieren
- 30 min mit 28000 x g (13000 Upm) bei 4°C zentrifugieren (Heraeus Suprafuge 22 mit Ausschwingrotor HSA 13.94)
- Überstand in neue Zentrifugationsröhrchen überführen und erneut zentrifugieren
- Überstand durch ein Stück Gaze auf eine mit 10 ml QBT äquilibrierte Qiagen-tip 500-Säule auftragen
- Säule mit 2 x 30 ml QC waschen
- Elution mit 15 ml QF
- Fällung der DNA durch Zusatz von 0.7 Volumeneinheiten Isopropanol (hier: 10,4 ml)
- Sedimentieren der DNA durch Zentrifugation für 30 min mit 28000 x g bei 4°C

- Überstand absaugen;
Sediment mit 5 ml 70% Ethanol zur Salzentfernung versetzen
und für 15 min mit 2800 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand absaugen;
gefällte DNA für 10 min bei RT inkubieren, um Ethanolreste verdunsten zu lassen;
anschließend DNA in 200 µl sterilem ddH₂O lösen
- 1.5 µl der DNA-Lösung mit 148.5 µl ddH₂O versetzen und DNA-Gehalt spektrometrisch bestimmen
(Doppelbestimmung), siehe 2.1.7

2.1.7 Spektrometrische Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration wird die Absorption der heterocyclischen aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidin-Basen im Bereich von 260 nm ausgenutzt. Doppelstrang-DNA, Einzelstrang-DNA und Einzelstrang-Oligonucleotide besitzen infolge des unterschiedlichen Ausmaßes der Basenstapelung verschiedene Extinktionskoeffizienten. Eine Extinktion von 1 entspricht bei Doppelstrang-DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml, bei Einzelstrang-DNA ca. 40 µg/ml und bei Einzelstrang-Oligonucleotiden ca. 20 µg/ml. Die Messlösung muß mindestens 250 ng/ml DNA enthalten. Ein Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA-Lösung ist eine zweite Extinktionsmessung bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Reste von Proteinen. Gereinigte DNA-Lösungen sollten ein E₂₆₀/E₂₈₀-Verhältnis im Bereich von 1,8 bis 2,0 aufweisen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin.¹

Grundsätzlich sollte beachtet werden, dass die von Warburg entwickelte Methode der E₂₆₀/E₂₈₀-Messung ursprünglich für die Detektion von DNA-Kontaminationen in Protein-Präparationen gedacht war und der Umkehrschluß nicht unbedingt genaue qualitative Aussagen zuläßt. So entspricht z.B. ein E₂₆₀/E₂₈₀-Wert von 1,81, der im allgemeinen als zufriedenstellender Reinheitswert der DNA angesehen wird, einem Nukleinsäure zu Protein-Verhältnis von 40 : 60 (Glasel, 1995; Warburg *et al.*, 1942). Alternativen zur E₂₆₀/E₂₈₀-Methode existieren, sind jedoch mit unverhältnismäßigen Rechenaufwand verbunden und somit nicht sehr zweckmäßig.

Durchführung:

- die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit einem programmierbaren Einkanal-UV-VIS-Spektrophotometer (Beckman DU-640) in einer Vierfach-Mikroküvette aus Quarzglas (Beckman Instruments)
- Leerwertbestimmung und Küvettenabgleich: Extinktionswerte von 4x150 µl ddH₂O bei 260 nm und 280 nm messen, die Meßwerte der ersten Kammer als Nullpunkt setzen und die übrigen Werte zum Abgleich auf den Nullpunkt verwenden
- je 1,5 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung mit ddH₂O auf 150 µl auffüllen und in die Kammern 2 - 4 der Küvette überführen; in der ersten Kammer die Wasserprobe als Referenzwert belassen
- Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm in allen vier Kammern: das Messergebnis wird vom Gerät sowohl als Absorption bzw. Absorptionsverhältnis als auch als Konzentration in µg/µl ausgegeben, wobei die 100x-Verdünnung der Mess-Lösungen bereits berücksichtigt ist

2.1.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristisch sind. Sie erzeugen dabei entweder 5'- oder 3'-überhängende Enden einzelsträngiger DNA (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Je nach Enzym variiert die Pufferzusammensetzung und Temperatur, bei der die Reaktion optimal (bezüglich Spezifität und Geschwindigkeit) abläuft. Die verwendeten Restriktionsendonucleasen, einschließlich der zugehörigen Reaktions-Puffer, stammten von den Firmen Roche Diagnostics oder New England Biolabs.

Sofern nicht anders vermerkt, werden analytische Verdaue mit 0,2-1 µg DNA im Gesamtvolumen von 10 µl (incl. 5-10 U Restriktionsenzym) für 2 h bei 37°C durchgeführt. Beim präparativen Verdau soll die DNA vollständig geschnitten werden. Dies erreicht man durch einen Überschuß des Restriktionsenzym (40-100 U) sowie eine längere Inkubationsdauer (12 h).

¹ Es ist weiterhin zu beachten, dass das E₂₆₀/E₂₈₀-Verhältnis auch pH-abhängig ist. Bei Resuspendierung gereinigter DNA in TE-Puffer (pH 7,5) erhält man in aller Regel die oben genannten Werte. Wird dagegen reines ddH₂O (pH < 7,0) verwendet, so erhält man etwas kleinere Werte, die zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

2.1.9 Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA

Zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppen linearer DNA wird alkalische Phosphatase aus *Pandalus borealis*, einer Tiefseegarnelenart, verwendet (**SAP** = *shrimp alkaline phosphatase*). Zur Inaktivierung der SAP wird der Ansatz erhitzt und die Phosphatasen vollständig durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt.

Materialien:

- **SAP**, 1 U/μl (Amersham Pharmacia Biotech) in:
25 mM Tris-HCl, pH 7.5
1 mM MgCl₂
0,1 mM ZnCl₂
50% Glycerol
- **10x Dephosphorylierungspuffer** (Amersham Pharmacia Biotech):
200 mM Tris-HCl, pH 8.0
100 mM MgCl₂

Durchführung:

- Reaktionsansatz mit 1/10 Volumen Dephosphorylierungspuffer und der erforderlichen Menge SAP versetzen; hierbei ist 1 U ausreichend für 10 pmol überhängender 5'-Enden, 2 pmol überhängender 3'-Enden und 5 pmol glatter Enden; es gilt folgende Formel:

$$\frac{2 \times 10^6}{660 \times \text{Anzahl bp}} = \frac{\text{pmol Enden}}{\mu\text{g ds linearer DNA}}$$

- Dephosphorylierung für 1.5 h bei 37°C
- SAP 15 min bei 65°C inaktivieren
- anschließend Phenol/Chloroform-Extraktion, Fällung mit EtOH und Aufnahme des Pellets in der gewünschten Menge ddH₂O (s. 2.1.15.2)

2.1.10 Glätten überhängender Enden von doppelsträngiger DNA

Beim Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen können Enden mit 5'-Überhang und Enden mit 3'-Überhang entstehen, die nicht zueinander kompatibel sind. Bei Klonierungen ergibt sich oftmals das Problem, dass DNA-Fragmente mit inkompatiblen Enden miteinander verknüpft werden müssen. Es besteht die Möglichkeit, 5'- oder 3'- überhängende Enden zu glätten und die DNA-Fragmente durch sogenannte *Blunt-End-Ligation* miteinander zu verknüpfen (s. 2.1.13).

2.1.10.1 Auffüllen 5'-überhängender Enden mit Klenow-Enzym

Klenow-Enzym, das große Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I besitzt 5' → 3'-Polymerase- und 3' → 5'-Exonuclease-Aktivität. Erstere kann in Anwesenheit von Nucleosidtriphosphaten zum Auffüllen 5'-überhängender Enden genutzt werden, so dass man glatte DNA-Enden (*blunt ends*) erhält. Da Klenow-Enzym in praktisch allen Reaktionspuffern für Restriktionsenzyme aktiv ist, kann DNA aus Restriktionsverdau-Ansätzen direkt für die Auffüllreaktion eingesetzt werden.

Materialien:

- **Klenow-Enzym** (Roche Diagnostics)
- **dNTP-Stammlösung**, enthält je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Roche Diagnostics)

Durchführung:

- 0,1-0,4 μg DNA mit dNTP-Stammlösung und ddH₂O versetzen, so dass die Endkonzentration je dNTP 20 μM, das Reaktionsvolumen 20 μl beträgt
- Reaktion durch Zugabe von 1-5 U Klenow-Enzym starten, für 15 min bei 30°C inkubieren
- Enzym durch Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten inaktivieren

2.1.10.2 Abbau 3'-überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase

Die T4-DNA-Polymerase besitzt die selben enzymatischen Eigenschaften wie Klenow-Enzym. Die 3' → 5'-Exonuclease-Aktivität ist im Vergleich zum Klenow-Enzym jedoch ca. 200-fach stärker. Daher eignet sich die T4-DNA-Polymerase zum Abbau 3'-überhängender Enden.

Materialien:

- **T4-DNA-Polymerase** (New England Biolabs)
- **T4-DNA-Polymerase Puffer** (100x), (New England Biolabs):
500 mM NaCl
100 mM Tris-HCl, pH 7,9
100 mM MgCl₂
10 mM DTT
- **Rinderserum-Albumin** (100x) (**BSA**, New England Biolabs), enthält 5 mg BSA/ml
- **dNTP-Stammlösung** (siehe 2.2.10.1)

Durchführung:

- 0,1-0,4 µg DNA mit dNTP-Stammlösung (Endkonzentration je dNTP 20 µM), Reaktionspuffer, BSA-Stammlösung und ddH₂O auf 20 µl Reaktionsvolumen auffüllen; da T4-DNA-Polymerase in den meisten Reaktionspuffern für Restriktionsenzyme aktiv ist, kann zum Teil auf Zugabe des Puffers verzichtet werden
- Reaktion durch Zugabe von 1-3 U T4- DNA-Polymerase starten, für 20 min bei 12°C inkubieren
- Enzym durch Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten inaktivieren

2.1.11 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von 0,5 – 10 kb eignen sich 0,7 – 1,0 %-ige Agarose-Gele, die sowohl für analytische als auch präparative Auftrennungen verwendet werden können.

Materialien:

- **DNA Typing Grade Agarose** (Life Technologies)
- **SeaKEM GTG Agarose** (FMC BioProducts)
- **Ethidiumbromid-Stammlösung**, 10 mg/ml
- **50x TAE-Puffer:**
242 g Tris-Base
57.1 ml Eisessig
100 ml 0.5 M EDTA, pH 8,0
mit ddH₂O auf 1 l auffüllen; zur Verwendung Puffer 1:50 mit ddH₂O verdünnen
- **10x Proben-Auftragspuffer:**
in 5 ml ddH₂O jeweils 20 mg (d. h. 0.4% (w/v)) der folgenden Farbstoffe lösen:
Bromphenol-Blau (Sigma-Aldrich)
Xylen-Cyanol FF (Sigma-Aldrich)
Orange-G (Sigma-Aldrich)
sowie 1 g (d. h. 20%) Ficoll 400 (Amersham Pharmacia Biotech); bei 4°C aufbewahren
- **1 kb-Leiter** (Life Technologies):
250 µl Molekulargewichtsmarker-Stammlösung (1 µg/µl DNA) mit 100 µl 10x Proben-Auftragspuffer versetzen und mit 1xTAE-Puffer auf 1 ml auffüllen; bei 4°C aufbewahren;
Konzentration der Gebrauchslösung: 250 ng/µl; 4 µl Gebrauchslösung (entspricht 1 µg DNA) auftragen

Durchführung:

- **Gießen des Gels (1% Agarose):**
3 g Agarose mit 300 ml 1x TAE-Puffer versetzen und im Mikrowellenherd erhitzen, bis eine klare Lösung entsteht; Lösung mit 15 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzen und in eine Flachbett-Gießapparatur (Owl Scientific bzw. Stratagene) der gewünschten Größe ausgießen
- **Probenvorbereitung:**
Proben mit je 1 µl 10x Proben-Auftragspuffer versetzen und mit ddH₂O auf 10 µl auffüllen;
Proben und Marker-Gebrauchslösung in die Taschen des auspolymerisierten Gels geben

- **Gel-Lauf und photographische Dokumentation:**
die Auftrennung erfolgt bei konstanter Spannung (ca. 70 V für ca. 90 min oder 20 V über Nacht) bei einer Stromstärke von maximal 350 mA (Power Pac 300, BioRad); zur Fotodokumentation (Polaroid-Sofortbildkamera MP4 bzw. Amersham Pharmacia Biotech Image Master) kann die Elektrophorese jederzeit unterbrochen werden. Die Fluoreszenz-Anregung der gefärbten DNA erfolgt mit langwelligem UV-Licht (312 nm, UV-Leuchttisch Bachofer). Bei präparativen Auftrennungen (s.u.) wird die DNA dem UV-Licht möglichst wenig ausgesetzt, um Schädigungen zu vermeiden.

2.1.12 Reinigung von DNA aus präparativen Agarose-Gelen

Gebräuchliche Methoden, um DNA aus Agarose-Gelen zu eluieren, sind Elektroelution, Extraktion durch organische Lösemittel, *Freeze-Squeeze*-Techniken oder Solubilisierung der Gelmatrix durch chaotrope Reagentien mit nachfolgender Bindung der DNA an Silicagel-Glasmilchsuspensionen (*GeneClean II*-Methode). Die angewandte Methode zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen beruht auf der Fähigkeit von Silicagel (in wässriger Suspension, sog. „Glasmilch“), in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze, wie z.B. Natriumiodid, DNA zu adsorbieren. Zunächst wird das Agarosegelstück, welches die DNA enthält, ebenfalls mit Hilfe des chaotropen Salzes, das die Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckereinheiten des Agarosepolymers zerstört, solubilisiert. Die hohe Salzkonzentration führt weiterhin dazu, dass eventuell gebundene Proteine von der DNA abdissoziieren. Die Elution erfolgt (bei einem pH-Wert oberhalb von 7,5) durch Absenken der Ionenstärke und Erhöhung der Temperatur.

Materialien:

GeneClean II-Kit (Bio 101) zur Reinigung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von mehr als 500 bp:

- **6 M Natriumiodid-Lösung (NaI)**
- **NEW-Waschlösung:**
14 ml NEW-Konzentrat mit 280 ml ddH₂O mischen, 310 ml 100%- Ethanol hinzufügen, bei -20°C lagern; enthält Tris-HCl und Tris-Base, so dass der pH-Wert je nach Temperatur zwischen 7,0 und 8,5 liegt.
- **Glasmilch:**
Silica-Matrix, suspendiert in ddH₂O; Bindungskapazität: 1-2 µg DNA pro µl Glasmilch

Durchführung:

- DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.11) auftrennen
- gewünschte Bande mit einem sterilen Skalpell so aus dem Gel ausschneiden, dass die Einwirkzeit des UV-Lichtes minimiert wird (max. 60 sec; sonst Gefahr der Thymidin-Dimer-Bildung: irreparable Schädigung der DNA), zu kleinen Stückchen schneiden und abwägen
- Gelstück in 3 Vol. (wobei 1 g Agarose als 1 ml gerechnet wird) NaI-Lösung in 15 ml Polypropylen-Röhrchen so lange bei 55°C solubilisieren, bis sich das Gelstück vollständig aufgelöst hat
- pro 5 µg DNA 10 µl (per Vortex) resuspendierte Glasmilch-Suspension zusetzen (standardmäßig bei DNA-Mengen zwischen 2 und 10 µg 20 µl Glasmilch verwenden)
- Suspension für 15 min bei RT oder auf Eis inkubieren; die Bindung der DNA an die Silica-Matrix benötigt auf Eis 15 min bis 1 h, wobei die Glasmilch zwischendurch immer wieder aufgeschüttelt werden sollte, um den Kontakt zwischen zu bindender DNA und den Partikeln zu gewährleisten
- 2 min mit 4000 Upm (Heraeus Megafuge 2.0 R mit Ausschwingrotor) zentrifugieren
- Überstand verwerfen,
10-50 Volumen NEW Waschlösung zum Sediment geben und durch vortexen resuspendieren, dann in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen, 1 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren (Heraeus Biofuge 15 R mit Winkelrotor HFA 22.2, # 3042)
- Waschvorgang zweimal wiederholen
- zur Entfernung anhaftender Ethanolreste Sediment für 15 min bei RT trocknen lassen
- Elution durch Vortex-Resuspendierung des Sediments in 20-25 µl ddH₂O und Inkubation der Suspension für 5 min bei 55°C
- nach Zentrifugation für 1 min bei max. Geschwindigkeit DNA-haltigen Überstand abnehmen und Silica-Sediment zur Erhöhung der Ausbeute ein zweites Mal wie oben beschrieben eluieren

2.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente, wobei sowohl kohäsive als auch stumpfe Enden miteinander verknüpft werden. Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Plasmiden ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

- **Konzentration der Plasmid-DNA:**
Bei zu geringer Absolut-Konzentration ist die Religation des Plasmids (also der *intramolekulare* Ringschluß) die bevorzugte Reaktion (sofern kompatible, phosphorylierte Enden vorliegen). Ist die Konzentration zu hoch, so bilden sich bevorzugt lineare Oligomere (*intermolekulare* Reaktion). Folglich wird bei größeren Volumina die Religation des Plasmids bevorteilt.
- **Verhältnis von Plasmid-DNA zur einzufügenden Fragment-DNA:**
Die *Anzahl* der einzufügenden Fragment-DNA-Moleküle mindestens doppelt so groß sein wie die Anzahl der linearisierten Plasmid-DNA-Moleküle.
- **optimale Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:**
Die Absolut-Konzentration an Plasmid-DNA sollte so hoch sein, dass die intermolekulare Reaktion leicht bevorzugt ist. Dieser Wert ist abhängig von der Größe der Plasmid-DNA und liegt beispielsweise für ein 6 kb-Plasmid bei ca. 50-100 ng/µl.

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden sind zwei Fälle zu unterscheiden:

- **Das einzufügende Fragment besitzt identische kohäsive Enden:**
Das Plasmid muss also nur mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut werden. Der linearisierte Vektor besitzt phosphorylierte kompatible Enden und wird in der Ligationsreaktion sehr leicht wieder recircularisiert. Um die unerwünschte Religation möglichst gering zu halten, wird der geschnittene Vektor vor der Ligation mit SAP dephosphoryliert (s. 2.1.9). Bei der Ligation des Vektors mit dem einzufügenden Fragment werden daher nur zwei Phosphodiester-Bindungen geknüpft (zwischen den phosphorylierten 5'-Enden des Fragments und den 3'-OH-Enden des Vektors), es verbleiben zwei Lücken (zwischen den dephosphorylierten 5'-Enden des Vektors und den 3'-OH-Enden des Fragments) im rekombinanten Plasmid, die erst nach der Transformation von bakteriellen Enzymen aufgefüllt werden (Phosphorylierung und anschließende Ligation).
Weiterhin gibt es auf Grund der identischen kohäsiven Enden zwei mögliche Orientierungen für das einzufügende Fragment, die durch asymmetrischen Restriktionsverdau unterschieden werden müssen.
- **Das einzufügende Fragment besitzt unterschiedliche kohäsive Enden („Idealfall“):**
Das Plasmid muss hier mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut werden, damit kompatible Enden für das Einfügen des Fragments vorliegen. Da der linearisierte Vektor damit unterschiedliche kohäsive Enden besitzt, ist die Religationsrate sehr gering und eine Dephosphorylierung nicht notwendig. Auf Grund der unterschiedlichen kohäsiven Enden wird das Fragment nur in der gewünschten Orientierung eingefügt.
- **Das einzufügende Fragment sowie der linearisierte Vektor besitzen glatte Enden:**
Die Verknüpfung glatter Enden erfolgt - im Vergleich zu kompatiblen kohäsiven Enden - mit geringerer Effizienz. Um Selbstligationen des Vektors zu minimieren, kann dephosphoryliert werden. Das Fragment kann in beiden Orientierungen eingefügt werden.
Zusätzlich können sowohl 5'-überhängende Enden (Auffüllen mit Klenow-Enzym, s. 2.1.10.1) als auch 3'-überhängende Enden (Abbau mit T4-Polymerase, s. 2.1.10.2) in glatte Enden umgewandelt werden, so dass eine *blunt-end*-Ligation die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit ursprünglich inkompatiblen Enden ermöglicht.

Bei der „**Ein-Topf**“-Ligation entfällt die Präparation durch Restriktionsverdau und Dephosphorylierung der Vektor-Komponente einer Ligationsreaktion. Sofern die Schnittstellen es erlauben, kann die komplette Reaktionsfolge in einem Schritt und in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden (s. 2.1.13.2).

2.1.13.1 Ligation Gel-eluierter DNA-Fragmente

Die folgende Vorschrift eignet sich sowohl für die Ligation kohäsiver als auch glatter Enden:

Materialien:

Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics), bestehend aus:

- **T4-DNA-Ligase** (5 U/µl)

- **2x Ligationspuffer:** Zusammensetzung nicht angegeben
- **5x DNA-Verdünnungspuffer:** Zusammensetzung nicht angegeben

Durchführung:

- linearisierten Vektor und einzufügendes Fragment im gewünschten Verhältnis (Insert zu Vektor ca. 5 : 1) zusammengegeben, 2 µl 5x DNA-Verdünnungspuffer zugeben und mit ddH₂O auf 10 µl auffüllen
- 10 µl 2x Ligationspuffer zugeben, gründlich mischen
- 1 µl T4-DNA-Ligase zugeben, gründlich mischen
- 5-30 min bei RT inkubieren
- Aliquot des Ansatzes (ca. 2 µl) zur Transformation eines geeigneten *E. coli*-Stammes verwenden (s. 2.1.4)

2.1.13.2 „Ein-Topf“-Ligation

Bei herkömmlichen *blunt-end*-Klonierungen wird der Vektor zunächst geschnitten und gegebenenfalls dephosphoryliert, überhängende Enden aufgefüllt oder abgedaut und schließlich folgt die gelelektrophoretische Reinigung. Die „Ein-Topf“-Ligation hat demgegenüber den Vorteil, dass alle Reaktionen in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden können. Zu ungeschnittenem Vektor und gelgereinigtem Fragment werden Restriktionsenzym, T4-DNA-Ligase sowie T4-DNA-Polymerase (s. 2.1.10.2) oder Klenow-Fragment (s. 2.1.10.1) gegeben. In diesem Ansatz finden Restriktionsverdau und Religation des Vektors zunächst im Gleichgewicht statt. Überhängende Enden des Fragments werden gegebenenfalls aufgefüllt und zu einem gewissen Prozentsatz mit glatten Enden in den Vektor ligiert. Mit dieser Ligationsreaktion wird die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym unterbrochen, so dass bei erfolgter Klonierung das Insert nicht mehr herausgeschnitten werden kann. Diese Sackgassenreaktion entzieht dem vorgelagerten Gleichgewicht nach und nach die Vektor-Komponente, so dass nach einiger Zeit eine ausreichende Menge an gewünschten Ligationsprodukten zur Verfügung steht.

Diese Klonierungsstrategie ist immer dann einsetzbar, wenn das Fragment einerseits keine Schnittstelle des verwendeten Restriktionsenzymes aufweist. Andererseits muss nach der erfolgten Ligation die Erkennungssequenz verändert und somit für das Enzym nicht mehr zugänglich sein.

Materialien:

- **T4-DNA-Ligase**, 1 U/µl (Roche Diagnostics)
- **10x Ligationspuffer** (Roche Diagnostics):
660 mM Tris-HCl, pH 7.5
50 mM MgCl₂
10 mM DTT
10 mM ATP
- **T4-DNA-Polymerase**, 4 U/µl (Roche Diagnostics),
- **Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I**, 1 U/µl (Roche Diagnostics)
- **10 mM dNTP-Mix** (Biozym)

Durchführung:

- ungeschnittener Vektor, gelgereinigtes und geschnittenes Fragment und Restriktionsenzym zusammengeben (falls überhängende Enden aufgefüllt werden müssen, zusätzlich T4-DNA-Polymerase (ca. 8 U) oder Klenow-Fragment (ca. 2 U) sowie dNTP-Mix (Endkonzentration 150 µM) zugeben)
- 1 µl 10x Ligationspuffer sowie T4-DNA-Ligase (ca. 5-7,5 U) zugeben, gründlich mischen
- 24 - 48 h bei 14°C inkubieren
- Aliquot des Ansatzes (ca. 2 µl) zur Transformation eines geeigneten *E. coli*-Stammes verwenden (s. 2.1.4)

2.1.14 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine effiziente Methode, um ein spezifisches DNA-Segment selektiv zu amplifizieren. Eine thermostabile Polymerase (*Taq*-Polymerase) katalysiert nach dem Denaturierungsschritt und dem Hybridisieren der Primer an die DNA-Matrize (*Annealing*) die Verlängerung der Primer (*Extension*: DNA-Synthese). Durch die zyklische Anwendung von Denaturierung, *Annealing* und *Extension* gelingt die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments.

2.1.14.1 Primer-Design

Primer wurden mit Hilfe des Programms „PRIMER“ (Bestandteil der Sequenzanalyse-Software HUSAR, DKFZ, Heidelberg) ausgewählt. Folgende Programm-Parameter werden eingestellt:

- minimale Wahrscheinlichkeit der Primer-Dimer-Bildung und Sekundärstruktur-Bildung innerhalb eines Primers durch Selbst-Komplementarität
- 40-70 % GC-Gehalt; ähnlicher GC-Gehalt von Primern und zu amplifizierenden Sequenz
- Stabilität der Primers am 5'-Ende größer als am 3'-Ende
- ähnliche Schmelztemperatur (T_m , berechnet nach der *Nearest-Neighborhood*-Methode) der Primer: maximaler Unterschied: 1°C; Lage: ca. 60°C
- Länge der Primer 18-22 bp

Um nur ein einziges DNA-Fragment spezifisch zu amplifizieren, sollte die Primer-Sequenz in der Matrizenprobe nicht wiederholt vorhanden sein oder große Ähnlichkeit zu anderen Sequenzen besitzen. Deshalb wurde mit Hilfe der Algorithmen „BLASTN“ und „FASTA“ die Datenbanken des EMBL, Heidelberg, nach zur Primer-Sequenz ähnlichen Sequenzen durchsucht. Bei negativem Suchergebnis wird der Primer tatsächlich in der PCR eingesetzt. Die Primer-Synthese erfolgte durch die Firmen Eurogentec oder Life Technologies.

2.1.14.2 PCR-Reaktion

Auf Grund des exponentiellen Charakters der PCR müssen selbst kleinste Verunreinigung von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkt vermieden werden. Das Pipettieren des PCR-Ansatzes findet räumlich getrennt von dem Ort statt, an dem das PCR-Produkt analysiert wird, wobei ein hierfür reservierter Pipettensatz verwendet wird. Alle für die PCR bestimmten Reagenzien werden in Aliquots gelagert. Steriles ddH₂O wird ebenfalls nur einfach verwendet. Vermutlich mit PCR-Produkt verunreinigte Reagenzien werden ausgetauscht, verunreinigte Gegenstände werden mit UV-Licht bestrahlt oder mit 1 M HCl behandelt. Alle PCR-Reaktionen, die nicht einer Klonierung dienen, werden mit herkömmlicher *Taq*-Polymerase durchgeführt. Präparative Amplifikationen zum Zweck einer Klonierung wurden dagegen mit dem Expand High Fidelity Polymerasen-Mix (Roche Diagnostics) angesetzt. Neben der herkömmlichen *Taq*-Polymerase zur DNA-Synthese ist *Pwo*-Polymerase enthalten, die mit ihrer 3' → 5'-Exonuclease-Aktivität fehlgepaarte Basen wieder entfernen kann und somit eine erheblich verbesserte Fehlerquote der PCR-Reaktion bewirkt.

Materialien:

- ***Taq*-Polymerase**, 5 U/μl (Qiagen), oder:
- **Expand High Fidelity *Taq*-Polymerase PCR System**, 3,5 U/μl (Roche Diagnostics)
- **10x PCR-Puffer** (Qiagen):
enthält 15 mM MgCl₂, pH 8,7; keine genaue Angabe der Zusammensetzung
- **5x Q-Lösung** (Qiagen):
enthält Betain, keine genaue Angabe der Zusammensetzung
- **25 mM MgCl₂** (Qiagen)
- **10 mM dNTP-Mix**:
je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Biozym)
- **spezifische Primer**:
10 μM forward-Primer; 10 μM reverse-Primer
- **steriles ddH₂O**
- **Filter-Pipettenspitzen** (AGS bzw. Biozym)
- **dünnwandige 0,2 ml-Reagenzgefäße** (Biozym bzw. Roth)
- PCR-Gerät „**Thermo-Cycler**“: Gene-Amp 9600 bzw. Gene-Amp 9700 (Perkin Elmer)

Tabelle 2.1: Zusammensetzung einer Standard-PCR-Reaktion

Komponenten {PRIVATE}		Volumen pro Reaktion	Endkonzentration im Ansatz
PCR-Mix:	10x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl	1x
	5x Lösung Q (Qiagen)	10 µl	1x
	25 mM MgCl ₂	3 µl	1,5 mM
	10 mM dNTP-Mix	1 µl	200 µM
	10 µM forward-Primer	1 µl	0,2 µM
	10 µM reverse-Primer	1 µl	0,2 µM
	ddH ₂ O	29,5 µl - x µl	-
DNA:	Plasmid bzw. genomische DNA	x µl	Endvolumen: 50 µl
Enzym:	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Qiagen)	0,5 µl	2-5 U/50 µl

Tabelle 2.2: Ablauf des Standard-PCR-Programms

{PRIVATE}Programmschritt		Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung der DNA:		1 min	94°C
3-Schritt PCR (Zahl der Zyklen: 22-40):	Denaturieren	30 sec	94°C
	<i>Annealing</i> ²	30 sec	54-70°C
	<i>Extension</i>	0,5-3 min ³	72°C
finale Elongation:		2-5 min	72°C

Nach Beendigung des PCR-Programms können die Proben über Nacht bei 4°C oder für längere Zeit bei -20°C gelagert werden.

Durchführung:

Für eine Standard-PCR-Reaktion werden die in Tabelle 2.1 angegebenen Komponenten in einem auf Eis vorgekühlten, dünnwandigen 0,2 ml-Reagenzgefäß in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Der PCR-Mix wird für alle Reaktionen, die unter den gleichen Bedingungen ablaufen sollen, gemeinsam in einem 1,5 ml-Reagenzgefäß angesetzt, gemischt und anschließend auf die einzelnen Reagenzgefäße verteilt. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionen wird durch Variation der MgCl₂-Konzentration (1,5-5,0 mM), den Einsatz verschiedener Puffer und die Zugabe optionaler Zusätze wie DMSO, Formamid, Triton X-100 oder Glycerol optimiert. Als Negativkontrolle dient eine Reaktion ohne DNA-Zusatz. Sofort nach der Zugabe der *Taq*-Polymerase werden die Proben in den „Thermo-Cycler“ gesetzt. Da der Deckel des Geräts beheizt ist und so ein Verdunsten der Proben verhindert, ist das Übersichten der Proben mit Mineralöl nicht nötig. Ein Standard-Programm für den „Thermo-Cycler“ ist in Tabelle 2.2 dargestellt. Ein Aliquot jedes PCR-Ansatzes wird zur Auswertung auf einem analytischen Agarose-Gel aufgetrennt.

2.1.14.3 Colony-PCR

Die *Colony*-PCR dient als Alternative zur klassischen Charakterisierung von Plasmid-DNA durch Mini-Präparation im Anschluß an die Transformation von *E. coli*-Bakterien. Soll nur das Vorhandensein des inserierten Fragmentes überprüft werden, sind die Primer so zu wählen, dass sie stromaufwärts und stromabwärts der verwendeten Klonierungsstelle an die Vektor-Matrize binden. Kann bei Klonierungen das Insert in zwei

² Für jedes Primer-Paar muss die optimale *Annealing*-Temperatur ermittelt werden.

³ Je nach Länge des PCR-Produktes; Faustregel: pro 1 kb Länge 1,5 min „Elongation“.

Orientierungen eingefügt werden, sollte durch Auswahl eines dritten Primers, der asymmetrisch im Insert bindet, zusätzlich die Insertionsrichtung festgestellt werden. In jedem Fall sind die zu wählenden PCR-Bedingungen zunächst mit dem Ausgangsvektor zu optimieren, wobei die Anlagerungstemperatur der Primer an die Matrizen-DNA (*Annealing*-Temperatur) nach der Faustregel „Schmelztemperatur der Primer bei der gewählten Salzkonzentration, minus 2-3°C“ gewählt werden sollte. Die der Klonierung zugrunde liegende Vektor-DNA wird bei der eigentlichen Colony-PCR als Positivkontrolle verwendet.

Die Bakterienklone werden dabei zunächst auf nummerierte LB-Amp-Platten („*Grid*-Platten“) überführt und mit Hilfe eines Zahnstochers oder Pipettenspitze in die PCR-Reaktion eingebracht. Eine initiale Denaturierung für 60 sec bei 94°C ist ausreichend, um die Bakterienzellwand zu denaturieren, so dass die Plasmid-DNA als Matrize freigesetzt wird. Das Detergens Triton X-100 als Additiv wirkt hier unterstützend. Längere Inkubationszeiten bei 94°C wirken sich schädlich auf die verwendete Plasmid-Matrize aus (nicht gezeigt).

Durchführung:

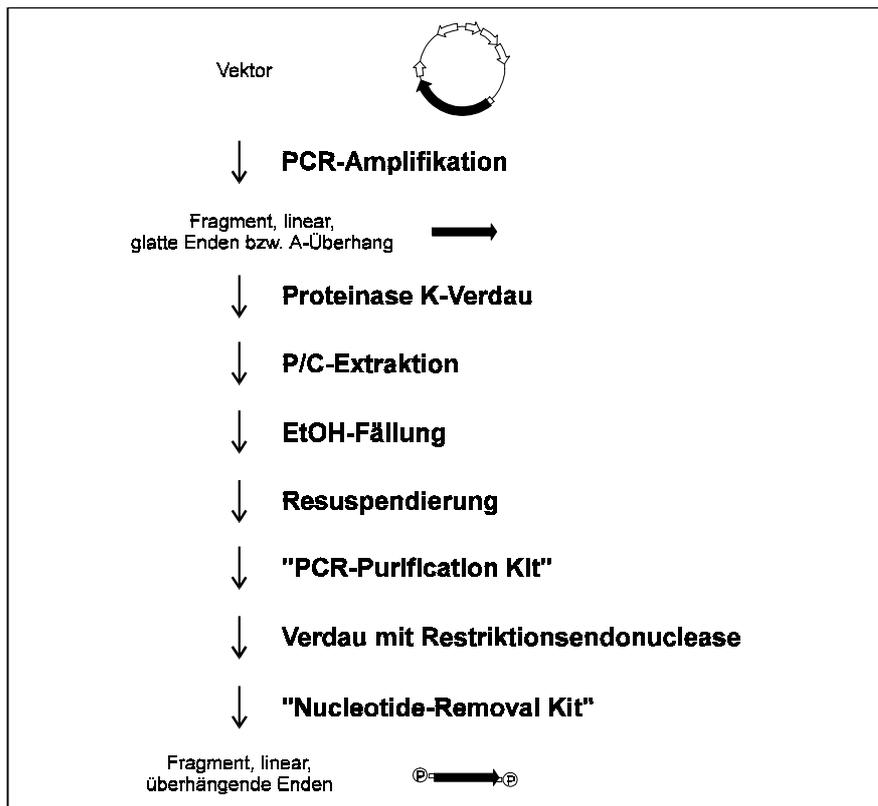
- zusätzlich zu den Reagenzien der Standard-PCR-Reaktion (s. 2.1.14.2) folgende Komponenten zugeben:

(NH ₄)SO ₄ (500 mM)	15-30 mM finale Konzentration
BSA (1 µg/ml)	100 µg/ml finale Konzentration
Triton X-100	0.1% finale Konzentration
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	2-2.5 U
Endvolumen: 50 µl	
- Kolonie mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers oder Pipettenspitze picken und durch mehrmaliges Drehen zwischen den Fingern quantitativ ablösen, so dass die Lösung trübe erscheint
- im „Thermo-Cycler“ wie in Tabelle 2.2 inkubieren
- Aliquot jeder Reaktion auf ein analytisches Agarose-Gel auftragen und elektrophoretisch auftrennen

2.1.15 Reinigung von PCR-Reaktionsprodukten (Wybranietz & Lauer 1998)

Wenn keine geeigneten Restriktionsschnittstellen für eine direkte Klonierung zur Verfügung stehen, kann die Konstruktion mittels PCR-Klonierung vorgenommen werden. Dazu werden die Erkennungssequenzen der gewünschten Restriktionsendonucleasen zusätzlich in die Sequenz der Oligonukleotid-Primer eingebaut. Werden solchermaßen amplifizierte DNA-Fragmente nachverdaut, können sie in Vektoren mit gleichen überhängenden Enden ligiert werden. Ohne weitere Aufreinigung dieser PCR-Produkte werden jedoch nur sehr schlechte Transformationseffizienzen erzielt. Ursache dafür ist, dass die *Taq*-Polymerase –fest gebunden an die DNA- die Aufreinigungsschritte einer Phenol/Chloroform-Extraktion, Ethanol-Fällung, Gelreinigung oder selektiven Adsorption der DNA an Silicagel-Matrices bei voller Aktivität übersteht (Shuldiner *et al.* 1990; Aslanidis *et al.* 1992; Hinnisdaels *et al.* 1996). Da Nucleosid-Triphosphate dieselben Behandlungen teilweise ebenfalls überstehen, ist die Polymerase beim nachfolgenden Verdau der PCR-Produkte zu Fragmenten mit überhängenden Enden aktiv. Durch Restriktionsverdau erzeugte überhängende Enden der PCR-Fragmente werden durch verbleibende Polymerase-Moleküle bei gleichzeitig vorhandenen Restmengen an Nucleotiden effektiv zu glatten Enden aufgefüllt, wodurch eine Ligation mit kohäsiven Fragmentenden verhindert wird (Crowe *et al.*, 1991; Barnes, 1992).

Als Ergebnis eigener Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Abtrennung der erzeugten PCR-Produkte von Restmengen an *Taq*-Polymerase ganz entscheidend für die Effizienz der nachfolgenden Ligation ist. Deshalb wurde ein effizientes Aufreinigungsprotokoll etabliert (Wybranietz & Lauer 1998), mit dem sich die überschüssige *Taq*-Polymerase durch Proteinase K-Denaturierung (Crowe *et al.* 1991) quantitativ aus dem Reaktionsgemisch entfernen läßt. Durch die Kombination bisher einzeln verwendeter Aufreinigungsschritte im Anschluß einer PCR-Reaktion kann gewährleistet werden, dass Primer, Nucleotide, Salze und vor allem Enzyme effektiv von der DNA-Präparation abgetrennt werden und so eine Klonierung mit den gewünschten kohäsiven Enden stattfinden kann. Als Konsequenz dieser Untersuchungsergebnisse wurden deswegen nachfolgend alle Proben der amplifizierten Fragmente einer **sequentiellen Behandlung** (Proteinase K-Verdau, Phenol/Chloroform-Extraktion, EtOH-Fällung, selektive Bindung der DNA an Silicagel-Matrix [*QIAprep PCR Purification Kit*] gefolgt von einer Elution unter Niedrigsalzbedingungen) unterzogen. Die folgende Übersicht faßt die Sequenz der Reinigungsschritte zusammen:



Konzept zur Aufreinigung von PCR-Produkten für die Klonierung mit überhängenden Enden

Durchführung:

- zunächst eine Standard-PCR-Reaktion (s. 2.1.14.2) mit optimierter *Annealing*-Temperatur und *Extension*-Zeit und im präparativen Massstab durchführen, d.h. in der Regel 10-20 Reaktionen á 50 µl
- 5 µl-Aliquot jeder Reaktion auf ein analytisches **Agarose-Gel** auftragen und elektrophoretisch auftrennen
- sofern singuläre Banden der vorausgerechneten Größe detektiert werden, mit dem Aufreinigungs-Protokoll fortfahren; beim Auftreten von Störbanden PCR-Bedingungen erneut optimieren und PCR-Produkte präparativ amplifizieren
- PCR-Ansätze in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereinigen
- Proteinase K-Verdau (s. 2.1.15.1)
- Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.1.15.2)
- **PCR-Purification-Kit** (s. 2.1.15.3)
- **präparativer Restriktionsverdau** (s. 2.1.8):
im Reinigungs-Schritt zuvor eluierte DNA komplett für den Restriktionsverdau verwenden, 10x-Restriktions-Puffer verwenden, in dem beide Enzyme mindestens 75% Aktivität besitzen; möglichst konzentrierte (40 U/µl) Restriktions-Enzyme einsetzen:

30	µl	DNA (PCR-Fragment)
7	µl	10x-Restriktions-Puffer
2	µl	Enzym 1 (40 U/µl)
2	µl	Enzym 2 (40 U/µl)
29	µl	H ₂ O
70	µl	max. Endvolumen (begrenzt durch anschließenden Aufreinigungs-Schritt)
- Reaktionsgemisch über Nacht bei 37°C inkubieren
- **Nucleotide-Removal-Kit** (s. 2.1.15.3)
- (optional) **Test-Ligation**:
bei erfolgreicher Aufreinigung besitzen die PCR-Fragmente ligationsfähige, überhängende Enden der verwendeten Restriktionsenzyme; nach Selbst-Ligation dieser Fragmente sollte im Agarose-Gel eine Leiter der Fragment-Multimere zu sehen sein; diese Test-Ligation wird am besten mit einer hochkonzentrierten T4-DNA-Ligase (100 U/µl) durchgeführt, z.B. aus dem *Clontech Ligation Kit* (Clontech).

2.1.15.1 Proteinase K-Verdau

Das Enzym Proteinase K (Roche Diagnostics) verdaut alle Proteine, die sich im Reaktionsgemisch befinden; hier insbesondere überschüssige *Taq*-Polymerase der PCR-Reaktion.

Materialien:

- **Proteinase K**, 14,3 mg/ml (Roche Diagnostics), in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- **1 M Tris-HCl, pH 8,0**
- **20% SDS**

Durchführung:

- folgende Reagenzien zu den vereinigten PCR-Ansätzen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß geben:

450	µl	DNA		
12,5	µl	20% SDS	→	final: 0,5% SDS
5	µl	1M Tris-HCl, pH 8,0	→	final: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1,75	µl	Proteinase K (14,3 mg/ml)	→	final: 50 µg/ml Proteinase K
<u>30,75</u>	<u>µl</u>	H ₂ O		
500	µl	Endvolumen		
- Reaktionsgemisch für 90 min bei 37°C inkubieren, anschließend 10 min bei 68°C hitzeinaktivieren

2.1.15.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Mittels Phenol/Chloroform-Extraktion können verunreinigende Proteine (bei der Aufreinigung von DNA-Proben) selektiv durch Phasentrennung aus einem Reaktionsgemisch entfernt werden.

Materialien:

- **Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), (PCI):**
 250 g Phenol im Wasserbad bei 65°C schmelzen;
 dem flüssigen Phenol 0,25 g Hydroxychinolin (Sigma) als Antioxidans/RNase-Inhibitor zusetzen;
 Lösung zu je 22,5 ml aliquotieren und bei -20°C aufbewahren;
 zum Gebrauch ein Aliquot auftauen, mit 5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 9,5 versetzen, mischen und mit
 22,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) auffüllen;
 abschließend Gemisch für 2 h mit 1900 g zur Phasentrennung zentrifugieren, bei 4°C aufbewahren
- **Chloroform**
- **3M NaAc, pH 4,8:**
 9,84 g Natriumacetat in 30 ml ddH₂O lösen, mit (viel!) Eisessig auf pH 4,8 einstellen, mit ddH₂O auf
 40 ml auffüllen und autoklavieren
- **Ethanol, 100 %**
- **Ethanol, 70 % (w/v)**

Durchführung:

- zur DNA-Protein-Lösung 1 Volumenteil (1 Vol.) **PCI** (hier: 500 µl) zugeben
- 5 min mit 18000 x g (ca. 14000 Upm) bei 4°C zur Phasentrennung zentrifugieren
- untere organische Phase (PCI) vollständig absaugen und die wäßrige Phase erneut mit Phenol extrahieren (s. o.)
- nach Entfernung der phenolhaltigen Phase die obere wäßrige Phase mit 1 Vol. **Chloroform** extrahieren
- 5 min mit 18000 x g (ca. 14000 Upm) bei 4°C zentrifugieren
- untere organischen Phase verwerfen,
 wäßrige Phase in frische 2 ml-Reaktionsgefäße überführen
- zur DNA-Fällung mit 2,5 Vol. eiskaltem 100%-Ethanol (hier: 1250 µl) und 1/10 Vol. 3M NaAc, pH 4,8 (hier: 50 µl) versetzen
- 30-60 min bei -80°C präzipitieren
- 30 min mit 18000 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand absaugen, je 500 µl kaltes 70% -Ethanol zugeben (Salzentfernung)
- 5 min mit 18000 x g bei 4°C zentrifugieren
- Überstand absaugen, gefällte DNA 10 min bei RT inkubieren, um Ethanolreste verdunsten zu lassen
- abschließend DNA-Pellet in 30-50 µl ddH₂O lösen

2.1.15.3 Aufreinigen von PCR-Reaktionen und Restriktionsverdauen

PCR-Reaktionen enthalten neben dem gewünschten PCR-Produkt auch noch Primer, freie Nucleotide, Salze und Polymerase, deren Abtrennung für eine Verwendung des PCR-Produktes in Klonierungen und anderen enzymatischen Reaktionen notwendig ist. Durch Adsorption der gewünschten DNA an eine Silicagel-Membran in einem Zentrifugenröhrchen kann zumindest ein Teil der nicht erwünschten Verunreinigungen mittels Zentrifugation abgetrennt werden. Je nach Zusammensetzung des Hochsalzpuffers werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe an die Silicagel-Membran gebunden, sofern der pH-Wert unter 7.5 liegt; die Elution erfolgt dann unter Niedrigsalzbedingungen (mit ddH₂O). Die Säulchen der *QIAquick column*-Serie (Qiagen) besitzen eine Bindungskapazität von 10 µg DNA bei einer Elutionsausbeute von bis zu 95%.

Das *QIAquick PCR Purification Kit*-Protokoll dient der Aufreinigung von DNA-Fragmenten von 100 bp bis 10 kb, während alle kleineren Fragmente wie Primer oder Primer-Dimere effektiv abgetrennt werden.

Bei gleichem Anwendungsprinzip wie der Aufreinigung von PCR-Reaktionen verwendet das *QIAquick Nucleotide Removal Kit* (Qiagen) einen unterschiedlichen Adsorptionspuffer, so dass auch Oligonucleotide effektiv aufgereinigt werden können und freie Nucleotide, Salze und Enzyme als Verunreinigungen abgetrennt werden. Letzteres Kit wurde zur **Abtrennung der Restriktionsenzyme** nach Verdauen verwendet, so dass gleich mit der Ligationsreaktion, ohne zusätzliche Gelreinigung, fortgefahren werden kann.

Materialien:

- **Puffer PB** (Adsorptionspuffer des *PCR Purification Kits*)
- **Puffer PN** (Adsorptionspuffer des *Nucleotide Removal Kits*)
- **Puffer PE** (Waschpuffer zur Salzentfernung)
- Alle Puffer sind Bestandteile des *QIAquick PCR Purification-Kits* (Qiagen) oder des *QIAquick Nucleotide Removal-Kits* (Qiagen), die Pufferzusammensetzung ist nicht angegeben.

Durchführung:

- zum Reaktionsgemisch **5 Vol. PB** geben (max. Gesamtvolumen: 800 µl), mischen, in *QIAquick*-Zentrifugenröhrchen (Säuleneinsatz in 2,0 ml Sammelröhrchen) geben
- 1 min mit 13000 Upm zentrifugieren (Heraeus Biofuge 15 R mit Winkelrotor HFA 22.2, # 3042)
- Eluat verwerfen
750 µl Puffer PE zugeben, 1 min bei RT inkubieren
- 1 min mit 13000 Upm (ca. 10000 x g) zentrifugieren
- Eluat verwerfen, nochmals für 1 min mit 13000 Upm (ca. 10000 x g) zentrifugieren, um Reste des Waschpuffers komplett zu entfernen
- *QIAquick spin columns* in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße stellen, zur Elution der DNA 31 µl ddH₂O zugeben, 1 min bei RT inkubieren und für 1 min mit 15000 Upm (ca. 18000 x g) zentrifugieren
- zur Überprüfung der Reinheit 1 µl-Aliquot in einem analytischen **Agarose-Gel** auftragen

Zur Durchführung des *QIAquick Nucleotide Removal-Kits* statt 5 Vol. PB (s.o.) **10 Vol. PN** verwenden, ansonsten stimmen die beiden Protokolle überein.

2.1.16 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die enzymatische Sequenzierung wird nach der von Sanger (Sanger & Coulson, 1975; Sanger *et al.*, 1977) entwickelten Didesoxy-Methode durchgeführt. Bei Verwendung von radioaktiv oder Fluoreszenz-markierten Nukleotiden können die neusynthetisierten DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge nach der elektrophoretischen Auftrennung sichtbar gemacht werden. Als Polymerase wird eine gentechnisch modifizierte T7-DNA-Polymerase mit hoher Prozessivität und deletierter 5'-3'-Exonukleaseaktivität („Sequense“) verwendet. Die Sequenzierungen aller in der vorliegenden Arbeit klonierten Konstrukte wurden von den Firmen SeqLab, GENTERprise oder Replicon durchgeführt.

2.2 Zellbiologische Materialien und Methoden

2.2.1 Verwendete Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden mittels ELISA (*Mycoplasma Detection Kit*, Roche Diagnostics) auf Mycoplasmen getestet. Es wurden nur Mycoplasma-negative Linien verwendet, bei positivem Ergebnis wurde die entsprechende Zelllinie komplett verworfen und durch eine Mycoplasmen-freien Stamm ersetzt.

HepG2:

Zelllinie aus **hepatozellulärem Carcinom humanen** Ursprungs (Kaukasier, 15 Jahre): (Knowles *et al.* 1980); bildet zahlreiche Hepatocyten-spezifische Proteine wie α 1-Fetoprotein, Prothrombin, Antithrombin III, C3-Aktivator, Fibrinogen, ASGP-R; es gibt keine Anhaltspunkte für eine HBV-Infektion, d. h. in den Zellen sind weder HBV-DNA-Integrate nachweisbar noch läßt sich HBsAg detektieren.

epithelartige Morphologie, benötigen zum Wachstum hohe Zelldichte.

Kulturmedium: 80% MEM (mit EBSS) + 20% DMEM + 1% NEAA + 1% Natriumpyruvat + 10% FCS

Hep3B:

Zelllinie aus **hepatozellulärem Carcinom humanen** Ursprungs (Kaukasier, 15 Jahre): (Knowles *et al.* 1980); bildet wie HepG2 zahlreiche Hepatocyten-spezifische Proteine; zusätzlich wird HBsAg detektiert.

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

HuH7:

Zelllinie aus **hepatozellulärem Carcinom humanen** Ursprungs (Japaner, 57 Jahre): (Nakabayashi *et al.* 1982) bildet leberspezifische Proteine wie α 1-Fetoprotein, Fibrinogen, Caeruloplasmin, Transferrin; HBsAg-negativ; **epitheloide** Morphologie; wird von ECACC und ATCC nicht geführt.

Kulturmedium: M199 + 10% FCS

CV-1:

Nierenzell-Isolat einer Afrikanischen Grünen Meerkatze (Jensen *et al.* 1964);

wird insbesondere zu SV40-Studien verwendet, läßt sich aber auch mit einer Reihe anderer Viren infizieren.

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

COS-1, COS-7⁴:

CV-1-Derivate (Affennieren-Zellen), stabile Integration des kompletten SV40-Genoms (Gluzman 1981), bildet das SV40 *large T-Antigen*; Propagation ohne Selektionsmedium;

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

CO60⁵:

CHO (Chinese Hamster Ovary)-Derivat, stabile Integration des kompletten SV40-Genoms (Berko *et al.* 1990), bildet das SV40 *large T-Antigen*; Propagation ohne Selektionsmedium;

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

HeLa:

epitheloide Cervix-Adeno-Carcinom-Zelllinie humanen Ursprungs (31-jährige Schwarze); erste aneuploide Zelllinie aus humanem Gewebe, die kontinuierlich kultiviert werden konnte.

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

293⁶:

Zelllinie aus **embryonalen Nierenzellen humanen** Ursprungs (*human epithelial kidney* HEK-Derivat), transformiert mit gescherter DNA von **humanem Adenovirus, Serotyp 5** (Graham *et al.* 1977); kann die adenoviralen Genprodukte der E1-Region *in trans* zur Verfügung stellen.

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

⁴ COS-1-Zellen wurden freundlicherweise von G. Frommer, Institut für Zellbiologie, Tübingen, und von A. Phelan, MCRI, Oxted, UK, zur Verfügung gestellt; COS-7-Zellen waren von V. Reichardt, Medizinische Klinik, Tübingen.

⁵ CO60-Zellen wurden freundlicherweise von J.-H. Küpper, Pathologisches Institut, Uni Tübingen, zur Verfügung gestellt.

⁶ 293-Zellen sehr niedriger Passage-Zahl wurden bei der Firma Microbix, Hamilton, Canada, erworben.

MDCK:

Madin Darby Canine Kidney-Zellen leiten sich von einem **Nierenzellisolat** eines gesunden **Cockerspaniels** ab (Gaush *et al.* 1966). Die Zellen zeigen in Kultur einen polaren Aufbau und eignen sich daher zum Studium der Sortierung von eigenen und fremden Membranproteinen.

Kulturmedium: MEM (mit EBSS) + 10% FCS

M-12⁷:

MDCK-Derivat, stabile Expression des **humanen ASGP-R** (Fuhrer *et al.* 1993⁸);

Selektionsmarker: Neomycin- und die Histidinol-Resistenz.

Kulturmedium: MEM (mit EBSS) + 1% NEAA + 10% FCS + 2 mg/ml Histidinol + 600 µg/ml G418

NIH-3T3:

embryonale Mäuse-Fibroblasten-Zelllinie; Zellen weisen starke Kontaktinhibition auf (Jainchill *et al.* 1969), der hier verwendete NIH-3T3-Klon jedoch nicht; transformiert mit SV40 und Polyoma-Virus; kann durch eco- oder amphotropes MoMLV infiziert werden; Basis-Zelllinie für viele retrovirale Verpackungszelllinien.

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

PE501⁹:

retrovirale Verpackungszelllinie; Derivat von **3T3tk⁻-Zellen** (Miller & Buttimore 1986); enthält ein stabil integriertes, modifiziertes MoMLV-Genom, stabile Expression aller retroviralen Strukturgene (*gag, pol, env*); mit PE501 rekombinante Retroviren transduzieren nur Mäuse- und Rattenzellen (**ecotropes Wirtsspektrum**).

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

PA317⁹:

retrovirale Verpackungszelllinie; Derivat von **3T3tk⁻-Zellen** (Miller & Buttimore 1986); im Gegensatz zu PE501 ist das ecotrope *env*-Gen des MoMLV gegen das amphotrope Gen des endogenen Maus-Retrovirus 4070A (Chattopadhyay *et al.* 1981) ausgetauscht; mit Hilfe von PA317 erzeugte rekombinante Retroviren transduzieren daher ein breiteres Spektrum an Säugerzellen (**amphotropes Wirtsspektrum**).

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

Phoenix-eco (ΦNX-eco)¹⁰:

retrovirale Verpackungszelllinie; Derivat von **293T-Zellen** (Achacoso *et al.* 1996); enthält ein stabil integriertes, modifiziertes MoMLV-Genom, stabile Expression aller retroviralen Strukturgene (*gag, pol, env*); mit Hilfe von Phoenix-eco erzeugte rekombinante Retroviren transduzieren nur Mäuse- und Rattenzellen (**ecotropes Wirtsspektrum**); im Vergleich zu PE501 lassen sich mit Phoenix-eco höhere Virus-Titer erzielen.

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

Phoenix-ampho (ΦNX-ampho)¹⁰:

Phoenix-ampho stellt das amphotrope Gegenstück zu Phoenix-eco dar (analog dem Zelllinienpaar PE501/PA317).

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

MH (Morris Hepatom 3924a)¹¹:

Hepatom der Ratte: 1951 von Morris durch chemische Carcinogenese mit N-(2-Fluorenyl)-diacetamid in der ACI-Ratte induziert (Morris 1963).

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 5% FCS

MCF-7¹²:

Zelllinie aus **Mamma-Carcinom humanen** Ursprungs (Kaukasierin, 69 Jahre);

Mutation im Caspase 3-Gen der Caspase-Kaskade, daher häufiger Einsatz zu Apoptose-Studien.

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alaninyl-Glutamin) + 10% FCS

⁷ M-12-Zellen wurden freundlicherweise von M. Spiess, Biozentrum Basel, zur Verfügung gestellt.

⁸ In der Publikation als M(y+f)-Zellen bezeichnet.

⁹ PE501 und PA317 wurden freundlicherweise von A.D. Miller, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, zur Verfügung gestellt.

¹⁰ Phoenix-eco und -ampho wurden freundlicherweise von G.P. Nolan, Stanford University, zur Verfügung gestellt.

¹¹ Morris Hepatom 3924a-Zellen wurden bei der Tumorbank des DKFZ, Heidelberg, erworben.

¹² MCF-7 wurden freundlicherweise von K. Belka, Uniklinik Tübingen, zur Verfügung gestellt.

CHO-B66¹³:

CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-**Derivat**, isoliert aus den Ovarien eines adulten Chinesischen Hamsters; stabile Expression des F-Glycoproteins von Senai-Virus (W.J. Neubert, persönliche Mitteilung).

Kulturmedium: MEM (mit EBSS) + 1 % NEAA + 10 % FCS

CRFK:

epitheliale Zellen, isoliert aus der **Nierenrinde** einer 10-12 Wochen alten **Hauskatze**; wird vor allem zum Studium von Katzen-Viren verwendet;

Kulturmedium: MEM (mit EBSS) + 1 % NEAA + 10 % FCS

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Allgemeines

Alle Arbeitsschritte, die steril ablaufen müssen, werden in einer Sicherheitswerkbank (Clean Air DLF/BSS 4) durchgeführt. Medien und Puffer werden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C temperiert. Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgt bei 36,5°C und 5%CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (Inkubatoren von: Forma-Scientific).

Materialien:

- **Foetales Kälberserum (FCS, Life Technologies)**
- **Medium 199** (Life Technologies)
- **MEM** (= *minimal essential medium*), (Life Technologies)
- **DMEM** (= *Dulbecco's modification of Eagle's medium*), (Life Technologies)
- **DMEM mit 2 mM L-Alanyl-Glutamin** (= Glutamax I™) + **10 % FCS:**
450 ml DMEM/Glutamax (hoher Glucosegehalt) mit Natrium-Pyruvat und NaHCO₃ (Life Technologies) werden mit 50 ml FCS versetzt. L-Alanyl-Glutamin kann von den meisten Zelllinien genauso gut wie L-Glutamin verwertet werden, ist aber in Lösung sehr viel stabiler als dieses.
- **100x (100 mM) Natrium-Pyruvat-Lösung** (Life Technologies)
- **100x MEM-NEAA** (*non essential amino acids* = nicht-essenzielle Aminosäuren) (Life Technologies)
- **50x HEPES-Puffer, 1 M** (Biochrom)
- **PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺:**
95,5 g Dulbecco's PBS-Pulver (Sigma) werden in 10 l ddH₂O gelöst, aliquotiert und autoklaviert. Die Lösung hat folgende Zusammensetzung:
8 g/l NaCl,
1,15 g/l Na₂HPO₄,
0,2 g/l KH₂PO₄,
0,2 g/l KCl
- **Versen, 0,53 mM (0,2 g/l)** (Life Technologies):
„isotonisch gepufferte NaCl-Lösung“ (formal eine PBS-EDTA-Lösung)
- **Trypsin/EDTA mit Phenolrot:**
0,5 g/l Trypsin-, 0,2 g/l EDTA-Fertiglösung (Life Technologies)

2.2.2.2 Auftauen von Zellen

Folgendes Protokoll wurde für alle benutzten Zelllinien verwendet:

- die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen möglichst rasch in ein 37°C-Wasserbad überführen und auftauen
- Zellsuspension vorsichtig mit 10 ml des jeweiligen Kulturmediums versetzen¹⁴, für 2 min mit 200 g (Heraeus Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor) zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Zellsediment in 5 ml bzw. 10 ml Kulturmedium resuspendieren und in eine 50 ml- (25 cm²) bzw. 260 ml- (75 cm²) Zellkulturflasche überführen

¹³ CHO-B66 wurden freundlicherweise von W.J. Neubert, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

¹⁴ Das Medium muß langsam zugesetzt werden, um einen osmotischen Schock zu vermeiden, der die Überlebensrate um bis zu 50 % reduzieren kann.

2.2.2.3 Zellpassage

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit werden die in Kultur gehaltenen Zelllinien ein- bis dreimal pro Woche nach folgender Vorschrift passagiert. Die Passage erfolgt, wenn die Zellen 80% Konfluenz erreicht haben.

Durchführung:

- altes Medium entfernen und Zellen mit 5 ml PBS waschen, um Mediumreste zu entfernen (Trypsin wird durch FCS inaktiviert)
- 1 ml Trypsin/EDTA so zugeben, dass die gesamte Zellschicht bedeckt ist
- wenn sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen, 4 ml Kulturmedium zugeben, gesamte Zellsuspension aufnehmen, gewünschte Menge (1/2 – 1/20) passagieren und mit 12 ml frischem Medium versetzen

Die Mengenangaben beziehen sich auf 260 ml-Kulturflaschen und können für 800 ml-Kulturflaschen einfach verdoppelt werden. Für 50 ml-Kulturflaschen und 6 cm-Kulturschalen werden die gleichen Mengen an PBS und Trypsin, jedoch nur 5 ml Medium verwendet.

2.2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Materialien:

- **Einfriermedium:**
70 % Kulturmedium (FCS-frei)
20 % FCS
10 % DMSO (Sigma)
- **Kryoröhrchen**, 2 ml (Nunc)
- Einfriergerät Nicool Plus (Air Liquide)

Durchführung:

- Zellen trypsinieren und in 10 ml normalem Kulturmedium aufnehmen
- Zellsuspension für 2 min mit 200 x g bei 4°C zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Zellsediment in 2 ml (Zellen aus einer 260 ml-Kulturflasche) oder 4 ml (Zellen aus einer 800 ml-Kulturflasche) Einfriermedium resuspendieren und je 1 ml in Kryoröhrchen überführen
- Kryoröhrchen im Einfriergerät graduell auf -150°C abkühlen (Standardprogramm: startend von +20°C, Abkühlung 2,3°/min bis 0°C, dann Stickstoffstoß auf -30°C, 60 sec Verweilen bei -30°C, Abkühlung 4°/min auf -150°C); eingefrorene Kulturen möglichst rasch in den Stickstofftank überführen

2.2.2.5 Zellzählung mit dem Häemocytometer nach Neubauer

Materialien:

- 0.4 % (w/v) **Trypanblau** (Sigma)
- **Häemocytometer nach Neubauer**

Durchführung:

- Zellen trypsinieren und mit normalem Kulturmedium aufnehmen
- Zellsuspension für 2 min mit 200 x g bei 4°C zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Zellen in 10 ml frischem normalen Kulturmedium resuspendieren
- 900 µl Trypanblau mit 100 µl Zellsuspension versetzen, gut mischen und für 5 min inkubieren (lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während durch die nicht mehr intakte Plasmamembran toter Zellen der Farbstoff eindringen kann; die Färbung sollte nicht zu lange durchgeführt werden, da sonst auch lebende Zellen beginnen, den Farbstoff aufzunehmen)
- Deckglas leicht befeuchten und auf die Zählkammer auflegen, so dass Newton-Ringe sichtbar werden; beide Kammern mit neu resuspendiertem Farbstoff/Zell-Gemisch mittels Kapillarkräften befüllen
- vier Eckquadrate jeder Kammer unter dem Mikroskop (Olympus IMT-2; Olympus) auszählen: lebende Zellen erscheinen weiß auf blauem Hintergrund
- Bestimmung der Zellzahl: ein Eckquadrat einer Kammer entspricht bei aufgelegtem Deckgläschen 10⁻⁴ cm³; bei Einbeziehung der 1:10-Verdünnung mit Trypanblau ergibt sich die Zellzahl/ml nach folgender Formel:
- Zellzahl/ml = durchschnittliche Zellzahl pro Eckquadrat x 10⁴ x 10

2.2.2.6 Kristallviolett-Färbung

Zur Auszählung von Zellkolonien nach einer G418-Selektion wird eine Färbemethode benötigt, die bis zum Zeitpunkt der Fixierung lebende Zellen dauerhaft und kontrastreich anfärbt. Ein geeignetes Verfahren für diese Anwendung ist die **Kristallviolett-Färbung**, die den Vorteil kurzer Fixierungs- und Färbezeiten hat. Weiterhin sind Kristallviolettlösungen über lange Zeit stabil und müssen daher nicht (wie viele andere Färbelösungen) vor Gebrauch frisch angesetzt werden.

Materialien:

- **Fixierlösung:**
Trichloressigsäure (TCA), 5% (w/v):
25 g TCA in ddH₂O lösen und auf 500 ml auffüllen
- **10x Kristallviolett-Stammlösung:**
3% Kristallviolett in 40% (w/v)-Ethanol:
200 g Ethanol in ddH₂O lösen, auf 500 ml auffüllen und 15 g Kristallviolett (Fluka) lösen
- **Kristallviolett-Färbelösung:**
0,3 % Kristallviolett in 4%-Ethanol;
50 ml Stammlösung mit ddH₂O auf 500 ml auffüllen
die Färbelösung ist bei Raumtemperatur stabil

Durchführung:

- altes Medium entfernen und zu färbende Zellen mit 5 ml PBS pro 6 cm-Kulturschale waschen
- gewaschene Zellen mit 3 ml Fixierlösung für 15 min inkubieren
- Fixierlösung entfernen und Zellen mit 5 ml PBS waschen
- 3 ml Färbelösung zugeben und für 15 min inkubieren
- Färbelösung abnehmen und Kulturschalen mit Leitungswasser waschen, bis aller überschüssiger Farbstoff entfernt ist
- abschließend Kulturschalen bei RT trocknen

2.2.3 Transfektion eukaryontischer Zellen

Zum Einbringen von Fremd-DNA in Säugerzellen, die in Zellkultur gehalten werden, existieren unterschiedliche Methoden. **Calcium-Phosphat vermittelte Transfektion** (Graham & van der Eb 1973; Wigler *et al.* 1979) stellt eine einfache und effiziente Methode dar, bei der viele Zellen einer Kultur Fremd-DNA aufnehmen. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme ist nicht geklärt, erfolgt aber vermutlich durch Endocytose, der der Transport der DNA zum Zellkern folgt. Bei der **Lipofektion** werden DNA-Liposomen-Gemische (oft eine Mischung aus polykationischen Lipiden zur Bindung der DNA und neutralen Lipiden) ebenfalls endocytotisch aufgenommen. Bei vielen Zelllinien lassen sich höhere Transfektions-Effizienzen als mit der Calcium-Phosphat-Methode erzielen, jedoch ist meist auch die Zelltoxizität der Liposomengemische deutlich erhöht. Zudem muss meist mit Serum-freiem Medium gearbeitet werden.

2.2.3.1 Lipofektion mit LipofectAMINE™

Die folgende Arbeitsvorschrift beschreibt exemplarisch die Transfektion in **35 mm-Kulturschalen**. Für Transfektionen in 60 mm-Kulturschalen wird jeweils das Doppelte der angegebenen Mengen verwendet. Mit LipofectAMINE™ lassen sich insbesondere HeLa-, COS-, M-12, CRFK, MH- und NIH-3T3-Zellen sowie davon abgeleitete retrovirale Verpackungszelllinien effizient transfizieren.

Materialien:

- **LipofectAMINE™-Reagenz** (Life Technologies):
3:1 (w/w) Liposomen-Lösung aus dem polykationischen Lipid 2,3-Dioleoyl-N-[2-(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoracetat (DOSPA) und dem neutralen Lipid Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE)
- normales Kulturmedium mit 10% FCS
- serumfreies Kulturmedium ohne FCS
- Kulturmedium mit 20% FCS

Durchführung:

- einen Tag vor der Transfektion die zu transfizierenden Zellen trypsinieren, im Hämocytometer auszählen und die gewünschte Zellzahl (ca. $2-5 \times 10^5$) aussäen, mit 2 ml Medium versetzen und für 24 h bei 36,5°C im CO₂-Inkubator inkubieren
- in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß vorbereiten:
für jede Transfektion 1-4 µg DNA in 100 µl serum-freien Kulturmedium verdünnen
- in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen vorbereiten:
für jede Transfektion 15 µl Lipofectamin in 100 µl serum-freien Kulturmedium verdünnen
- beide Lösungen im 15ml-Falcon-Röhrchen zusammengeben, vorsichtig mischen,
30 min bei RT inkubieren (Bildung der DNA-Liposomen-Komplexe)
- nach 25 min Zellen mit 5 ml serum-freien Medium waschen:
altes Medium absaugen, 5 ml neues Medium zugeben, kurz schwenken,
Medium wieder absaugen, so dass „nackte Zellen“ übrig bleiben
- für jede Transfektion 0,8 ml serum-freies Medium zu den DNA-Liposomen-Komplexen im 15 ml-Falcon-Röhrchen geben (Gesamtvolumen jetzt: 1 ml), vorsichtig mischen
- Zellen mit der verdünnten DNA-Liposomen-Lösung mit Hilfe einer Pipette überschichten und Zellen 5 h bei 36,5°C im CO₂-Inkubator inkubieren
- nach der Inkubation 1 ml normales Kulturmedium mit 20% FCS zugeben (so dass wieder 10% FCS Endkonzentration im Gesamtvolumen von 2 ml erreicht werden) und Zellen weiterinkubieren
- 24 h nach Beginn der Transfektion Ersatz des Transfektionsmediums durch frisches Kulturmedium

2.2.3.2 Transfektion mit LipofectIN™

Die folgende Arbeitsvorschrift beschreibt exemplarisch die Transfektion in **35 mm-Kulturschalen**. Für Transfektionen in 60 mm-Kulturschalen wird jeweils das Doppelte der angegebenen Mengen verwendet. Mit LipofectIN™ lassen sich insbesondere 293- und 293T-Zellen sowie davon abgeleitete retrovirale Verpackungszelllinien effizient transfizieren.

Materialien:

- **LipofectIN™-Reagenz** (Life Technologies): 1:1 (w/w) Liposomen-Formulierung in sterilem Wasser aus dem polykationischen Lipid N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und dem neutralen Lipid Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE),
- normales Kulturmedium mit 10% FCS
- serumfreies Kulturmedium ohne FCS
- Kulturmedium mit 20% FCS
- Opti-MEM (Life Technologies);

Durchführung:

- 48 h vor Transfektion 2×10^5 Zellen je Kulturschale aussäen
- je Transfektionsansatz 1,5 µg DNA in 100 µl Opti-MEM sowie 10 µl LipofectIN™ in 100 µl Opti-MEM verdünnen und für 30 min bei RT inkubieren
- Lösungen vereinigen, vorsichtig mischen und für weitere 15 min bei RT inkubieren
- von den zu transfizierenden Zellen Medium abnehmen und Zellen mit 2 ml FCS-freiem Medium waschen
- Transfektionslösung mit 0,8 ml Opti-MEM verdünnen und auf die zu transfizierenden Zellen geben
- Zellen für 8 h bei 36,5 °C inkubieren, anschließend 1 ml Medium + 20 % FCS zugeben
- 24 h nach Beginn der Transfektion Ersatz des Transfektionsmediums durch frisches Kulturmedium

2.2.4 Proliferationstest: SRB-Assay

Proliferationstests dienen der quantitativen Bestimmung des Zellwachstums bzw. des cytotoxischen Effektes. Die gebräuchlichsten nicht-radioaktiven Methoden sind dabei der MTT-Proliferations-Test, der die metabolische Aktivität lebender Zellen misst, und der SRB-Assay, der die Inhibition des Zellwachstums detektiert (Skehan *et al.* 1990). Der SRB-Test beruht auf der Bindung des Protein-Farbstoffes Sulforhodamin B (SRB) und ist das Standard-Testverfahren des *National Cancer Institutes* der USA zum Screening zellschädigender Substanzen. Das entstehende lösliche Sulforhodamin B kann spektrophotometrisch quantifiziert werden. Die so ermittelten OD-Werte verhalten sich direkt proportional zur Zellzahl. Vergleiche von MTT- und SRB-

Tests ergaben, dass das SRB-Reagenz die Wachstums-Inhibition über einen größeren linearen Bereich, empfindlicher und in mehr Zelllinien zuverlässig quantifiziert als der MTT-Farbstoff (Keepers *et al.* 1991; Rubinstein *et al.* 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen von Cytotoxizitäts-Tests die SRB-Färbung verwendet.

Materialien:

- **Fixierlösung: 10% (w/v) TCA:**
100 g Trichloressigsäure (TCA) in 1 l ddH₂O lösen
- **Färbelösung: 0.4% (w/v) SRB:**
0,4 g Sulforhodamin B (Sigma-Aldrich) in 100 ml 1%-Essigsäure-Lösung (s.u.) lösen
- **1% (v/v) Essigsäure-Lösung:**
10 ml conc. Essigsäure (Eisessig) zu 990 ml ddH₂O geben
- **Solubilisierungs-Lösung: 10 mM Tris (pH 10,5):**
1,211 g Tris-Base in 1 l ddH₂O lösen; Solubilisierungs-Lösung ist eine **ungepufferte** Lösung, der pH-Wert wird nicht eingestellt

Durchführung:

- 24 h vor der Behandlung mit zellschädigenden Substanzen mit 5×10^3 - 1×10^4 Zellen in 24-well-Kulturschalen in 0,5 ml Medium aussäen; dabei jede Probe als Vierfach-Bestimmung ansetzen
- Cytotoxizitäts-Behandlung durchführen (z.B. Suizidgen-Assay)
- Medium dekantieren, Kulturschalen auf Eis stellen
- Zellen jeder Kavität vorsichtig mit 500 µl vorgekühltem PBS waschen, Medium wieder abdekantieren
- Zellen fixieren: vorsichtig 200 µl eiskalte 10% TCA-Lösung zugeben
- für 30 min bei 4°C inkubieren
- Zellen vorsichtig 4x mit Leitungswasser waschen
- anschließend für mindestens 12 h (i.d.R. über Nacht) bei 40°C trocknen (die Kulturschalen können an diesem Punkt unbegrenzt gelagert werden)
- am nächsten Tag 250 µl 0.4%-(w/v) SRB-Lösung zugeben und für 10 min bei RT färben
- Färbelösung abdekantieren und Zellen mit 1%-Essigsäure-Lösung solange waschen, bis die Waschlösung farblos bleibt (ca. 3x waschen): die rotgefärbten Zellen sind nun erkennbar
- anschließend für mindestens 3-6 h (i.d.R. über Nacht) bei 40°C trocknen (die spektrophotometrische Messung sollte spätestens 48 h nach dem 2. Trocknen stattfinden)
- Kulturschalen auf Eis stellen
- SRB-Farbstoff durch Zugabe von 500 µl alkalischer Tris-Lösung (pH 10,5; 10 mM Tris) solubilisieren: Kulturschalen für 10 min auf Eis inkubieren
- gelöste Farbstofflösung in 96-well-Mikrotiterplatten (flacher Boden; Greiner) überführen: pro 24-well-Kavität jeweils 3 Aliquots á 80 µl transferieren
- OD-Werte im ELISA-Reader (Dynatech MR7000) bei 550 nm bestimmen (Referenz-Wellenlänge: 630 nm); nur Werte unter 1,8 OD-Einheiten liegen im linearen Bereich der Messung, gegebenenfalls muss mit alkalischer Tris-Lösung (pH 10,5; 10 mM) weiterverdünnt werden

2.2.5 FACS-Analyse

Bei der Durchflußcytometrie (*Fluorescence activated cell sorting analysis*; FACS-Analyse) werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom analysiert. Obwohl die Messrate bei einigen tausend Zellen pro Sekunde liegt, wird jede Zelle einzeln analysiert. Mit Hilfe dieser Methode können verschiedene Parameter einer Zelle gleichzeitig bestimmt werden, so dass es möglich ist, verschiedene Zelltypen aus einem Gemisch von Zellen zu quantifizieren und zu isolieren. Dazu wird aus lebenden oder fixierten Zellen eine Einzelzellsuspension hergestellt. Im FACS-Gerät passiert die Suspension als Tropfen-Strom einen Laser-Strahl. Jede Zelle streut das Laserlicht und emittiert durch die Anregung Fluoreszenzlicht.

Gleichzeitig werden dabei folgende Parameter bestimmt :

- Vorwärts-Streuung (*forward-scatter*): liefert Informationen über die Zell-Größe
- seitliche Streuung (*side-scatter*, 90°): liefert Informationen zur Granularität zellulärer Strukturen
- Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Wellenlängen

Mit Hilfe der Lichtstreuung können Zelltod, Zellaggregationen und Zelleigenfluoreszenz vom Fluoreszenzlicht unterschieden werden. Die Streuung reicht beispielsweise aus, um Leukozyten, Monozyten und Granulozyten aus Gesamtblut-Leukozytenproben zu isolieren. Ebenso können Zellen, die mit verschiedenen Anti-

körpern und dadurch gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind, quantifiziert und getrennt werden, womit z.B. Rückschlüsse auf Dichte von Oberflächenproteinen gezogen werden können. Ebenso ist die Detektion von verschiedenen fluoreszierenden Proteinen (GFP, CyanFP, RFP) oder Gesamtzell-DNA (Zellzyklus-Abhängigkeiten; Apoptose-Analyse) möglich.

Die FACS-Analysen wurden mit einem FACS-Calibur-Gerät (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels „CellQuest“-Software (Becton Dickinson).

Durchführung:

- Zellen trypsinieren, pelletieren und in ca. 500 µl PBS resuspendieren, so dass maximal 2×10^6 Zellen/ml in das FACS-Gerät gegeben werden
- anschließend in spezielle FACS-Röhrchen (Becton Dickinson) überführen
- vor der Messung Zellen auf Eis lagern und möglichst schnell (innerhalb von 1 h) vermessen
- durch Vergleich von Positiv- und Negativ-Kontrollen Detektionskanäle optimieren
- anschließend Messung der Proben, 8.000-20.000 Zellen auszählen; die Detektion der GFP-Fluoreszenz erfolgte im FL1-H-Fluoreszenzkanal (Anregungs-Wellenlänge: 488 nm)

2.2.6 Immunfluoreszenz-Färbung

Das verwendete Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung beruht auf Vorgaben des Labors von P. O'Hare, Marie Curie Research Institut (MCRI, UK), mit kleineren Modifikationen (Phelan *et al.* 1998). Die Fixierung der Zellen erfolgt dabei mit Methanol. Bei Färbung von Membran-Proteinen ist die Fixierung mit Paraformaldehyd und anschließende Solubilisierung mit Tritin X-100 vorteilhafter.

Materialien:

- **PBS**
- **Methanol**
- **Newborn Calf Serum (NCS)** (Life Technologies)
- **Blocklösung:**
450 ml PBS mit 50 ml Newborn Calf Serum (NCS) mischen
- **Primär-Antikörper-Verdünnungen:**
alle Verdünnungen werden in Blocklösung angesetzt:
 - polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen HSV-1 VP22¹⁵ (AGV30): 1:500
 - polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen *E. coli* CD¹⁶ (Rogulski *et al.* 1997): 1:500
 - polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen HSV-1 TK¹⁷: 1:100
 - monoklonale Maus-Antikörper gegen HSV-1 TK¹⁷ (4C8, 9G10, 10C11): 1:1.000
 - monoklonaler Maus-Antikörper gegen SV40 *large T-Antigen* (Santa Cruz Biotechnology): 1:200
 - monoklonaler Maus-Antikörper CMV-018-48151¹⁸ (Capricorn Products): 1:100
- **Sekundär-Antikörper-Verdünnungen:**
alle Verdünnungen werden in Blocklösung angesetzt:
 - FITC-konjugierter Antikörper anti-Maus-IgG (Vector): 1:100
 - Alexa546TM-konjugierter Antikörper anti-Kaninchen-IgG (Molecular Probes): 1:200
- **10x DABCO antifade reagent:**
1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-octan (DABCO) (Sigma-Aldrich);
DABCO schützt fluoreszierende Proben vor dem vorschnellen Ausbleichen;
25% (w/v)-Lösung in PBS; als 1,5 ml-Aliquots bei -20°C aufbewahren
- **Mowiol 40-88** (Sigma-Aldrich):
Mowiol ist ein „Harzlack“, der an der Luft fest wird;
2,4 g Mowiol 40-88 mit 6 g Glycerol mischen, 6 ml ddH₂O zugeben, mischen und bei RT setzen lassen;
12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 zugeben, mindestens 10 min bei 50°C erhitzen und anschließend 15 min bei 5000 xg zentrifugieren; Mowiol 40-88 löst sich nie komplett, der unlösliche Anteil abzentrifugiert; Überstand abnehmen und als 1,5 ml-Aliquots portionieren, bei -20°C aufbewahren.

¹⁵ freundlicherweise von P. O'Hare, MCRI, UK, zur Verfügung gestellt.

¹⁶ freundlicherweise von C. Richards, Glaxo-Wellcome, RTP, NC, USA, zur Verfügung gestellt.

¹⁷ von Dr. William Summers, Yale, USA, gegen Aufwandsentschädigung erhältlich.

¹⁸ erkennt die hCMV-Epitop-Sequenz ERKTPRVTTGG (CMV-ep).

- **mounting medium:**
1x DABCO antifade reagent (2,5% Endkonzentration) in Mowiol:
1:10-Verdünnung erst unmittelbar vor Gebrauch herstellen und bei 37°C vorinkubieren, da das Gemisch bei RT zu viskös ist, um pipettiert zu werden

Durchführung:

- Zellen in 6-well-Kulturschalen auf *coverslips* (Deckgläschen) aussäen
- einen Tag später Zellen transfizieren (s. 2.2.3) oder transduzieren (s. 2.3.1.4) bzw. co-plattieren
- zum Zeitpunkt der Färbung sollen die Zellen konfluent, aber nicht zu dicht sein; während der Färbeprozedur dürfen die Zellen nie austrocknen
- frische 6-well-Kulturschalen mit PBS füllen, die *coverslips* übertragen
- PBS abdekantieren
- Zellen mit eiskaltem Methanol für 15 min bei -20°C fixieren
- 2x mit PBS waschen
- Blocklösung auf die *coverslips* geben, für 30 min bei RT blocken
- Blocklösung abdekantieren, gut ausschütten, Flüssigkeitsreste absaugen
- primäre Antikörper-Lösung zugeben (50 – 100 µl/well ansetzen) und für 20 min bei RT inkubieren
- 2x mit PBS waschen
- kurz mit Blocklösung schwenken (setzt die Oberflächenspannung herab)
- sekundäre Antikörper-Lösung zugeben (50 – 100 µl/well ansetzen) und für 10 min bei RT inkubieren
- 2x mit PBS waschen
- „*mount & seal*“: frisches *mounting medium* auf einen Objektträger geben; *coverslip* auf der Seite ohne Zellen gut abtrocknen, restliche Flüssigkeit muss abgelaufen sein, dann *coverslip* langsam und vorsichtig luftblasenfrei auflegen, so dass die Zellen nach unten zu liegen kommen
- Objektträger können für einige Wochen im Dunkeln und bei 4°C aufbewahrt werden

2.3 Virologische Materialien und Methoden

2.3.1 Generierung rekombinanter Adenoviren

Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Viren mit einem linearen Genom von etwa 36 kb Länge. Eine schematische Darstellung des Genoms ist in Abbildung 2.1 gezeigt. Adenoviren sind unbehüllt und haben ein icosaedrisches Viruscapsid, aufgebaut aus den Kapsid-Proteinen Hexon, Penton und Fiber. Für den Gentransfer werden hauptsächlich die Serotypen 2 und 5 verwendet, die nicht onkogen wirken. Der zeitliche Verlauf einer Adenovirus-Infektion wird in eine frühe und eine späte Phase eingeteilt, die nach dem Start der Replikation beginnt. Vor Beginn der Virusreplikation werden die Gene E1-E4 der frühen Regionen transkribiert. Die E1A-Genprodukte werden dabei zuerst synthetisiert. Sie fungieren als Regulatoren der Transkription und sind für die Aktivierung der restlichen frühen Gene notwendig. Die E2-Region kodiert für Proteine, die für die Virusreplikation benötigt werden, z.B. die DNA-Polymerase. Die Gene der späten Regionen kodieren für Strukturproteine, die für den Zusammenbau der Viruspartikel benötigt werden.

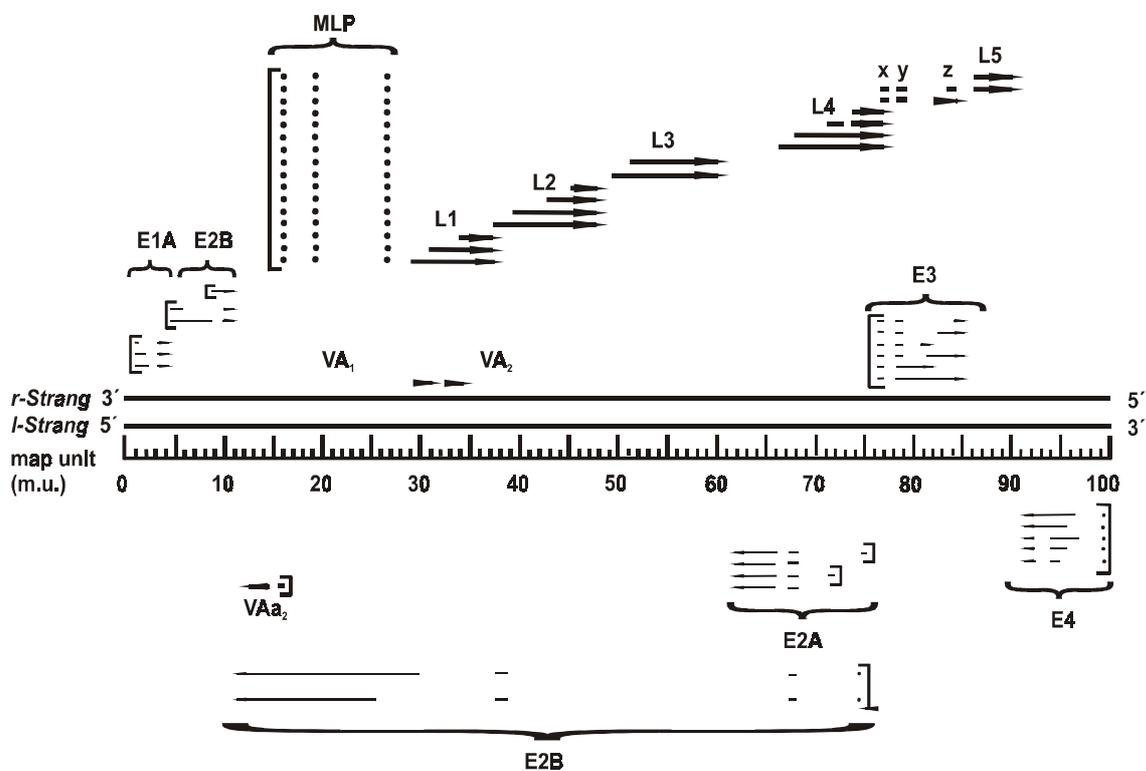


Abbildung 2.1: Adenovirales Genom und Transkriptionseinheiten.

Die doppelsträngige DNA des adenoviralen Genoms ist durch die zwei Linien in der Mitte der Abbildung dargestellt. Das Genom ist in *map units* (m.u.) aufgeteilt, ein *map unit* entspricht ca. 360 bp. Die Pfeile stellen die gebildeten mRNAs unter Angabe der Transkriptionsrichtung dar. Das Genom ist in 4 frühe Transkriptionseinheiten (*early*, E1-E4, dünne Pfeile) und 5 späte Einheiten (*late*, L1-L5, dicke Pfeile) eingeteilt, die von einem einzigen Promotor transkribiert werden (*Major Late Promoter*, MLP). Abbildung nach Hitt *et al.* 1995, modifiziert nach Groß, 2000.

Bei der Verwendung rekombinanter Adenoviren als Genfähren muss gewährleistet sein, dass keine Replikationen in den Zielzellen stattfindet, die Virus-Partikel also replikationsdefizient sind. Dies wird erreicht durch Entfernen der E1A-E1B-Region: stellt man die darin enthaltenen Gene *in trans* zur Verfügung, werden replikations-defektive Adenoviren erzeugt (Jones & Shenk, 1979). Da für die Bildung vollständiger adenoviraler Partikel das komplette Genom in einer Zelle vorliegen muss, kann eine Replikation ausschließlich in Zelllinien stattfinden, die die E1-Gensequenzen *in trans* bereitstellen. In 293- (s. 2.2.1; Louis *et al.* 1997; Aiello *et al.* 1979; Graham *et al.* 1977; Graham *et al.* 1974), 911- (Fallaux *et al.* 1996) oder PER-C6-Zellen (Fallaux *et al.* 1998) ist die E1-Gensequenz stabil ins Genom integriert, so dass die Vermehrung von infektiösen, aber replikationsdefizienten adenoviralen Partikeln ermöglicht wird. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Viruspropagation die E1A-E1B-komplementierende 293-Zelllinie verwendet.

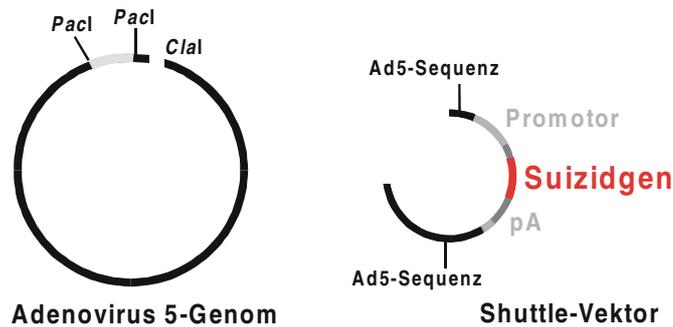
2.3.1.1 Herstellung rekombinanter Adenoviren durch homologe Rekombination in *E.coli* BJ5183

Wegen der beträchtlichen Größe des Adenovirus-Genoms und der daraus resultierenden Häufigkeit von Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen ist es schwierig, rekombinante Gene direkt in das Virusgenom hineinzuklonieren. Durch die Methode der homologen Rekombination (Graham & Prevec 1995; Hitt 1994) wird diese Schwierigkeit umgangen. Hierzu wird das zu transferierende Fremdgen zunächst in ein Plasmid kloniert, das eine Expressionskassette mit geeignetem Promotor und Polyadenylierungssignalen enthält. Diese Expressionskassette wird von adenoviralen Sequenzen flankiert (0-1 m.u. bzw. 9-16 m.u.). Das rekombinante Plasmid wird anschließend linearisiert und mit dem Adenovirus5-Genom in 293-Zellen co-transfiziert. In den Zellen kann durch homologe Rekombination rekombinantes Virus entstehen. Jedoch tritt bei dieser Methode ein starker Hintergrund von Wildtyp-Adenoviren auf, da adenovirale DNA auch ohne Rekombination die Virusproduktion in transfizierten Zellen bewirken kann. Um diese Problematik zu umgehen, machte man sich die Tatsache zunutze, dass adenovirale DNA auch in zirkulärer Form infektiös ist (Graham 1984; Ghosh *et al.* 1986). Dies ermöglichte die Weiterentwicklung der Rekombinationsmethode: die Adenovirus-DNA liegt in Plasmidform vor und ist somit leichter manipulierbar.

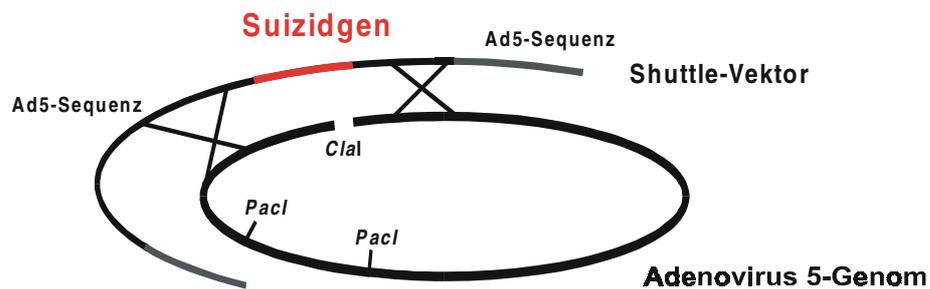
Um das Auftreten unerwünschter Wildtyp-Genome nach Transfektion in 293-Zellen zu verringern, gibt es verschiedene Strategien. Die Insertion eines Selektionsmarkers sowie eines bakteriellen Replikationsursprungs (ORI) im E1-Bereich ermöglicht zum einen die Vermehrung in *E. coli* und führt außerdem dazu, dass das daraus entstehende Adenovirus-Genom die verpackbare Größe überschreitet; es können hieraus keine infektiösen Viruspartikel mehr entstehen. Zum zweiten ist im Rekombinationsplasmid die Expressionskassette inklusive Transgen nicht zusätzlich, sondern anstelle der deletierten E1-Sequenz kloniert: folglich entsteht nach einem Rekombinationereignis ein rekombinantes Adenovirus-Genom, das die verpackbare Genomgröße nicht überschreitet (Graham & Prevec 1995). Trotz der verbesserten Methodik entstehen bei der Rekombination in 293-Zellen häufig Wildtypviren als Verunreinigung. Dies erfordert arbeitsaufwändiges Reinigen und Charakterisieren der erhaltenen Virus-Plaques.

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl an alternativen Protokollen beschrieben, in denen die homologe Rekombination nicht mehr in 293-Zellen, sondern in *E. coli* stattfindet (Chartier *et al.* 1996). Dabei macht man sich die effiziente homologe Rekombination im Bakterienstamm *E. coli* BJ5183 zunutze (s. 2.1.2). Ausgangspunkt dieser Methode sind zwei Plasmide. Das erste enthält das vollständige Adenovirus 5-Genom. Das zweite Plasmid dient als Rekombinationsplasmid, welches adenovirale Gensequenzen enthält, die die Expressionskassette flankieren. Der E1-Genbereich (ca. 1,3 - 9,2 m.u.) ist dagegen deletiert. Nach Co-Transformation dieser zwei Plasmide (effizienter in linearisierter Form) erhält man Bakterienklone, in denen das rekombinierte Plasmid in zirkulärer Form vorliegt. Abschließend wird diese rekombinante Adenovirus-DNA in 293-Zellen transfiziert, so dass rekombinante Adenovirus-Partikel entstehen, die nachfolgend vermehrt und gereinigt werden. Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte der homologen Rekombination in *E. coli* BJ5183 ist in Abbildung 2.2 gezeigt.

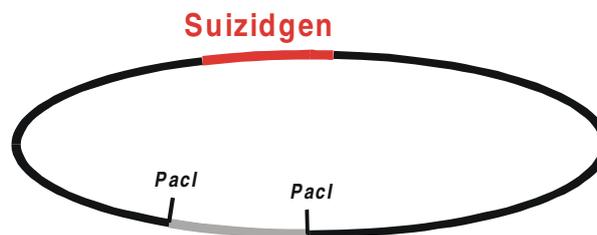
1. Linearisierung der Ausgangsplasmide



2. Homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183



3. Rekombinantes adenovirales Genom



4. Linearisierung mit *Pac I*



5. Transfektion in 293-Zellen

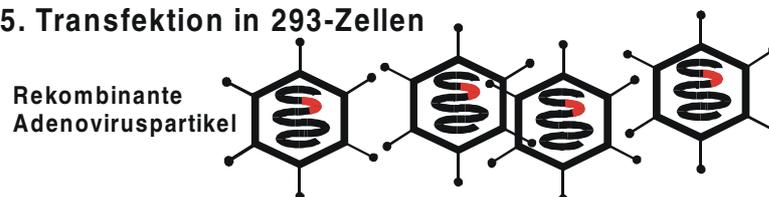


Abbildung 2.2: Herstellung rekombinanter Adenoviren durch homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183

Arbeitsschritte: 1. Linearisierung des adenoviralen Genom-Plasmids mit *ClaI*; Linearisierung des Rekombinationsplasmids; 2. Co-Transformation der linearisierten Plasmide in *E. coli* BJ5183; durch homologe Rekombination entsteht ein zirkuläres Plasmid; 3. Isolierung der Plasmid-DNA, Charakterisierung durch Restriktionsverdau; anschließend Transformation in den Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue; 4. Isolierung der Plasmid-DNA und Restriktionsverdau des rekombinanten Plasmids mit *PacI*; 5. Transfektion des linearisierten Plasmids in 293-Zellen, Bildung rekombinanter Adenoviren; modifiziert nach Groß, 2000.

Durchführung:

- **Linearisierung des Genom-Plasmids pTG 3602:**

Die bei der Co-Transformation eingesetzten Plasmide werden linearisiert, um das Wachstum von Hintergrundkolonien zu verhindern, das durch ungeschnittene Ausgangsplasmide verursacht wird. Die Vermehrung des Plasmids pTG3602 (s. 2.1.1) erfolgt im Bakterienstamm *E. coli* JM110 (s. 2.1.2), da die Linearisierung mit dem methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym *Cla*I erfolgt. Der *Cla*I-Verdau erfolgt über Nacht, anschließend wird das Enzym bei 65°C für 20 min hitzeinaktiviert. Die Plasmidlösung wird mit ddH₂O auf 10 ng/μl verdünnt, wovon 1-5 μl pro Transformation eingesetzt werden.
- **Linearisierung des Rekombinationsplasmids:**

Das Rekombinationsplasmid wird mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten, deren Schnittstellen außerhalb der adenoviralen Sequenzbereiche liegen; der ORI muss in jedem Fall entfernt werden; der Restriktionsverdau erfolgt über Nacht, die entstandenen Fragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt, das gewünschte Fragment eluiert (s. 2.1.12) und die Konzentration ermittelt. Die Plasmidlösung wird mit ddH₂O auf 100 ng/μl verdünnt, wovon 1-5 μl pro Transformation eingesetzt werden.
- **Co-Transformation:**

Bei der Co-Transformation in den Bakterienstamm *E. coli* BJ5183 (s. 2.1.2) sollte das molare Verhältnis von adenoviralem Plasmid pTG3602 und dem Rekombinationsplasmid etwa 1:10 betragen. Vom Plasmid pTG 3602 sollten höchstens 10-50 ng eingesetzt werden. Die Transformation erfolgt nach dem Standardprotokoll (s. 2.1.4). Zur Überprüfung auf vollständige Restriktion bzw. noch vorhandenen Hintergrund an ungeschnittenen Plasmidmolekülen dienen Kontrollansätze, die jeweils nur eines der Plasmide enthalten. Die Transformationseffizienz der kompetenten *E. coli* BJ5183-Bakterien muss sehr hoch sein und mindestens 10⁹ Kolonien/μg Plasmid-DNA betragen.
- **Screening der Bakterienklone:**

Die nach der Co-Transformation erhaltenen Bakterienklone werden durch analytischen Restriktionsverdau charakterisiert. Dazu werden die Klone in Flüssigmedium über Nacht angezogen, je 2 ml Bakterien-suspension werden für eine Mini-Präparation der Bakterien-DNA (s. 2.1.6.1) eingesetzt. Die erhaltene DNA wird in 12 μl ddH₂O gelöst, wovon 8 μl für einen Kontrollverdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym verwendet werden (s. 2.1.8). Da das durch homologe Rekombination entstandene Plasmid eine Größe von etwa 40 kb aufweist, liefert ein Restriktionsverdau meist eine Vielzahl von DNA-Fragmenten. Deshalb müssen die Restriktionsenzyme so ausgewählt werden, dass gegenüber den Ausgangsplasmiden eindeutig erkennbare Fragmentbanden (meist im Größenbereich von 4 - 5 kb) neu entstehen oder nicht mehr vorhanden sind.
- **Transformation in *E. coli* XL1-Blue:**

Um weitere Rekombinationsereignisse zu vermeiden, werden die verbliebenen 4 μl der Plasmid-DNA sofort in den Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue (s. 2.1.2) transformiert (s. 2.1.4). Die erhaltenen Bakterienklone werden erneut mittels Mini-Präparation und anschliessendem analytischem Restriktionsverdau untersucht. Rekombinante Plasmide werden durch Maxi-Präparationen vermehrt (s. 2.1.6.2).
- **Transfektion in 293-Zellen:**

Die rekombinanten Plasmide werden über Nacht einem Restriktionsverdau mit *Pac*I unterzogen; das Enzym wird anschließend für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Das hierdurch linearisierte rekombinante Plasmid wird in 293-Zellen transfiziert (s. 2.2.3.2). In 293-Zellen werden rekombinante Adenoviren gebildet; etwa 10 Tagen nach der Transfektion können die ersten durch Zell-Lyse entstandenen Plaques beobachtet werden. Nach vollständiger Lyse des Zellrasens wird der Überstand gesammelt und zur weiteren Viruspropagation verwendet.

2.3.1.2 Propagation rekombinanter Adenoviren

2.3.1.2.1 Herstellung von Rohextrakt

Um eine hohe Transduktionseffizienz zu erzielen, erfolgt die Transduktion von Zellen mit Adenoviren in einem möglichst geringem Volumen in Serum-reduziertem Opti-MEM für 1 h bei 37°C. Um alle Zellen der Kultur gleichzeitig zu infizieren und somit eine synchrone Propagation zu erhalten, sollte zur Herstellung von Adenovirus-Rohextrakt eine *Multiplicity of Infection* (MOI) von mindestens 10 eingesetzt werden.

Materialien:

- **293-Zellen**
- **Adenovirus-Lösung**
- **DMEM** (Life Technologies) mit und ohne hitzeinaktiviertes FCS

- **Opti-MEM** (Life Technologies)
- **10 mM Tris, pH 8,0 mit 10 % (w/v) Glycerol**

Durchführung:

- in 15 cm-Zellkulturschalen (Greiner Labortechnik) 293-Zellen aussäen und bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultivieren
 - Zellen mit Adenoviren (gereinigte Lösung oder Rohextrakt) in 5 ml serumfreiem Medium für 1 h bei 37°C infizieren; anschließend 20 ml serumhaltiges Kulturmedium zugeben und bei 37°C inkubieren
 - nach etwa 48 h erscheinen die Zellen abgerundet, aber noch nicht von der Unterlage abgelöst; zu diesem Zeitpunkt der Infektion ist die Synthese der Viruspartikel bereits abgeschlossen, die Zellyse hat aber noch nicht begonnen, d.h. die Viren befinden sich noch in den Zellen.
 - Zellen mittels eines Costar-Zellschabers (Corning) vom Boden des Kulturgefäßes ablösen
- alle weiteren Reinigungsschritte erfolgen bei 4°C:
- Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführen, Zellen für 10 min bei 500 g sedimentieren
 - Zellpellet in einem kleinen Volumen 10 mM Tris, pH 8,0 mit 10 % Glycerol aufnehmen; von 20 Zellkulturschalen werden etwa 10 ml des Rohextraktes erhalten
 - zur Lagerung Rohextrakt bei -20°C bzw. zur langfristigen Aufbewahrung bei -80 °C einfrieren

2.3.1.2.2 Herstellung gereinigter Adenovirus-Lösungen durch CsCl-Zentrifugation

Materialien:

- **10 mM Tris, pH 8,0**
- **10 mM Tris, pH 8,0 mit 10 % (w/v) Glycerol**
- **CsCl-Lösung, Dichte: 1,34 g/cm³:**
48,3 g CsCl (Biomol) in 100 ml 10 mM Tris, pH 8,0 lösen
- **CsCl-Lösung, Dichte: 1,43 g/cm³:**
71,7 g CsCl (Biomol) in 100 ml 10 mM Tris, pH 8,0 lösen
- **Adenovirus-Rohextrakt** (s. 2.3.1.2.1)
- **Dialyseschlauch 3/4“ x 25 Feet** (Life Technologies):
mehrmals mit sterilem ddH₂O spülen, um das in der Lagerungsflüssigkeit enthaltene Methanol und Azid zu entfernen
- **Polyallomer Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen** (39 ml Volumen, 25 x 89 mm; Beckman Instruments)
- **Zentrifugationsröhrchen-Verschweiß-Gerät Tube Topper** (Beckman Instruments)
- **Kanülen: Sterican 0,9 x 40 mm** (B. Braun, Melsungen)

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte der Virusreinigung erfolgen bei 4 °C, Lösungen und Zentrifuge werden vorgekühlt.

- Aufschluss der Zellen und Freisetzung der Viren:
Rohextrakt 3 Frier/Tau-Zyklen im Ethanol/Trockeneisbad bzw. im 37°C Wasserbad unterwerfen
- Zellreste für 15 min bei 3000 g abzentrifugieren, Pellet verwerfen; die Viruspartikel befinden sich nun im Überstand, der einer weiteren Reinigung unterzogen wird
- Polyallomer *Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen* (39 ml Volumen, 25 x 89 mm, Beckman Instruments) mit 11,6 ml CsCl-Lösung (Dichte: 1,43 g/cm³) sowie 17,4 ml CsCl-Lösung (Dichte: 1,34 g/cm³) befüllen
- anschließend 10 ml des Adenovirus-Rohextraktes einfüllen; jeweils 2 Zentrifugenröhrchen mit Tris-Puffer austarieren und verschweißen (*Tube Topper*, Beckman Instruments)
- CsCl-Gradient für 3 h bei 100.000 g zentrifugieren (Ultrazentrifuge Optima L-70, Rotor Ti 70; Beckman Instruments); nach der Zentrifugation ist eine opaleszierende Virusbande zu erkennen
- Zentrifugenröhrchen mit einer Kanüle belüften, mit einer weiteren Kanüle Virusbande vollständig abziehen
- neues Zentrifugenröhrchen mit 11,6 ml CsCl-Lösung (Dichte: 1,43 g/cm³) sowie 17,4 ml CsCl-Lösung (Dichte: 1,34 g/cm³) befüllen und Viruslösung überführen
- CsCl-Gradient erneut für 24 h bei 100.000 g zentrifugieren
- die nach der Zentrifugation sichtbare Virusbande in einem möglichst kleinen Volumen abziehen, um eine maximale Viruskonzentration zu erreichen
- anschließend Viruslösung in einen Dialyseschlauch geben, der mit Klemmen verschlossen wird

- Dialyse über Nacht gegen 10 mM Tris, pH 8,0 mit 10 % (w/v) Glycerol, wobei der Dialysepuffer zweimal gewechselt wird
- Ausbeute: 2-3 ml gereinigte Viruslösung
- gereinigte Viruslösung aliquotieren und bei -80°C lagern

2.3.1.3 Plaque-Assay zur Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren

Um den Virustiter einer gereinigten Adenovirus-Lösung zu ermitteln, wird ein sogenannter „Plaque-Assay“ durchgeführt. Die entstehenden Plaques werden anschließend fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

Materialien:

- **293-Zellen**
- **gereinigte Adenovirus-Lösung** (s. 2.3.1.2.1)
- **Opti-MEM** (Life Technologies);
- **2x DMEM:**
20 ml 10x DMEM
6 ml NaHCO₃, 7,5% (Life Technologies),
10 ml FCS, hitzeinaktiviert
mit sterilem ddH₂O auf 100 ml auffüllen
- **Agarose-Lösung 2 % (w/v)** (*SeaPlaque* GTG Agarose, FMC BioProducts) in ddH₂O

Durchführung:

- je 6x10⁵ 293-Zellen in 5 cm-Petrischalen aussäen
- am folgenden Tag bei ca. 70% Konfluenz **Infektion mit Adenoviren:** zunächst aus der gereinigten Viruslösung mit Opti-MEM eine Verdünnungsreihe (jeweils 1 ml) bis Log-Stufe 10⁻¹¹ herstellen; eine Auswertung ist im Bereich von 10 - 100 Plaques pro Platte möglich, deshalb sollte mindestens eine der Verdünnungsstufen eine Plaque-Anzahl in diesem Bereich ergeben
- von den zu infizierenden 293-Zellen Medium abnehmen und Zellen mit Opti-MEM waschen
- anschließend je 1 ml der Virusverdünnungen auf die Zellen einer Schale geben
- Infektion der 293-Zellen für 4 h bei 37°C
- in der Zwischenzeit Agarose-Medium aus 2x DMEM-Medium und Agarose-Lösung (Verhältnis 1:1) herstellen und auf 42°C temperieren: Endkonzentration an Agarose beträgt 1 %
- anschließend pro Petrischale 10 ml Agarose-Medium zugeben und die Zellen bei 37°C inkubieren
- Plaques erscheinen nach 7-10 Tagen
- Fixierung und modifizierte **Kristallviolett-Färbung** der Zellen (s. 2.2.2.6) nach 10-14 Tagen
- auf die mit Agarose-Medium überschichteten Zellen pro 6 cm-Kulturschale 5 ml TCA, 5% (w/v) geben und bei RT für 15-45 min fixieren
- Fixierlösung mit der Agaroseschicht vorsichtig abdekantieren und die fixierten Zellen 2x mit 5 ml Wasser pro 6 cm-Kulturschale waschen
- Färbung mit 5 ml Kristallviolett-Lösung für 15 min bei RT
- anschließend Färbelösung abnehmen und Schalen so lange mit Wasser waschen, bis aller überschüssiger Farbstoff entfernt ist
- Kulturschalen bei RT trocknen und die Plaques auszählen
- der Virustiter wird in *plaque forming units* (pfu) angegeben und nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Virustiter (pfu/ml)} = \text{Plaques pro Petrischale} / \text{Verdünnungsstufe}$$

2.3.1.3 Untersuchung rekombinanter Adenoviren auf RCA

Unter dem generellen Sicherheitsaspekt des Arbeiten in S2-Gentechnik-Labors sowie im Hinblick auf einen eventuellen Einsatz von rekombinanten Adenoviren in präklinischen Studien müssen Virus-Präparationen nach der Reinigung auf eventuell vorhandene Wildtyp-Viruspartikel (*replication competent adenovirus*; RCA) untersucht werden. Um sicherzustellen, dass verwendete Adenovirus-Präparationen frei von Wildtyp-Verunreinigungen sind, jedoch das rekombinante Transgen enthalten, wird eine PCR durchgeführt. Mit dieser sensitiven Methode kann ein Wildtyp-Viruspartikel in 10⁹ pfu nachgewiesen werden (Zhang *et al.* 1995).

2.3.1.3.1 Isolierung der adenoviralen DNA

Materialien:

- **gereinigte Adenovirus-Lösung**
- **Proteinase K-Lösung:**
 - 10 mM Tris
 - 10 mM EDTA
 - 0,5 % (w/v) SD
 - 100 µg/ml Proteinase K (Roche Diagnostics);
 - pH-Wert mit 0,1 M HCl auf 7,5 einstellen
- **Aquaphenol (Roth)**
- **Chloroform/Isoamylalkohol (49:1)**
- **3 M Natriumacetat, pH 8,0**
- **Ethanol, 100 %**
- **Ethanol, 70 % (w/v)**

Durchführung:

- 50 µl der gereinigten Adenovirus-Lösung in einem Reaktionsgefäß mit 500-1000 µl Proteinase K-Lösung versetzen und für 1 h bei 56 °C inkubieren
- anschließend 1 Vol. Phenol zugeben, Gemisch 10 sec kräftig schütteln und 5 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugieren
- nach der Zentrifugation befindet sich die DNA in der wäßrigen Phase, während die Proteine in der Interphase und der organischen Phase zu finden sind; die obere, wäßrige Phase vorsichtig abnehmen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführen
- erneut mit 1 Vol. Phenol mischen und wie oben zentrifugieren
- erneut wäßrige Phase vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführen
- weiterer Extraktionsschritt mit Chloroform/Isoamylalkohol: 1 Vol. des organischen Gemisches zugeben, Gefäß schütteln und wie oben zentrifugieren
- wäßrige Lösung in ein frisches Reaktionsgefäß überführen und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 8,0, sowie 2,5 Vol. 100 % (w/v)-Ethanol versetzen
- Fällung für 30 min bei -80°C
- danach DNA für 10 min bei 4°C und 10000 g pelletieren
- DNA-Pellet mit 200 µl 70 % (w/v)-Ethanol waschen und bei RT trocknen
- abschließend in einem geeignetem Volumen sterilem ddH₂O lösen

2.3.1.3.2 PCR der E1A- und E2B-Genregion

Die PCR wird gleichzeitig mit zwei Primerpaaren¹⁹ durchgeführt, ein Primerpaar bindet im E1A-Bereich und detektiert Wildtyp-Viren. Rekombinante Adenoviren sind in diesem Bereich deletiert. Als interne Kontrolle dient ein zweites Primerpaar, das in der E2B-Region bindet (Zhang *et al.* 1995).

Materialien: siehe 2.1.14.2 (Standard-PCR-Reaktion)

Durchführung: siehe 2.1.14.2, PCR-Bedingungen nach Zhang *et al.* 1995.

2.3.1.4 Transduktion von adhärennten Zellen mit rekombinanter Adenoviren

Die Transduktion von adhärennten Zellen erfolgt in möglichst geringen Volumina, um eine hohe Transduktionseffizienz zu erreichen. Das Virus wird in Serum-reduzierten Medium (Opti-MEM; Life Technologies) zur benötigten *Multiplicity of Infection* (MOI) verdünnt, auf die Zellen gegeben und bei für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Viruslösung entfernt und durch serumhaltiges Medium ersetzt. Die Inkubationszeit von 1 h reicht für die Adsorption und den Eintritt der Adenoviren in die Wirtszelle aus, da diese Vorgänge sehr effizient und schnell ablaufen.

¹⁹ Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet.

2.3.2 Generierung rekombinanter Retroviren

Bei Gentransfer-Systemen auf retroviraler Basis muß sichergestellt sein, dass das rekombinante Retrovirus, welches als Genfahre dient, nicht mit replikationskompetentem Wildtyp-Virus verunreinigt ist. Um diesem Sicherheitsaspekt gerecht zu werden, macht man sich zunutze, dass bei der Bildung retroviraler Partikel die zu verpackende retrovirale RNA ein *trans*-Element sein kann. Sogenannte **Verpackungszelllinien** sind in der Lage, alle retroviralen Proteine zu synthetisieren. Verpackungsfähige retrovirale Wildtyp-RNA wird jedoch nicht gebildet. Grund hierfür ist eine Deletion im Verpackungssignal des Retrovirus-Genoms, welches stabil im Genom der Verpackungszelllinie integriert ist. Die Verpackungszelllinie wird nun mit einem Plasmid transfiziert, das auf **cDNA**-Ebene die Information für eine verpackungsfähige RNA besitzt, jedoch keine kodierenden Sequenzen der virale Proteine trägt. Statt dessen enthält sie ein Fremdgen („Transgen“), z.B. Neo^r als Selektionsmarker (verleiht G418-Resistenz) oder GFP als Reportergen, das unter der Kontrolle eines starken (nicht-viralen) Promotors steht. Nach Transfektion wird die cDNA in RNA umgeschrieben, so dass nun retrovirale Partikel gebildet werden, die „infektiös“, aber replikationsdefizient sind. Mit diesen rekombinanten Retroviren können nun geeignete Zielzellen transduziert werden. Der Erfolg der Transduktion kann dabei über die Expression des Selektionsmarkers kontrolliert werden (z. B. durch Selektion der transduzierten Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum). Als Verpackungszelllinien werden die Zelllinien PE501, PA317 (Miller & Buttimore 1986; Miller 1993) sowie Phoenix-eco und Phoenix-ampho (Achacoso *et al.* 1996) eingesetzt. Als retrovirale Basis-Vektoren dienen pLXSN (s. 2.1.1.1; Miller & Rosman 1989) sowie pWZLneo (s. 2.1.1.2; Rogulski *et al.* 1997; Morgenstern & Land 1990) und davon abgeleitete Konstrukte.

2.3.2.1 Retrovirale Verpackungszelllinien

2.3.2.1.1 PE501 und PA317: Verpackungszellen der zweiten Generation

Zur Herstellung der ersten retroviralen Verpackungszelllinien wurde lediglich das Verpackungssignal in der retroviralen DNA deletiert, so dass häufig das Auftreten von replikationskompetenten Retroviren beobachtet wurde. Daher wurden bei Verpackungszellen der zweiten Generation weitere Veränderungen der retroviralen DNA vorgenommen, um die Wahrscheinlichkeit herabzusetzen, dass durch homologe Rekombination mit dem transfizierten Vektor replikationsfähige Helfer-Viren entstehen. Bei der Herstellung der Zelllinien PE501 und PA317 wurden die Sequenzhomologien zu pLXSN auf ein Minimum begrenzt (Miller & Buttimore 1986). Dies gelang durch Deletion der *env*-Region und eines Teils der *pol*-Region und Ersatz durch das *env*-Gen des amphotropen Virus 4070A, sowie zusätzlich durch Ersatz des 3'-LTRs durch die polyA-Region von SV40 und teilweise Deletion des 5'-LTRs (s. Abbildung 2.3). Es verbleibt eine homologe Region von 59 bp der viralen DNA in PA317 und pLXSN, sowie ein Bereich am 3'-Ende des Verpackungssignals. Abbildung 2.3 zeigt die wesentlichen Merkmale des MoMLV-Wildtyp-Virus sowie der viralen Sequenzen der Verpackungszelllinien PE501 bzw. PA317 und des Transfervektors pLXSN.

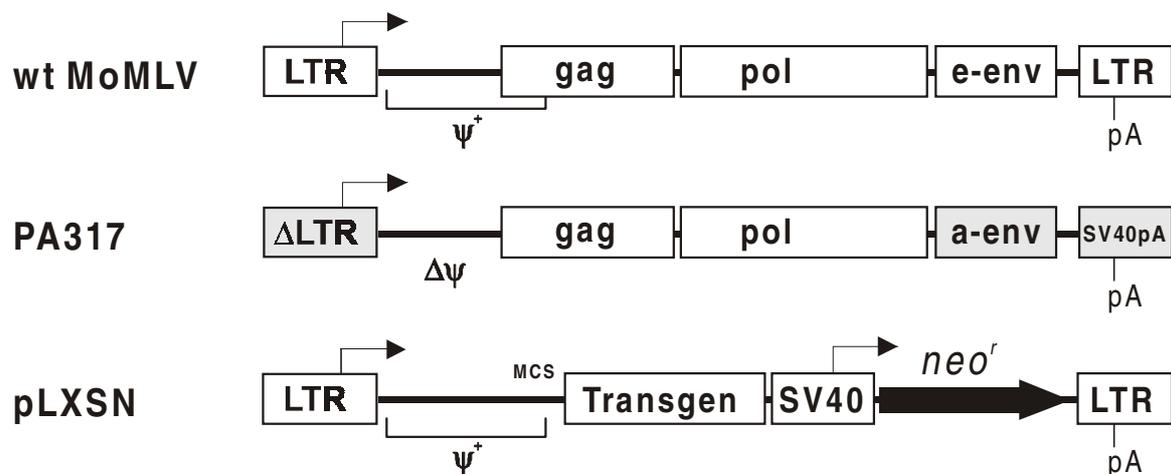


Abbildung 2.3: Vergleich der retroviralen Sequenzen von wt MoMLV, PA317 und pLXSN. (Erläuterungen umseitig).

Erläuterung der Abkürzungen in Abbildung 2.3:

LTR: retroviraler *Long Terminal Repeat*; Δ LTR: LTR mit 5'-Deletion; retrovirales Verpackungssignal Ψ ; $\Delta\Psi$: deletiertes Verpackungssignal; pA: Polyadenylierungssignal; SV40: early Enhancer/Promotor aus SV40; neo^r: Neomycin-Resistenz-Gen (Aminoglycosid-Phosphotransferase aus Tn5).

2.3.2.1.2 Phoenix-eco und Phoenix-ampho: Verpackungszellen der dritten Generation

Phoenix-Zellen (Achacoso *et al.* 1996) sind sowohl in Bezug auf die Sicherheit als auch auf die erreichbaren Virus-Titer den oben beschriebenen Verpackungszelllinien PE501 und PA317 überlegen. So befinden sich die retroviralen Gene nicht mehr auf einem einzigen Konstrukt, sondern die Expression von *gag* und *pol* einerseits und *env* andererseits erfolgt separat. Der 5'-LTR wurde vollständig durch einen RSV-Promotor (*gag-pol*-Konstrukt) bzw. CMV-Promotor (*env*-Konstrukt) ersetzt. Weiterhin lassen sich Phoenix-Zellen, die von 293 Zellen abgeleitet sind, viel besser transfizieren als die von Mäusefibroblasten abgeleiteten Linien PE501 und PA317, wodurch sich entsprechend höhere Virus-Titer erzielen lassen.

2.3.2.2 Generierung transienter Retrovirus-Produzentenzellen und Transduktion adhärenter Zellen mit rekombinanter Retroviren

Retrovirale Verpackungszelllinien sezernieren mehrere Tage nach Transfektion von Transfervektoren retrovirale Partikel in den Kulturüberstand. Retroviren besitzen auf Grund ihrer Lipidhülle eine negative Nettoladung auf ihrer Oberfläche, die zu Abstoßungsreaktionen zwischen den viralen Partikeln und den Zellen führt. Der Zusatz von Polybrene (Hexadimethrin-Bromid), einem positiv geladenem quartären-Aminium-Polykation, führt zu einem Ladungsausgleich auf den Zelloberflächen und führt zu Steigerungen der Transduktionsraten um das 10-100-fache, verglichen mit Transduktionen ohne Polybrene-Zusatz. Da die viralen Partikel nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden besitzen und nur durch Diffusion die Rezeptoren ihrer Zielzellen erreichen, muss die Diffusionsstrecke so gering wie möglich gehalten werden. Die Verwendung von 1 ml viralem Kulturüberstand für die Transduktion von Zielzellen in 6-well-Kulturgefäßen und 60 mm-Petrischalen ist der hier gewählte Kompromiss zwischen der notwendigen Bedeckung der Zielzellen mit Medium und einer möglichst kurzen Diffusionsstrecke. Die Transduktion erfolgt durch Zugabe des Kulturüberstandes auf Zielzellen in der maximalen Wachstumsphase. Die Inkubation der Zielzellen im Zellkultur-Brutschrank für 3-4 h wurde aus Praktikabilitäts-Gründen bei Standard-Bedingungen (36,5°C) durchgeführt, obwohl gezeigt wurde, dass Bildung der Retrovirus-Partikel und Transduktion bei niedrigeren Temperaturen (32°C) effektiver verlaufen.

Materialien:

- **Sterilfilter** mit Durapore-Membran (Millipore), 0,45 µm Porenweite
- **100x Hexadimethrin-Bromid** („Polybrene“) (Fluka):
8 g Polybrene in 10 ml ddH₂O lösen, sterilfiltrieren, Aliquots zu 1 ml bei -20°C lagern
- normales Kulturmedium mit 5-10% FCS

Durchführung der Transfektion (vergleiche auch 2.2.3):

- einen Tag vor Transfektion 5x10⁵ PE501 oder PA317-Zellen in 6 cm-Kulturschalen aussäen; Phoenix-eco oder -ampho-Zellen zwei Tage vor Transfektion aussäen (3x10⁵ Zellen pro Schale)
- Verpackungszelllinie mit ca. 3 µg retroviralen Vektors per Lipofektion transfizieren (s. 2.2.3)
- 24 h nach der Transfektion Medium erneuern
- 48 h nach der Transfektion Medium, das die rekombinanten Retroviren enthält, abnehmen
- Überstand 5 min mit 3000 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor) bei 4 °C zentrifugieren, oder durch einen 0,45 µm Sterilfilter mit niedriger Proteinbindung (Millipore) filtrieren (zum Abtrennen von Zellen und Zelltrümmern)
- transfizierte Zellen entweder erneut mit frischem Medium überschichten, um nochmals Virus-haltiges Medium zu gewinnen oder verwerfen
- retroviralen Überstand sofort zur Transduktion von Zielzellen verwenden (s.u.) oder bei -80 °C lagern

Durchführung der Transduktion:

- frischer oder aufgetauter viraler Überstand in mehreren Log-Stufen verdünnen (z.B. 1:1, 10, 100, 1000) und mit den entsprechenden Volumina 100x Polybrene mischen

- Kulturmedium von den Zielzellen entfernen und Zielzellen mit 1 ml (bei 6-well-Kulturgefäßen oder 60 mm-Petrischalen) viralem Überstand oder entsprechenden Verdünnungen überschichten
- 3-4 h bei Standard-Bedingungen (36,5°C) im Brutschrank inkubieren
- dann 1 ml frisches Kulturmedium zugeben
- für die Titerbestimmung durch Selektion Zielzellen 24 h nach Transduktion splitten (s. 2.3.2.3.1)
- die Titerbestimmung durch FACS-Analyse erfolgt 2-4 Tage nach Transduktion (Analyse der sichtbaren GFP-Expression; s. 2.3.2.3.2)

2.3.2.3 Bestimmung des retroviralen Titers

Die Bestimmung des retroviralen Titers erfolgt in Abhängigkeit des Markergens, das im retroviralen Vektor enthalten ist. In den üblicherweise verwendeten Vektoren ist meist ein Antibiotikum-Resistenzgen wie z.B. Neo^r (Aminoglykosid-Phosphotransferase: Neomycin- bzw. G418-Resistenz) oder Puro^r (Puromycin-Acetyltransferase: Puromycin-Resistenz) enthalten. Zum anderen kann ein enthaltenes Reportergen wie *nls-lacZ* oder GFP zur Titerbestimmung verwendet werden.

Um das Ausmaß der Bildung von rekombinanten Retroviren zu quantifizieren, werden 3T3- (oder HuH7-) Zellen als Zielzellen mit verschiedenen Verdünnungen des Zellkulturüberstands, der die transient erzeugten Retroviruspartikel enthält, versetzt. Zellen, die erfolgreich transduziert werden, integrieren das Genom des rekombinanten Retrovirus und exprimieren dann das Markergen. Dient eine Antibiotika-Resistenz als Selektionsmarker (also neo^r oder Puro^r), sind die Zellen in der Lage, in Medium, das G418 bzw. Puromycin enthält, zu proliferieren, während nicht transduzierte Zellen absterben. Erfolgt der Transduktionsnachweis mit Hilfe des *nls-lacZ*-Gens, so werden die transduzierten Zellen mit Hilfe einer histochemischen Färbemethode (X-Gal-Färbung) sichtbar gemacht. Die GFP-Expression kann durch FACS-Analyse quantifiziert werden (s. 2.3.2.3.2).

2.3.2.3.1 Titerbestimmung mittels Selektion auf Antibiotika-Resistenz (G418-Selektion)

Die Titerbestimmung des viralen Überstandes durch G418-Selektion nutzt die Resistenz derjenigen Zellen aus, die von einem viralen Partikel mit intaktem Neo^r-Resistenzgen transduziert wurden. Da die Expression des Resistenzgenes erst ca. 24 h nach der Transduktion in einer Resistenz gegen G418 wirksam wird, kann erst zu diesem Zeitpunkt die Zugabe des Selektionsmedium zu den transduzierten Zellen erfolgen.

Materialien:

- **100x Hexadimethrin-Bromid („Polybrene“)** (Fluka), s. 2.3.2.2
- **G418 (100 mg/ml-Stammlösung)** (Life Technologies):
10 g G418 auf 100 ml ddH₂O auffüllen, sterilfiltrieren, Aliquots zu 10 ml bei -20°C lagern
- PBS
- **Versen-Lösung** (Life Technologies)

Durchführung:

- einen Tag vor Transduktion 3T3- (bzw. HuH7)-Zellen in 6 cm-Kulturschalen (5x10⁵) oder 6-well-Platten (2,5-3 x 10⁵) aussäen
- Zellen mit verschiedenen Polybrene-haltigen Verdünnungen des retroviralen Überstandes versetzen (s. 2.3.2.2)
- nach 24 h Zellen trypsinieren; dazu Medium absaugen und Zellen je 1x mit Versen und mit PBS waschen, dann mit Trypsin von den Kulturschalen ablösen
- als 1/10 der Zellen in 6-well-Kulturgefäßen aussäen (Doppelbestimmung: pro Verdünnungsstufe zwei wells): dazu Verdau durch Zugabe von Kulturmedium abstoppen und Zellen gut resuspendieren
- nach weiteren 24 h Kulturmedium durch G418-haltiges Medium (600 µg/ml für NIH-3T3-, 300 µg/ml für HuH7-Zielzellen) ersetzen
- alle 3-5 Tage G418-Medium erneuern, um tote Zellen zu entfernen
- nach 12-14 Tagen Zellen fixieren und färben (Kristallviolett-Färbung, s. 2.2.2.6)
- Zahl der resistenten Kolonien auszählen
- Berechnung des Virus-Titers (cfu: *colony forming units*):

Titer in cfu/ml = (Anzahl der Kolonien / Volumen des Virus-Mediums in ml) x Verdünnungsfaktor

2.3.2.3.2 Titerbestimmung mittels Nachweis der GFP-Expression (FACS-Analyse)

Der Titer des retroviralen Partikel im Kulturüberstand kann auch durch Messung der GFP-Expression nach Transduktion von Zielzellen bestimmt werden. Die Quantifizierung des Prozentsatzes an GFP-positiven Zellen erfolgt dabei durch FACS-Analyse (s. 2.2.5).

Materialien:

- 100x Hexadimethrin-Bromid („Polybrene“) (Fluka), s. 2.3.2.2
- PBS
- **Versen-Lösung** (Life Technologies)

Durchführung:

- einen Tag vor Transduktion $2,5 \times 10^5$ Zielzellen in 6-well-Kulturschalen aussäen
- Zellen mit Polybrene-haltigen Verdünnungen des retroviralen Überstandes transduzieren (s. 2.3.2.2); zunächst mit 1:1, 1:5 und 1:25-Verdünnungen des viralen Überstandes beginnen
- Zellen nach 48 h trypsinieren; zur Vermittlung einer möglichst quantitativen Ablösung vom Boden der Kulturschalen Zellen zunächst je 1x mit Versen und mit PBS waschen, dann mit Trypsin ablösen
- Zellen durch Zentrifugation pelletieren, in ca. 500 μ l PBS resuspendieren und in spezielle FACS-Röhrchen (Becton Dickinson) überführen
- **FACS-Analyse** (s. 2.2.5): GFP-Fluoreszenz im FL1-H-Fluoreszenzkanal (Anregungs-Wellenlänge: 488 nm) detektieren, dazu 20.000 Zellen auszählen
- Berechnung des Virus-Titers über Prozentsatz der GFP-positiven Zellen (gfu: *GFP forming units*):

$$\text{Titer in gfu/ml} = \frac{(\text{Prozentsatz GFP-positiver Zellen} \times \text{Gesamt-Zellzahl} / \text{Volumen des Virus-Mediums in ml}) \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

2.4 Proteinchemische Materialien und Methoden

2.4.1 Zellaufschluss von adhärennten Zellen

Zur Gewinnung des Gesamtproteins aus kultivierten, adhärennten Zellen werden diese mechanisch (also nicht enzymatisch, um eine Schädigung von Membran- und Matrixproteinen zu vermeiden) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Anschließend erfolgt zur Freisetzung der zellulären Proteine ein Zellaufschluss. Im Gegensatz zur Isolierung von Proteinen aus Geweben oder Organen, ist die Gefahr eines Proteasen-vermittelten Abbaus der freigesetzten Proteine viel geringer, so dass dem Lysepuffer in der Regel keine Proteasehemmer zugesetzt werden müssen.

Materialien:

- **Lysepuffer:**
150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7,6.
2 mM PMSF
1 % (w/v) Nonidet P40

Durchführung:

- zunächst Zellen mit PBS waschen, mit einem Costar-Zellschaber (Nunc) vom Flaschen- bzw. Schalenboden ablösen und in 15 ml Röhrchen überführen
- 5 min mit 1000 Upm bei 4 °C zentrifugieren, Überstand abnehmen und verwerfen
- Zellsediment in Lysepuffer aufnehmen (z.B. 500 µl für die Zellen einer 10 cm-Schale) und in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführen
- um ein homogenes Lysat zu erhalten, Zellsuspension unter Kühlung auf Eis oder Trockeneis 10-20 x durch eine dünne Kanüle (0,9 x 70 mm) aufziehen
- zur Abtrennung von Zelltrümmern das Lysat für 10 min mit 15000 g bei 4 °C zentrifugieren
- nur den Überstand weiterverwenden und in ein frisches, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführen
- Lagerung der gewonnenen Lysate bei -80 °C

2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) basiert auf der Fähigkeit von *Coomassie brilliant blue G250*, an Proteine zu binden, was einen konzentrations-abhängigen Farbumschlag von braun nach blau bewirkt. Die Bindung erfolgt hauptsächlich an Arginin und aromatische Aminosäure-Reste. Zu beachten ist, dass zahlreiche Substanzen, insbesondere Detergentien, diesen Test stören können. Für die in Lysepuffern enthaltenen Komponenten gelten die in Tabelle 2.3 aufgeführten Konzentrationsgrenzen. Um eine Störung des Tests zu vermeiden, müssen die Proben verdünnt oder vor der eigentlichen Proteinbestimmung mit TCA gefällt und in PBS resuspendiert werden.

Tabelle 2.3: Substanzen, die bei der Proteinbestimmung nach Bradford interferieren.

{PRIVATE}Komponente:	maximale Konzentration ²⁰ :
EDTA	2,5 mM
NaCl	125 mM
Natrium-Desoxycholat	0,0025%
Nonidet P40	keine Angabe
Tris-HCl	50 mM
Triton X100	0,0025%

²⁰ Endkonzentrationen im Gemisch aus Probe und Reagenz; bezogen auf eine Mikrotiterplatten-Bestimmung, bei der 10 µl Proteinprobe und 200 µl Bradford-Reagenz eingesetzt werden.

Materialien:

- **Bradford-Reagenz:**
100 mg *Coomassie Brilliant Blue G-250* in 47,5 ml EtOH (100 %, unvergällt) lösen, dann 100 ml Phosphorsäure (85 %) zugeben und die Lösung mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen; bei 4°C ca. 1 Jahr haltbar
- **Protein-Standards:**
BSA in den Konzentrationen 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml und 0,25 mg/ml in Detergentien-freiem Lysepuffer lösen; bei -20°C aufbewahren

Durchführung:

- 1:10, 1:5 und 1:2 Verdünnung (jeweils 10 µl) der Zellysate herstellen
- 400 µl Bradford-Reagenz zu Verdünnungen bzw. je 10 µl der Standards geben
- je 200 µl für Doppelbestimmungen in die Kavitäten einer ELISA-Platte geben, als Leerwert dient Detergentien-freier Lysepuffer (10 µl + 200 µl Bradford-Reagenz je Kavität)
- Platte im ELISA-Reader (Dynatech MR7000) bei 600 nm vermessen und auswerten
- Bestimmung der Probenkonzentrationen anhand der Eichgerade

2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Bei dem verwendeten elektrophoretischen Verfahren (Laemmli 1970) erfolgt die Trennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS und β -Mercaptoethanol. Es wird eine Kombination von zwei Geltypen eingesetzt wird: ein großporiges Sammelgel, in welchem die Proteine konzentriert und zu einer scharf begrenzten Zone gesammelt werden, und ein darunter liegendes kleinporiges Trenngel, in welchem die Proteine nach Molekulargewicht getrennt werden. Als Gelmaterial wird Polyacrylamid verwendet.

Das Trennvermögen dieser diskontinuierlichen Elektrophorese beruht auf der Kombination des Molekularsieb-Effekts mit einem Konzentrierungs-Effekt. Letzterer wird dadurch verursacht, dass sich in Trenn- und Sammelgel andere Ionen (Leitionen: Chlorid-Anionen) als in den Elektrodengefäßen (Folgeionen: Glycinat; Glycin ist ein Zwitterion, der Ladungszustand folglich pH-abhängig) befinden und der pH-Wert im Sammelgel niedriger ist als im Elektrodenpuffer und im Trenngel. Die effektiven Beweglichkeiten aller an der Elektrophorese beteiligten Ionen verhalten sich dabei wie folgt: Leitionen > Proteine > Folgeionen. Bei Anlegen einer Gleichspannung wandern die Leitionen infolge ihrer hohen Beweglichkeit im Sammelgel schneller als Proteine und Folgeionen und hinterlassen eine Zone geringerer Leitfähigkeit. Dadurch steigt die Feldstärke, was wiederum eine Beschleunigung der Proteine und Folgeionen hervorruft. Da die Proteine nicht schneller wandern als die Leitionen, andererseits von den Folgeionen nicht überholt werden können, entsteht eine schmale, konzentrierte Proteinschicht.

Beim Übergang vom Sammel- zum Trenngel, nimmt wegen des alkalischeren pH-Wertes im Trenngel die Beweglichkeit der Folgeionen stark zu und erreicht die Beweglichkeit der Leitionen. Damit wandern im Trenngel Leit- und Folgeionen der Proteinschicht voraus.

Die Trennung der Proteine erfolgt unter denaturierenden Bedingungen hauptsächlich nach der Größe der Proteine. SDS als starkes Detergenz zerstört alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen, während mit Hilfe von β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken reduziert werden. Weiterhin binden die SDS-Anionen an die Proteinkette (1 SDS-Anion je 2 Aminosäure-Reste), so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen stark negative Ladung der Zahl der Aminosäure-Reste und damit dem Molekulargewicht ungefähr proportional ist. Die durch das gebundene SDS hervorgerufene negative Ladung „überdeckt“ im Regelfall die ursprüngliche Nettoladung des Proteins bei weitem, so dass diese bei der Auftrennung keine Rolle mehr spielt.

Materialien:

- **Acrylamid/Bisacrylamid (30 %, (w/v)):**
Rotiphorese Gel 30 (Roth), gebrauchsfertig
- **Tris-HCl, 1 M (pH 8,7) für Trenngel:**
60,56 g Tris-Base in 400 ml ddH₂O lösen, pH mit conc. HCl auf 8,7 einstellen, auf 500 ml auffüllen
- **Tris-HCl, 1 M (pH 6,8) für Sammelgel:**
12,21 g Tris-Base in 80 ml ddH₂O lösen, pH mit conc. HCl auf 6,8 einstellen, auf 100 ml auffüllen
- **SDS (20 %):**
28,84 g SDS in 100 ml ddH₂O lösen

- **5x Elektrophoresepuffer:**
15,1 g Tris Base, 94 g Glycin, 5 g SDS in 900 ml ddH₂O lösen, auf 1000 ml auffüllen (eine 10x Lösung kann auf Grund der mangelnden Löslichkeit des Glycins nicht angesetzt werden; nach dem Verdünnen auf 1x Puffer beträgt der pH 8,3; pH nicht einstellen!)
- **APS-Stammlösung (10 % (w/v)):**
1 g APS in 10 ml ddH₂O lösen; aliquotieren und bei -20°C lagern (praktisch unbegrenzt haltbar)
- **2x Probenpuffer:**
1 ml 1 M Tris, pH 6,8 final: 100 mM Tris, pH 6,8
2 ml Glycerol final: 20 % Glycerol
2 ml 20 % SDS final: 4 % SDS
ddH₂O auf 9 ml auffüllen und mit 2 mg Bromphenolblau versetzen;
unmittelbar vor Gebrauch β-Mercaptoethanol (final: 10 %) zusetzen
- **Molekulargewicht-Standard:**
Full Range Recombinant Protein Marker (Amersham Pharmacia Biotech)

Gießen des Gels:

- **Vorarbeiten:**
für 16 x 18 cm-Gele (1 mm dick) die entsprechenden Glasplatten (Ohren- und Spacerplatten) je 2x mit EtOH (80 %) und ddH₂O reinigen (Kimwipes, fusselfrei); auf die Spacerplatte erst die Silicondichtung, dann die Ohrenplatte auflegen und Sandwich mit den entsprechenden Klammern fixieren
- **Gießen des Trenngels (10 %):**
Rezept für zwei große Gele:
24 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 % / 0,8 %)
17,8 ml ddH₂O
27 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,7
300 µl 20 % (w/v) SDS
300 µl 10 % (w/v) APS
30 µl TEMED;
nach Zugabe der beiden letzten Komponenten jeweils kurz mischen und Gele sofort gießen;
direkt nach dem Gießen Flüssigkeit mit wasser-gesättigtem n-Butanol überschichten, um einen geraden Gelrand zu erhalten; nach ca. 1 h n-Butanol vom polymerisierten Trenngel abgiessen und mit ddH₂O nachspülen, verbliebene Flüssigkeitsreste mit Whatman 3MM Filterpapier absaugen
- **Gießen des Sammelgels (5 %):**
3,6 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 % / 0,8 %)
15,5 ml ddH₂O
2,8 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8
110 µl 20 % (w/v) SDS
zusammengenommen und Polymerisationsreaktion durch Zugabe von
110 µl 10 % (w/v) APS, 12 µl TEMED
starten und die polymerisierten Trenngele mit der Sammelgellösung überschichten;
direkt nach dem Gießen Probenkämme einsetzen; nach ca. 1-2 h ist die Polymerisierungsreaktion vollständig und die Gele können mit den Proben beladen werden

Gel-Lauf:

- **Vorarbeiten:**
Kamm entfernen, Gelreste vorsichtig aus den Taschen mit ddH₂O auswaschen; dann Gelsandwich in die Gelkammer (Hoefer) einbauen; vor dem Probenauftrag Taschen mit Laufpuffer spülen und Luftblasen am unteren Gelrand entfernen.
- **Probenvorbereitung:**
Zelllysate auftauen und gewünschte Menge entnehmen; alle Proben sowie Molekulargewichtsstandard mit Lysepuffer auf das gleiche Volumen bringen und mit der entsprechenden Menge 2x Probenpuffer versetzen; Proben werden für 5 min bei 90 °C inkubieren²¹ und aufs Gel auftragen
- der Probeneinlauf erfolgt mit konstanter Spannung (80 V), die **Auftrennung der Proben** bei 100 V über Nacht; Elektrophorese beenden, sobald Bromphenolblau-Bande die untere Gelgrenze erreicht hat

²¹ *Full Range Recombinant* Molekulargewichts-Standard sollte weder mit Probenpuffer versetzt noch erhitzt werden, da dies die an die Proteine gekoppelten Farbstoffe zerstört; damit ginge der entscheidende Vorteil dieses Markers verloren, nämlich die Sichtbarkeit der Proteinbanden sowohl im Gel als auch auf der Membran nach erfolgtem Proteintransfer.

2.4.4 Western-Blotting

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde in Analogie zu den DNA- und RNA-Nachweisverfahren Southern- und Northern-Blotting eine Methode entwickelt, die als Western Blotting bezeichnet wird (Burnette 1981; Towbin & Gordon 1984).

Hierbei werden die Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine im eigentlichen Blotting-Schritt in einem elektrischen Feld vom Gel auf eine Trägermembran übertragen. Die immobilisierten Proteine werden mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt üblicherweise nicht-radioaktiv: ein sekundärer Antikörper, der gegen den F_c-Teil des primären Antikörpers gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt ist, katalysiert eine leicht detektierbare Reaktion (s. 2.4.4.2).

2.4.4.1 Wet-Blotting

Materialien:

- **Blotpuffer (Towbin-Puffer):**
2,42 g Tris (Endkonzentration: 48 mM)
11,26 g Glycin (Endkonzentration: 39 mM)
mit 700 ml ddH₂O versetzen, pH auf 8,3 einstellen;
dann 200 ml Methanol zusetzen (Endkonzentration: 20% (v/v)), mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllen
- **PVDF-Membran (Hybond P; Amersham Pharmacia Biotech)**

Durchführung:

- **Vorbereitung der PVDF-Membran:**
Membran vollständig mit Methanol benetzen, dann 5 min in ddH₂O zum Entfernen des Methanols unter leichtem Schütteln einweichen, dabei Wasser 2-3 mal wechseln, abschließend für 15 min in Blotpuffer einweichen (darauf achten, dass die hydrophobe PVDF-Membran immer vollständig benetzt ist)
- **Zusammenbau des Blot-Sandwichs:**
3 Whatman 3MM-Filterpapiere auf Gelgröße zuschneiden und in Blotpuffer einweichen;
Blot-Sandwich zusammenbauen: auf den schwarzen Teil der Schmetterlings-Kassette in Blotpuffer getränkten Schwamm, darüber 2 ebenfalls getränkte Whatman-Papiere auflegen; Trenngel auf ein mit Blotpuffer getränktes Whatman Papier überführen und schnell luftblasenfrei auf die Whatman-Papiere auflegen; dann die vorbereitete Membran schnell luftblasenfrei auf das Trenngel auflegen; die PVDF-Membran nie trocknen lassen; wegen der einsetzenden Bindung der Proteine an die Membran nach Möglichkeit nicht mehr nachträglich gegen das Gel verschieben; abschließend ein weiteres getränktes Whatman-Papier auflegen, Schwamm hinzufügen und die Kassette schließen
- **Proteintransfer (Blotting):**
Wet-Blot-Apparatur (BioRad Trans-Blot™ Cell) mit vorgekühltem Blotpuffer füllen, Blot-Sandwich überführen und Proteinproben für mindestens 90 min bei 400 mA und 4°C blotten

2.4.4.2 ECL-Detektion

Das *Enhanced Chemiluminescence System* (ECL) ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von immobilisierten Antigenen, die direkt oder indirekt mit Meerrettich-Peroxidase (HPR) konjugiertem Antikörper markiert werden. HPR und H_2O_2 katalysieren die Oxidation von Luminol, einem cyclischen Diacylhydrazid. Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand und geht unter Lichtemission (428 nm) wieder in den Grundzustand über. Die Lichtemission wird mittels Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Die Oxidationsreaktion findet in Anwesenheit von chemischen Verstärkern, z.B. Phenol, statt, die die Lichtemission um das 100-fache erhöhen und die Emissionszeit verlängern. Die Chemolumineszenz erreicht ca. 5 min nach Substratzugabe das Maximum der Lichtemission, dann fällt die Signalstärke langsam ab. In Abbildung 2.4 ist das Funktionsprinzip des ECL-Systems schematisch dargestellt.

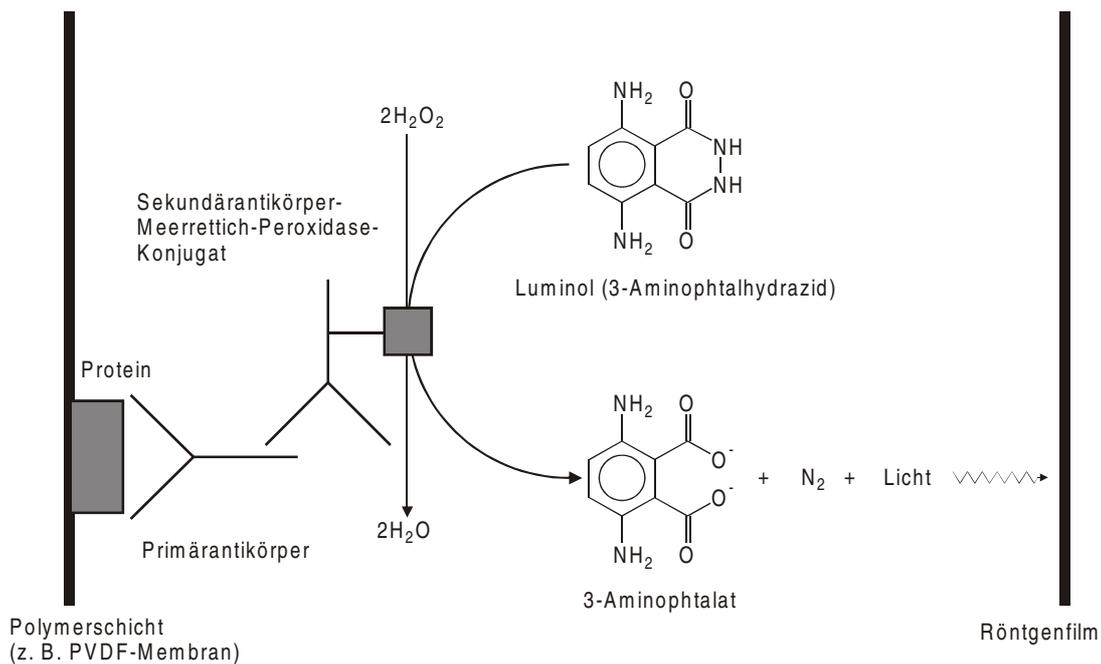


Abbildung 2.4: Prinzip der ECL-Detektion.

An das immobilisierte Protein bindet der für das zu detektierende Protein spezifische Primärantikörper. Desse F_c -Teil wird vom Sekundärantikörper erkannt, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. Diese setzt das Substrat Luminol in einer Licht-erzeugenden Reaktion um. Die Lichtemission wird mit Hilfe eines Films detektiert (Abbildung nach Spiegel, 2000).

Materialien:

- **TBS:**
8,76 g NaCl (Endkonzentration: 150 mM)
1,57 g Tris (Endkonzentration: 13 mM)
in 900 ml ddH₂O lösen, pH mit conc. HCl auf 7,5 einstellen und auf 1 l auffüllen
- **TBS-T:**
1 l TBS, pH 7,5, mit 200 µl Triton X-100 (final: 0,02 %) (Sigma-Aldrich) versetzen
- **Block-Lösung:**
Rotiblock-Konzentrat (Roth) 1:10 in ddH₂O verdünnen (50-100 ml pro Blot)
- **Primär-Antikörper-Verdünnungen²²:**
alle Verdünnungen werden in Blocklösung angesetzt (10-20 ml pro Blot):
- polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen HSV-1 VP22 (AGV30): 1:5000-7.500
- polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen *E. coli* CD (Rogulski *et al.* 1997): 1:3.000
- polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen HSV-1 TK: 1:2.000

²² Herkunft der Antikörper s. 2.2.6.

- polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen GFP (Clontech): 1:5.000
- monoklonale Maus-Antikörper gegen HSV-1 TK (4C8, 9G10, 10C11): 1:1.000
- monoklonaler Maus-Antikörper CMV-018-48151 (Capricorn Products): 1:1.000
- **Sekundärantikörper (Antikörper-HRP-Konjugat):**
Antikörper-HRP-Konjugate, anti-Maus-IgG oder anti-Kaninchen-IgG (Amersham Pharmacia Biotech): 1:3.000; in Block-Lösung verdünnen (10-20 ml pro Blot)
- **ECL-Detektionslösungen 1 und 2** (Amersham Pharmacia Biotech)
- **ECL-Hyperfilm** (Amersham Pharmacia Biotech)

Durchführung:

- **Blocken der Membran:**
Membran für 1 h bei RT unter Schütteln in 50-100 ml Block-Lösung inkubieren; anschließend Block-Lösung verwerfen
- **Bindung des primären Antikörpers:**
Antikörper-Verdünnung unmittelbar vor Gebrauch herstellen und auf die geblockte Membran geben, bei RT für 1 h inkubieren; die Antikörper-Verdünnung kann mehrfach verwendet werden, Lagerung bei 4°C
- **Waschen:**
Antikörper-Lösung entfernen; nicht an die Membran gebundene Immunglobuline durch Waschen mit TBS-T entfernen: 3 x 10 min mit je 50 ml TBS-T waschen
- **Bindung des sekundären Antikörpers:**
Antikörper-HRP-Konjugat-Verdünnung unmittelbar vor Gebrauch herstellen und auf die gewaschene Membran geben, bei RT für 1 h unter Schütteln inkubieren
- **Waschen:**
Antikörper-Lösung entfernen; Membran 6 x 10 min mit je 50 ml TBS-T waschen
- **Detektion:**
je 7,5 ml ECL-Reagenz 1 und 2 mischen; gewaschene Membran auf einen aufgeschnittenen Vernichtungsbeutel (Brand) überführen; ECL-Mischung auf die Membran geben und für 60 sec inkubieren; überschüssiges Reagenz durch Abtropfen entfernen, dann Beutel zuklappen, Luftblasen entfernen und Beutel in Filmkassette überführen;
in der Dunkelkammer ECL-Hyperfilm auflegen; mit 15 sec Belichtungszeit beginnen, dann Film entwickeln; anhand der Intensität der Banden Belichtungszeit für ein optimales Ergebnis abschätzen und Belichtung sowie Entwicklung wiederholen

2.5 Immunologische Materialien und Methoden

Zur Austestung einer CTL-Antwort im Mausmodell werden geeignete Mäuse mit Zellen, die das potenziell immunogene Protein stabil herstellen, immunisiert. Dazu stellt man zunächst durch Transfektion von Expressionsplasmiden und Selektion von Klonen stabile Zelllinien definierter Haplotypen her. Beispielsweise sind MC-57-Zellen syngene zu **C57BL/6-Mäusen** (Haplotyp H-2^b) und C4-Zellen syngene zu **BALB/c-Mäusen** (Haplotyp H-2^d). Die Immunisierung der Mäuse (s. 2.5.1) erfolgt durch i.p.-Injektion der jeweils syngenen stabilen Zelllinien. Nach 8 Tagen wird die Milz explantiert, die Zellen vereinzelt und in Kultur genommen. Sogleich erfolgt eine Stimulation der Milzzellen durch erneute Präsentation der immunogenen Epitope. Dies geschieht entweder durch Zugabe der stabilen Zelllinie oder durch Zugabe synthetischer Peptide, die als mögliche Liganden der MHC-Klasse-I-Moleküle vorausgesagt wurden.

Fünf Tage nach dem Stimulus wird die Stärke und Spezifität der CTL-Antwort im *Cr-release*-Assay getestet (s. 2.5.2). Dabei werde Ziel-Zellen, die mit ⁵¹Cr vorinkubiert sind, mit stimulierten Milz-Effektor-Zellen gemischt. Wirken die stimulierten Milzzellen cytotoxisch, wird das intrazelluläre radioaktive ⁵¹Cr durch die Lyse der Zellen freigesetzt und kann im β -Zähler quantifiziert werden.

2.5.1 Immunisierung von BALB/c-Mäusen: Generierung von CTLs

Materialien:

- **ACT-Lösung:**
Lösung A: 7,47 g NH₄Cl in 900 ml ddH₂O lösen (8,3 g/l NH₄Cl = 0,16 M)
Lösung B: 2,06 g Tris-Base in ddH₂O lösen (0,17 M), pH auf 7,65 einstellen, auf 100 ml auffüllen
Lösung A und B zusammengeben, pH-Wert auf 7,2 einstellen
- **„Killermedium“** (Rezept für 500 ml):
 α MEM: *Eagles's Minimal Essential Medium*, Alpha-Modifikation (Sigma)
25 ml Überstand ConcanavalinA (ConA)-aktivierter Ratten-Milzzellen (enthält u.a. viele Cytokine)
25 ml α MM (Methyl-Mannosid; Sigma) in PBS (desaktiviert restliches ConA)
5 ml L-Glutamin
2,5 ml β -Mercaptoethanol, 1:2500 in RPMI-Medium
10 % FCS
- **α -Medium:**
entspricht dem „Killermedium“, jedoch ohne Zusatz von ConA-Überstand und α MM

Durchführung der Immunisierung:

- 1×10^7 zur Immunisierung verwendete Zellen in 100 μ l PBS resuspendieren
- Zellen im γ -Strahler mit 32,3 Gy (= 3:41 min) bestrahlen
- Zellsuspension in die Mäuse intraperitoneal (i.p.) injizieren
- nach 8 Tagen Töten der Maus durch Genickbruch
- Milz entnehmen, in vorbereitetes 15 ml-Falcon-Gefäß mit sterilem PBS überführen
- Milz durch Sieb drücken
- 10 ml PBS zugeben
- 3 min mit 1500 Upm (ca. 4000 x g) bei 4°C zentrifugieren
- zur Lyse der Erythrocyten 2 ml ACT-Lösung zugeben, kurz warten
- 8 ml α -Medium zugeben
- 3 min mit 1500 Upm (ca. 4000 x g) bei 4°C zentrifugieren
- Milzzellen resuspendieren und 1×10^7 pro Kavität einer 6-well-Kulturschale in α -Medium ausplattieren
- anschließend **Stimulation** der Milzzellen:
Zugabe von 1×10^6 der zur Immunisierung verwendeten stabil transfizierten Zellen oder synthetische Peptide (100 ng/ml Endkonzentration pro Peptid)
- stimulierte Milzzellen 5 Tage im Brutschrank inkubieren, dann mittels *Chrom-release*-Assay analysieren (s. 2.5.2)

Durchführung der Restimulation:

die Restimulation wird wöchentlich durchgeführt:

- Töten der Maus durch Genickbruch

- Milzentnahme, Zellvereinzellung durch Sieb, Lyse der Erythrocyten, Zugabe von α -Medium wie oben
- Zellen im γ -Strahler mit 32,3 Gy (= 3:41 min) bestrahlen
- 3 min mit 1500 Upm bei 4°C zentrifugieren
- Killermedium zugeben, so dass ca. 5×10^6 Feeder-Milzzellen pro well
- Zugabe von 5×10^5 CTL-Zellen, die für 1h bei 37°C mit 100 ng/ml Peptiden beladen und mit 200 Gy (= 22 min) bestrahlt wurden oder
Zugabe von 5×10^5 Transfektanden (stabile Zelllinien), die wie oben bestrahlt wurden

2.5.2 Chrom-release-Assay

Im ^{51}Cr -Freisetzungstest werden Zellen mit Na_2CrO_4 inkubiert. Das CrO_4^{2-} -Anion gelangt durch spezifische Ionenkanäle in die Zelle und wird dort durch Glutathion zu Cr^{III} reduziert. Cr^{III} gelangt in den Zellkern und bindet dort an die DNA. Wird solch eine Zielzelle nun von CTLs erkannt, wird sie von diesen lysiert und ihre intrazellulären Substanzen freigesetzt. Das radioaktiv-markierte Cr^{III} kann so im Überstand der Lösung nachgewiesen werden (Brunner *et al.* 1968).

Materialien:

- $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (5 $\mu\text{Ci/ml}$, Amersham)
- **RPMI-Medium** (Life Technologies)
- **Feststoff-Scintillatorplatte** (Packard)
- **β -Zähler** (1450 Microbeta Plus-Counter, Wallac)
- **0,2 % Triton X-100** (Sigma)

Durchführung:

- gewünschte Menge Zielzellen abzentrifugieren
- auf das Pellet 5 μl $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ geben und 45 min bei 37°C inkubieren
- 2x mit 2 ml komplettem RPMI-Medium waschen
- Test selbst in Mikrotiterplatten (runder Boden, Costar) ausführen:
je 100 μl komplettes RPMI-Medium vorpipettieren, 1. Kavität dabei frei lassen; Effektorzellen in 150 μl komplettem RPMI-Medium vorlegen und daraufhin jeweils 50 μl über die Testvertiefungen transferieren
- zu den Effektorzellen dann je 100 μl komplettes RPMI-Medium mit je 1×10^4 ^{51}Cr -markierten Zielzellen pipettieren, so dass das Endvolumen pro Vertiefung 200 μl beträgt
- Test für 4 h bei 37°C inkubieren
- danach aus jeder Vertiefung 50 μl des Überstandes auf die Feststoff-Scintillatorplatte übertragen
- Scintillatorplatte über Nacht oder bei 60°C für 45 min trocknen
- anschließend im β -Zähler auszählen
- Bestimmung der maximalen Freisetzung: 100 μl markierte Zielzellen mit 100 μl 0,2 % Triton X-100 mischen; Bestimmung der spontanen Freisetzung: zu den Zielzellen komplettes RPMI-Medium geben; beide Werte als Doppelbestimmungen ermitteln
- Anteil der lysierten Zellen durch Anwendung folgender Formel bestimmen:

Prozentsatz der spezifischen Lyse =

(cpm-Wert der Probe – Spontanfreisetzung) / (cpm-Wert der maximalen Freisetzung – Spontanfreisetzung)

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung

Da die Eigenschaft des interzellulären Transports auch in VP22-Fusionsproteinen nachgewiesen wurde (Elliott & O'Hare 1997), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob chimäre Proteine, bestehend aus VP22 und den Suizidgenen HSV-1 Thymidin-Kinase (TK) sowie *E. coli* Cytosin-Desaminase ebenfalls diese Eigenschaften aufweisen. Dazu wurden zunächst virale Vektoren kloniert, die als Transgen die Nucleotid-Sequenz der entsprechenden Fusionsproteine in exprimierbarer Form enthalten.

3.1.1 Retrovirale Plasmidkonstrukte

Als Grundgerüste für die Herstellung retroviraler Vektoren auf Basis des *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMLV) der Maus dienten die Plasmide pLXSN (Miller & Rosman, 1989) und pWZLneo (Rogulski *et al.* 1997). Folgende Suizidgen-Vektoren und Fusionskonstrukte mit VP22 wurden dabei erzeugt bzw. benutzt (schematische Darstellung in Abbildung 3.1):

- **pL-TK-SN:**

Das HSV-1 TK-Gen wurde mittels *Bam*HI- und *Sal*I-Verdau aus **pWZLneoglyTK** (Rogulski *et al.* 1997) isoliert. Dabei wurde das Plasmid zunächst mit *Bam*HI linearisiert und die entstandenen überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Nach Hitzeinaktivierung der Klenow-Polymerase wurde das TK-Fragment durch Zugabe von *Sal*I herausgelöst, so dass eine Ligation in *Hpa*I- und *Xho*I-geschnittenes pLXSN-Plasmid möglich wird. Dabei sind zum einen die überhängenden Enden von *Sal*I und *Xho*I einander komplementär, zum anderen passen die glatten Enden von *Hpa*I zu den aufgefüllten *Bam*HI-Schnittstellen.

- **pL-CD-SN (= pCD2):**

Die Einklonierung des CD-Gens aus *E. coli* in pLXSN wurde bereits von Mullen *et al.* (1992) vorgenommen. Zusätzlich wurde mittels PCR der bakterielle GTG-Startcodon durch die für die Expression in Säugerzellen optimierte Kozak-Translations-

Startsequenz ersetzt. Das resultierende Plasmid pCD2 wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

- **pCD-TK-Neo:**

Ausgehend von pCD2 wurde ein PCR-amplifiziertes TK-Fragment in die *MluI*-Schnittstelle am 3'-Ende des CD-Gens insertiert, so dass die entstehende CD-TK-Fusion eine Deletion der N-terminalen 8 aa der TK sowie der C-terminalen aa der CD aufweist (Zeng & Lapeyre, 1996). Das resultierende Plasmid pCD-TK-Neo wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

- **pWZLneoCDglyTK:**

Die Fusion von CD und TK im Grundkonstrukt pWZLneo enthält zwischen den kodierenden Sequenzen der Suizidgene einen zusätzlichen flexiblen Linker, der aus dem mutierten Stop-Codon der CD, einer *BamHI*-Schnittstelle und 8 Glycin-Resten besteht. Das resultierende Plasmid pWZLneoCDglyTK (Rogulski *et al.* 1997) wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

- **pL-TK-VP22:**

Die Fusion der HSV-1 Gene TK und VP22 im Plasmid **ptk-VP22ep** (Dilber *et al.* 1999) enthält innerhalb des Leserasters (*in frame*) stromaufwärts des Stop-Codons die hCMV-Epitop-Sequenz ERKTPRVTGG²³ (CMV-ep), welche durch den monoklonalen Antikörper CMV-018-48151 (Capricorn Products) erkannt wird. Da keine geeigneten Restriktionsschnittstellen für eine direkte Klonierung zur Verfügung standen, wurde die TK-VP22-ep-Fusion mittels PCR-Klonierung in das retrovirale Grundkonstrukt pLXSN eingebracht (Methodik s. 2.1.15). Dabei wurden Primer verwendet, die unmittelbar stromaufwärts des Start-Codons (VP22-for-Eco²⁴) bzw. stromabwärts des Stop-Codons (49ep-rev-Bcl) binden und zusätzlich Schnittstellen für Restriktionsenzyme *EcoRI* bzw. *BclII* enthalten. Die Aufreinigung und Restriktion der PCR-Produkte erfolgte anhand einer optimierten Kombination mehrerer Reinigungs-Schritte (Wybranietz & Lauer, 1998; s. 2.1.15).

Der zu diesem Fragment passende Vektor stammt dabei nicht aus pLXSN direkt, sondern wurde durch Verdau von pLANSN (Roche) mit *EcoRI* und *BamHI* erzeugt,

²³ Die CMV-Epitop-Sequenz (CMV-ep) stammt aus der kodierenden Sequenz des phosphorylierten Matrixproteins pp65 des humanen Cytomegalievirus (hCMV); *Genebank accession number* M15120, dort bp 1580-1609.

²⁴ Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet.

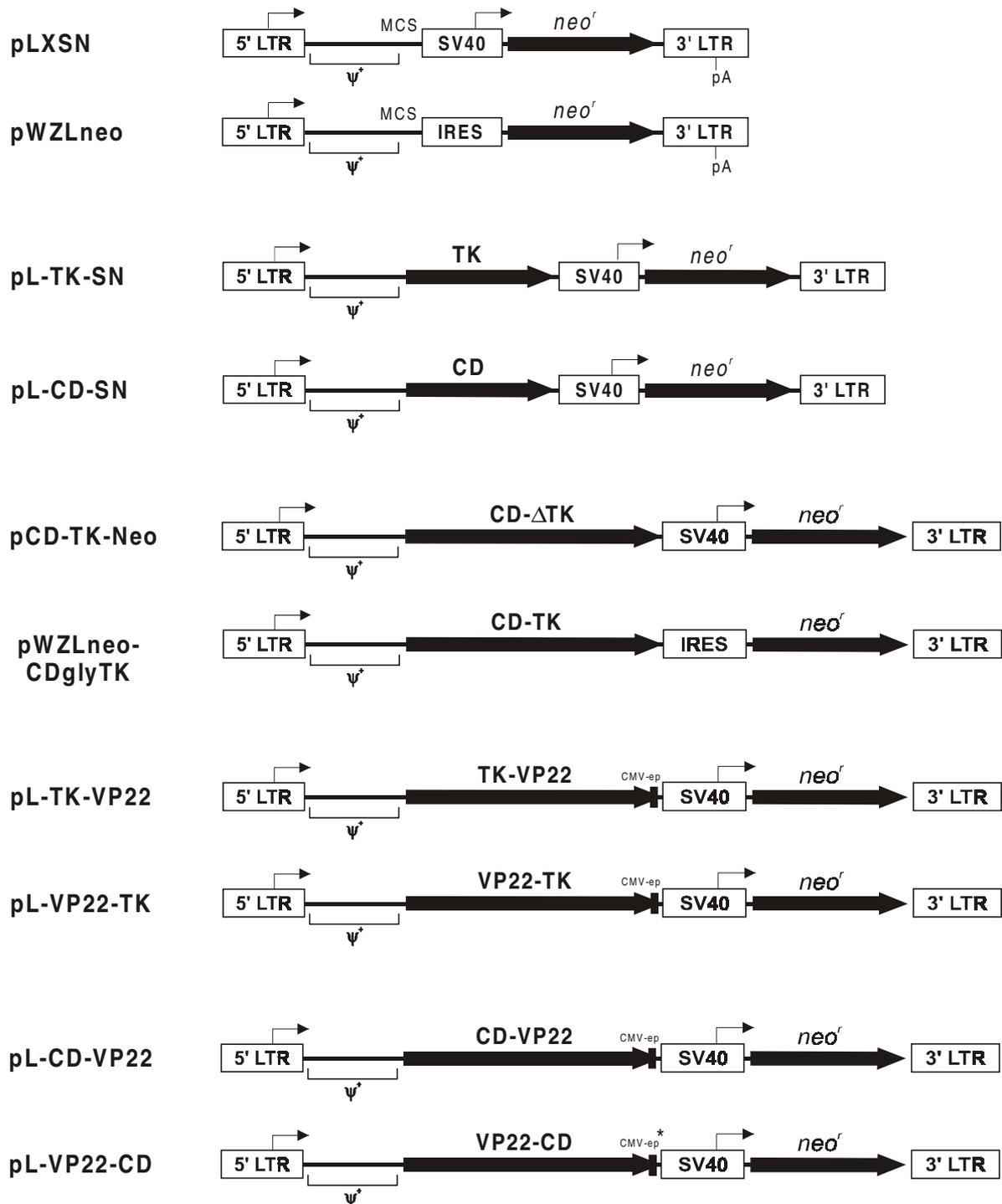


Abbildung 3.1: Retrovirale Plasmidkonstrukte.

* Das CMV-Epitop liegt außerhalb des Leseraster des VP22-CD-Fusionsgens.

womit das dort enthaltene Transgen herausgelöst wird²⁵. Da *BcII* und *BamHI* einander komplementäre überhängende Enden liefern, können die erhaltenen Fragmente direkt ligiert werden.

- **pL-VP22-TK:**

Eine C-terminale Fusion des Transportgens VP22 mit TK und dem CMV-Epitop stand im Plasmid **pVP22-tkep** zur Verfügung (Dilber *et al.* 1999). Die Klonierung erfolgte wie oben bei pL-TK-VP22 mittels PCR, bei Verwendung der gleichen Primer, Schnittstellen, Vektorkonstrukte, Reinigungs- und Ligations-Methode.

- **pL-CD-VP22:**

Die CD-VP22-Fusion wurde aus dem adenoviralen Plasmid **6600-CD-VP22** (s. 3.1.2) durch gleichzeitigen Verdau mit *EcoRI* und *BamHI* gewonnen und in den gleichartig geschnittenen Vektor pL-TK-VP22 eingefügt. Dabei wird nur die reine CD-VP22-Fusion transferiert, während CMV-Epitop und Stop-Codon vom Retrovirus-Ausgangsvektor pL-TK-VP22 stammen.

- **pL-VP22-CD:**

Auch die Fusion VP22-CD wurde mit Hilfe von PCR-Primern, die zusätzlich *BamHI*-Schnittstellen enthielten, erzeugt. Dabei diente das Plasmid **6600-CD-TK-VP22** (s. 3.1.2) als Matrize, so dass sich mit Hilfe der Primer „Bam-CD-for2“ und „TK-5end-rev“ spezifisch das CD-Gen amplifizieren ließ. Da sich *BamHI*-Schnittstellen nun stromaufwärts des CD-Gens sowie zwischen CD und CMV-Epitop befinden, kann so das zu transferierende CD-Fragment freigesetzt werden. Nach Entfernen des nicht benötigten TK-Fragmentes durch *BamHI*-Verdau wurde der Vektor pL-VP22-TK zusätzlich mit SAP dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Das übertragene CD-Gen wurde dann *in frame* zum N-terminalen VP22 eingefügt. Die kodierende Sequenz des CMV-Epitops gerät dabei jedoch in einen anderen Leserahmen, was als interne Kontrolle („CMV-Epitop negativ“) der erzeugten Suizidgen-VP22-Fusionen dienen kann.

²⁵ Das unserem Labor zugängliche retrovirale Grundkonstrukt pLXSN enthält im Unterschied zur publizierten Sequenz eine Insertion von 169 bp zwischen dem Neomycin-Resistenz-Gen und der 3'-LTR-Sequenz. Diese Insertion besteht hauptsächlich aus einem trunkeerten Bleomycin-Resistenz-Gen sowie den C-terminalen 8 aa des *env*-Gens aus MoMLV. Diese pLXSN-Version ist in Laboratorien weit verbreitet und stellt wahrscheinlich eine fälschlicherweise ausgegebene Vorstufe des endgültigen Konstrukts dar. Dagegen enthält der kommerziell erhältliche Vektor pLΔNSN (Roche), welcher eine trunkeerte Version des humanen *nerve growth factor*-Rezeptors (ΔNGF-R) als therapeutisches Gen besitzt, die oben beschriebene Insertion bei gleichem Grundkonstrukt nicht. Durch die Einklonierung des Transgens ist jedoch die multiple Klonierungsstelle (MCS) teilweise verloren gegangen, so dass pLΔNSN nach Entfernung des ΔNGF-R-Fragments nur in Einzelfällen – mit erhöhtem Klonierungsaufwand – als Quelle des pLXSN-Rückgrats verwendet werden kann.

3.1.2 Adenovirale Plasmidkonstrukte

Für die Herstellung adenoviraler Vektoren mittels homologer Rekombination in *E. coli* wurden die Plasmide pTG6600 und pTG8347 der Firma Transgene als Basiskonstrukte verwendet (s. 2.1.1). Diese Vektoren enthalten stromaufwärts und stromabwärts der Expressionskassette adenovirale Sequenzen, die den E1-Bereich umgeben. Bei gleichzeitiger Transfektion eines Plasmids, welches das vollständige adenovirale Genom enthält, entsteht durch homologe Rekombination ein Konstrukt, das anstatt des E1-Bereichs die Expressionskassette des gewünschten Transgens enthält (s. 2.3.1.1). Die zur Herstellung adenoviraler Partikel notwendigen E1-Genprodukte werden anschließend von der 293-Zelllinie zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Rekombinationsplasmide unterscheiden sich dabei im Promotorbereich (hCMV *vs.* RSV), der Intron-Sequenz (chimäres Intron aus humanem BGL und IgG der Maus *vs.* BGL-Intron aus Kaninchen) und Polyadenylierungs-Stelle (SV40 *late-polyA vs.* BGL-polyA aus Kaninchen). Folgende Suizidgen-Vektoren und Fusionskonstrukte mit VP22 wurden dabei erzeugt (schematische Darstellung in Abbildung 3.2):

- **6600-TK:**

Das HSV-1 TK-Gen wurde mittels *EcoRI*- und *BamHI*-Verdau aus **pWZLneoglyTK** (Rogulski *et al.* 1997) isoliert. Als Vektor-Grundgerüst diente pTG6600, welches mit *EcoRI* linearisiert und anschließend durch SAP dephosphoryliert wurde, um eine Religation des Vektors zu unterbinden. Nach Ligation der *EcoRI*-überhängenden Enden wurden die nicht-komplementären Enden mittels Klenow-Enzym aufgefüllt, so dass die entstehenden glatten Enden ligiert werden konnten.

- **6600-CD:**

Dieses Plasmid wurde bei gleichem Vektor-Grundgerüst (pTG6600) in analoger Weise zu 6600-TK kloniert, wobei das CD-Fragment durch Doppelverdau mit *EcoRI* und *StuI* aus **pWZLneoCD** (Rogulski *et al.* 1997) gewonnen wurde.

- **6600-CD-TK:**

Unter Verwendung des gleichen *EcoRI*-linearisierten und dephosphorylierten Vektors pTG6600 – wie in den beiden vorausgegangenen Fällen – verlief die Umklonierung der CD-TK-Fusion in den adenoviralen Rekombinationsvektor über eine Zwischenstufe. Durch vollständigen *NdeI*- und partiellen *BamHI*-Verdau wurde zunächst die Suizidgen-Fusion aus **pWZLneoCDglyTK** (Rogulski *et al.* 1997) herausgelöst und in das mit

NdeI und *SallI*-verdautes Plasmid pUC19 eingefügt, wobei die überhängenden Enden von *NdeI* zur *SallI*-Schnittstelle des Basisvektors komplementär sind. Danach konnte unter Zuhilfenahme der neu hinzugekommenen Restriktionsstellen der MCS von pUC19 die Transgen-Fusion durch direkte *EcoRI*-Klonierung in pTG6600 eingefügt werden.

- **8347-TK:**

Die Sequenz der HSV-1 TK wurde durch Doppelverdau mit *BglII* und *PvuII* aus **pHSV106** (Life Technologies; s. 2.1.1) herausgelöst. Als adenoviraler Grundgerüstvektor diente hier pTG8347 (s. 2.1.1), welcher mit *BamHI* und *EcoRV* geschnitten wurde. Da *BglII* und *BamHI* kompatible überhängende Enden ergeben und zusätzlich beim Verdau mit *PvuII* und *EcoRV* glatte Enden ohne Überhang entstehen, kann das Produkt 8347-TK direkt durch Ligation erzeugt werden.

- **8347-CD:**

Die Sequenz der *E. coli* Cytosin-Desaminase wurde durch gleichzeitigen *EcoRI*- und *BamHI*-Verdau aus **pCD2** (Mullen *et al.* 1992) gewonnen. Da innerhalb dieses Fragments keine *EcoRV*-Schnittstelle vorkommt, konnte die Ligation nach der „Ein-Topf“-Methode vorgenommen werden, bei der ungeschnittener pTG8347-Vektor, CD-Fragment und T4-DNA-Ligase zusammen mit Klenow-Enzym, dNTPs sowie *EcoRV* zusammen inkubiert wurden. Die überhängenden Enden des Fragmentes wurden durch Klenow-Enzym aufgefüllt, so dass die entstehenden glatten Enden zu *EcoRV* kompatibel sind und eine Insertion stattfinden konnte. Dabei wurde die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *EcoRV* zerstört. Somit wurde die Gleichgewichtsreaktion von Vektor-Linearisierung und Ringschluss zugunsten des Ligations-Endprodukts verschoben. Eine Religation des pTG8347-Vektors wurde dadurch verhindert, dass das Enzym *EcoRV* ständig im Reaktionsgemisch vorhanden war.

- **6600-TK-VP22:**

Zur Herstellung des TK-VP22-CMVep-Fragments wurde die gleiche PCR-Methode verwendet wie bei pL-TK-VP22 (siehe 3.1.1), mit **ptk-VP22ep** als Matrize (Dilber *et al.* 1999) und den Klonierungs-Primern „VP22-for-Eco“ und „49ep-rev-Xba“²⁶. Die Aufreinigung erfolgte anhand der in 2.1.15 beschriebenen optimierten Kombination mehrerer Reinigungs-Schritte (Wybranietz & Lauer, 1998). Der zu diesem Fragment

²⁶ Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet.

passende Vektor wurde durch gleichzeitigen Verdau von pTG6600 mit *EcoRI* und *XbaI* erzeugt, so dass ein direkte Ligation ermöglicht wird.

- **6600-VP22-TK:**

Eine C-terminale Fusion von VP22 mit TK und dem CMV-Epitop wurde aus dem Plasmid **pVP22-tkep** gewonnen (Dilber *et al.* 1999). Die Klonierung erfolgte wie oben bei 6600-TK-VP22 mittels PCR, bei Verwendung der gleichen Primer, Schnittstellen, Vektorkonstrukte, Reinigungs- und Ligations-Methodik.

- **8347-TK-VP22:**

Die Klonierung der TK-VP22-Fusion in den zweiten adenoviralen Rekombinationsvektor pTG8347 gestaltete sich umständlicher, da die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *EcoRI* zweimal vorhanden war. Durch vollständigen *XbaI*- und partiellen *EcoRI*-Verdau wurde zunächst das Vektor-Grundgerüst gewonnen und durch Gelreinigung von den gleichzeitig entstehenden Fragmenten abgetrennt. Als einzufügendes Fragment diente daran anschließend das *EcoRI*- und *XbaI*-verdaute PCR-Produkt mit **ptk-VP22ep** als Matrize (Dilber *et al.* 1999), wie schon bei der Herstellung von 6600-TK-VP22.

- **6600-CD-VP22:**

Zur Erzeugung geeigneter Restriktionsschnittstellen verlief diese Klonierung über eine Zwischenstufe. Zunächst wurde ein *BamHI*- und *NdeI*-Fragment aus **pcDNA3-CD** (Groß, 2000), welches nur den N-terminalen Teil der CD-Sequenz enthält, in die äquivalente Position von **pWZLneoCDglyTK** (Rogulski *et al.* 1997) eingefügt. Dabei war die *NdeI*-Schnittstelle des Vektors singulär vorhanden, während das gewünschte Fragment nur durch nachfolgenden partiellen *BamHI*-Verdau zugänglich war. Aus dem entstehenden Intermediär-Konstrukt konnte die vollständige CD-Sequenz ohne Stop-Codon zur Verwendung als N-terminale Fusion durch gleichzeitigen *EcoRI*- und *BamHI*-Verdau gewonnen werden. Dieses Fragment wurde in den gleichen Leserahmen wie die vorhandene VP22-Sequenz im Plasmid 6600-TK-VP22 eingefügt. Durch vollständigen Verdau mit *EcoRI* und partiellen Verdau mit *BglII* wurde das dort vorhandenen TK-Fragment herausgelöst, so dass CD *in frame* eingefügt werden konnte. Die überhängenden Enden von *BamHI* und *BglII* waren dabei einander komplementär, wobei bei der Ligation beide Schnittstellen verloren gingen.

- **6600-VP22-CD:**

Wie schon bei pL-VP22-CD (siehe 3.1.1) wurde die Fusion VP22-CD mit Hilfe von Klonierungs-Primern per PCR erzeugt. Dabei wurde das gleiche PCR-Produkt mit **6600-CD-TK-VP22** als Matrize und den Primern „Bam-CD-for2“ und „TK-5end-rev“ verwendet. Ein Verdau mit *Bam*HI greift an der künstlich eingefügten sowie der zwischen CD und CMV-Epitop bereits vorhandenen *Bam*HI-Schnittstelle an und setzt das zu transferierende CD-Fragment frei. Nach Abspaltung des TK-Fragmentes durch *Bam*HI-Verdau wurde der Vektor 6600-VP22-TK zusätzlich mit SAP dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Das übertragene CD-Gen wird hierbei in den gleichen Leserahmen wie die N-terminale VP22-Sequenz eingefügt. Das CMV-Epitop fällt jedoch aus diesem Leserahmen, was wie schon bei pL-VP22-CD die Verwendung als interne Kontrolle („CMV-Epitop negativ“) der erzeugten Suizidgen-VP22-Fusionen ermöglicht.

- **6600-CD-TK-VP22:**

Die Insertion der CD-TK-VP22-Dreifach-Fusion in den adenoviralen Rekombinationsvektor verlief analog zur Klonierung von 6600-CD-TK über eine Zwischenstufe. Die CD-TK-Fusion wurde dabei wie oben beschrieben aus **pWZLneoCDglyTK** (Rogulski *et al.* 1997) entnommen und in pUC19 überführt. Durch Verdau mit *Eco*RI und *Sun*I wurde ein Fragment isoliert, das die vollständige CD-Sequenz und die N-terminalen 25 aa der Thymidin-Kinase enthielt. Dieses kann im gleichartig geschnittenen Vektor **6600-TK-VP22** die vorhandene TK-VP22-Fusion zur Dreifach-Fusion im gleichen Leserahmen ergänzen.

- **6600-CD-ΔTK-VP22:**

Die verkürzte Version der CD-TK-VP22-Dreifach-Fusion (anstelle des Glycin-Linkers Deletion von 9 aa im Fusionsbereich der beiden Suizidgene) wurde über dieselbe *Sun*I-Schnittstelle im N-terminalen Bereich der TK erzeugt wie bei der Klonierung der Voll-längen-Version 6600-CD-TK-VP22. Dabei wurde die mit Glycin-Linker verbundenen kodierenden Sequenzen von CD und TK mittels *Eco*RI- und *Sun*I-Verdau durch das analoge Fragment aus **pCD-TK-Neo** (Zeng & Lapeyre 1996) ersetzt.

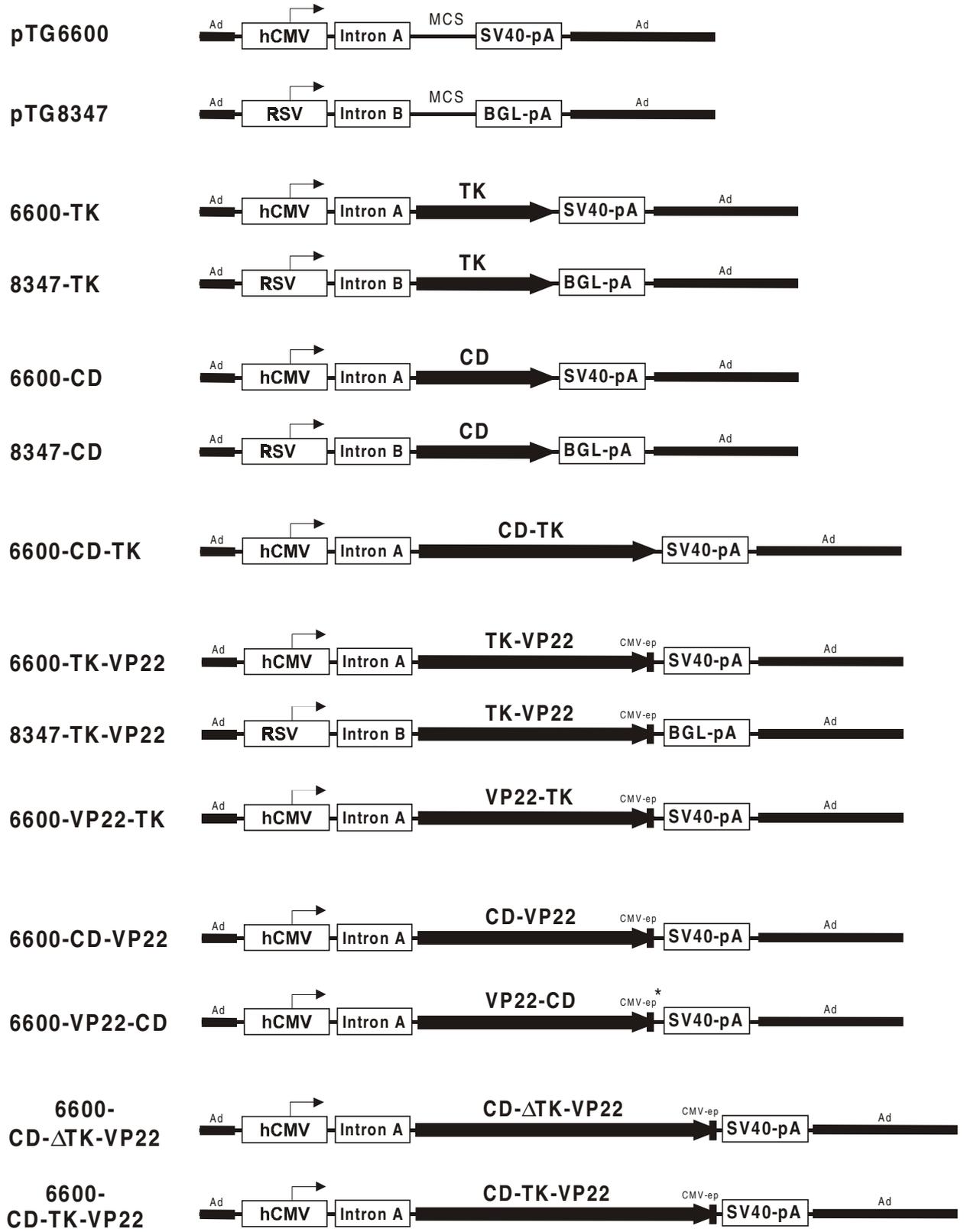


Abbildung 3.2: Adenovirale Plasmidkonstrukte.

* Das CMV-Epitop liegt außerhalb des Leserrahmens des VP22-CD-Fusionsgens.

3.1.3 VP22-Expressions- und Reporter-Konstrukte

Zur Untersuchung der VP22-Transporteigenschaften wurden zusätzlich Vektoren benötigt, die anstatt der Suizidgene sogenannte Reportersequenzen beinhalten. Darüber hinaus wurden Kontrollplasmide erzeugt, die den Vergleich bei An- oder Abwesenheit von VP22 ermöglichen. Zur Ermittlung der Immunogenität von VP22 dienten Plasmide, die sich bei gleichem Rückgrat nur durch die kodierenden Sequenzen (ohne Transgen, mit VP22 alleine oder mit VP22-GFP-Fusion) unterscheiden. Im Einzelnen wurden folgende Kontroll-Vektoren erzeugt (schematische Darstellung in Abbildung 3.3):

- **pLeer:**

Basierend auf dem GFP-Expressions-Vektor **pEGFP-N1** (Clontech) wurde die kodierende Sequenz des Reportergens durch gleichzeitigen *BgIII*- und *NotI*-Verdau entfernt, die überhängenden, nicht-kompatiblen Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und religiert.

- **pVP22:**

Da keine geeigneten Restriktionsschnittstellen für eine direkte Klonierung zur Verfügung standen, wurde die VP22-Sequenz mit Hilfe von Klonierungs-PCR-Primern, die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BgIII* und *NotI* enthielten, erzeugt. Als Matrize diente das Plasmid **pGE150** (Elliott & O'Hare 1997), so dass die Primer „CMV-for2“ und „22-Not-rev“, welcher zusätzlich die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *NotI* enthielt, spezifisch das VP22-Gen amplifizierten. Nach der Aufreinigung des PCR-Produktes (s. 2.1.15) erfolgte das enzymatische Aufschneiden an der künstlich eingefügten *NotI*- sowie der bereits vorhandenen *BgIII*-Schnittstelle. Das so erhaltene Fragment wurde im Austausch mit dem *BgIII-NotI-VP22-GFP*-Fragment in pVP22-GFP (siehe unten) eingefügt.

- **pEGFP-N1:**

Der kommerziell erhältliche Expressions-Vektor pEGFP-N1 (Clontech) eignet sich zur Herstellung N-terminaler Fusionen von zu untersuchenden Proteinen mit dem Reporterprotein GFP. Dabei wird die Codon-optimierte Version *enhanced GFP* (EGFP) mit Kozak-Initiationssequenz und verbesserten Emissionseigenschaften durch S65T-Mutation verwendet. Als Selektionsmarker dient das Neomycin-Resistenzgen, welches sowohl in eukaryontischen Zellen (G418-Resistenz) als auch Bakterien (Kanamycin-Resistenz) verwendet werden kann.

- **pcDNA3-GFP:**

Dieser GFP-Expressions-Vektor basiert auf dem weit verbreiteten eukaryontischen Expressions-Vektor pcDNA3 (Invitrogen). Durch Verdau mit *EcoRI*- und *NotI* wurde die kodierende Region des *enhanced* GFP (EGFP) aus **pEGFP-N1** (Clontech) ausgeschnitten und in pcDNA3 eingefügt. Mit Ausnahme der Polyadenylierungssequenzen sind hier die gleichen Expressionskassetten für GFP und die Neomycin-Resistenz enthalten wie bei pEGFP-N1 (siehe oben). Zusätzlich kann die Selektion von pcDNA3-GFP in Prokaryonten auch mit Hilfe des Ampicillin-Resistenzgens erfolgen, so dass die Gesamtlänge des Vektors deutlich über der von pEGFP-N1 liegt und der von pVP22-GFP entspricht (siehe unten).

- **pGE150:**

Die N-terminale Fusion des VP22-Gens aus HSV-1 mit GFP in **pEGFP-N1** (Clontech) erfolgte bereits durch Elliott & O'Hare (1997), die das resultierende Plasmid pGE150 freundlicherweise zur Verfügung stellten.

- **pVP22-GFP:**

Analog zur Klonierung von pGE150 (siehe oben) wurde das *BglIII*-*BamHI*-Fragment von **ptk-VP22ep** (Dilber *et al.* 1999), welches die kodierende Sequenz von VP22 enthält, in den gleichartig geschnittenen Vektor **pEGFP-N1** (Clontech) eingefügt. Die entstehende VP22-GFP-Fusion steht dabei unter der Kontrolle des gleichen hCMV-Enhancer/Promotor-Fragmentes wie pcDNA3-GFP. Die komplette VP22-GFP-Expressionskassette unterscheidet sich dabei zu pGE150 nur in den 51 zusätzlichen bp der stromaufwärts gelegenen MCS.

- **6600-VP22:**

Dieser Kontrollvektor, der die Sequenz des adenoviralen Rekombinationsplasmides pTG6600 enthält, wurde aus **6600-TK-VP22** hergestellt: durch Verdau mit *BamHI* wurde die TK-Sequenz entfernt und der gewünschte Vektor durch anschließende Religation erzeugt.

- **Ad-VP22-GFP:**

Unter Verwendung der VP22-GFP-Expressionskassette aus pGE150 (Elliott & O'Hare 1997) wurde von J.B. Uney (Bristol, UK; Harding *et al.* 1998) ein rekombinanter Adenovirus hergestellt. Details der Klonierung sind nicht bekannt. Der entsprechende rekombinante Adenovirus wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

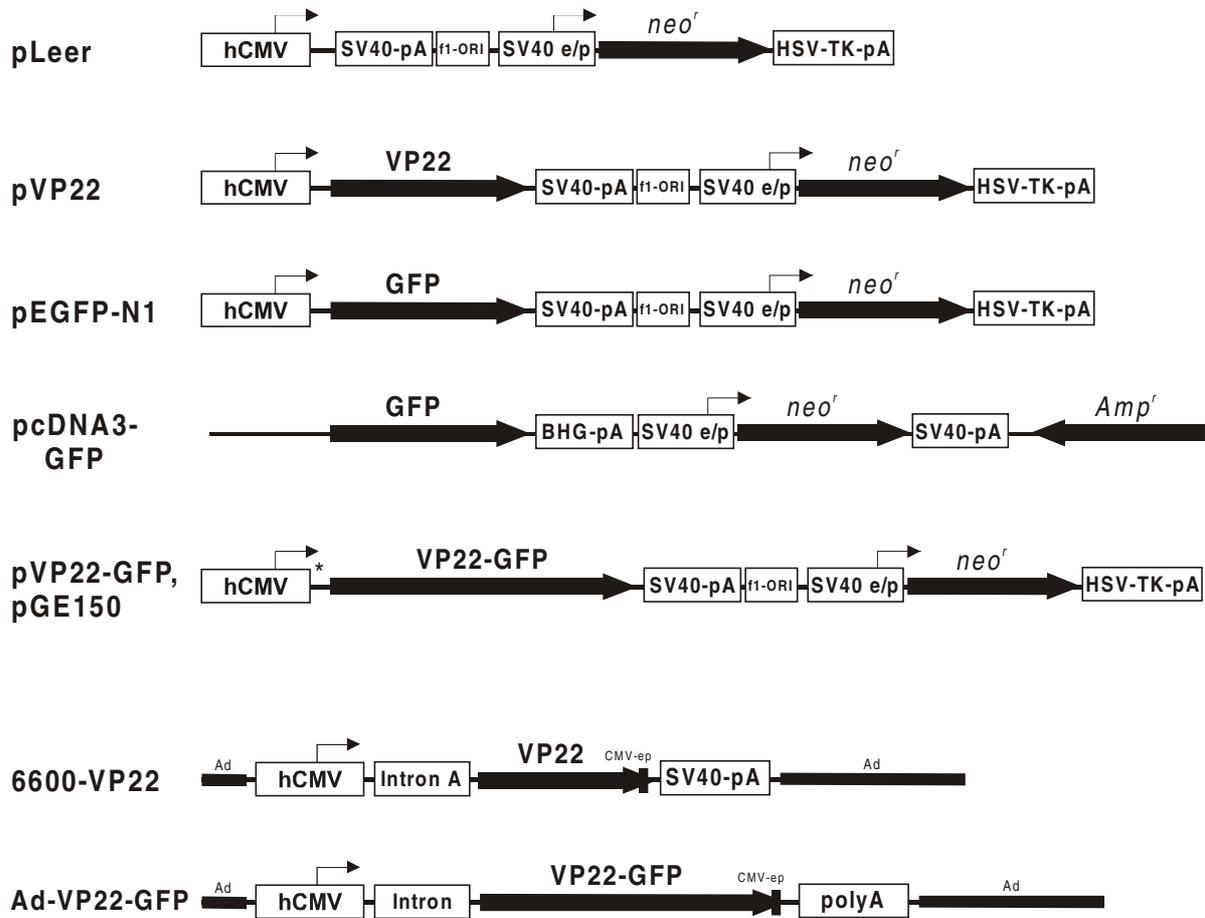


Abbildung 3.3: VP22-Expressions- und Reporter-Konstrukte.

* pVP22-GFP unterscheidet sich von pGE150 sich lediglich in 51 zusätzlichen bp stromaufwärts des VP22-GFP-Fusionsgens.

3.1.4 Sequenzierung der Konstrukte

Sämtliche durchgeführten Klonierungen wurden mit analytischen Verdauen durch Restriktionsendonukleasen charakterisiert und zusätzlich mittels Sequenzierung überprüft²⁷. Dabei ergab sich, dass die HSV-1 Thymidin-Kinase (TK) auf verschiedenen, auch kommerziell erhältlichen Plasmiden in 3 Subtypen existiert, die sich auf folgende Sequenzen zurückführen lassen:

²⁷ Die Sequenzierungen wurden von den Firmen SeqLab, GENterprise und Replikon durchgeführt.

- **macroplaque (MP) strain** (*Genebank accession number* V00470; McKnight 1980): davon abgeleitete Plasmide sind **ptk-VP22ep**, **pVP22-tkep** (Dilber *et al.* 1999) sowie alle TK-VP22-Fusionen der vorliegenden Arbeit. Zum CL101 *strain* ergeben sich 19 Unterschiede in der kodierenden Sequenz der TK, wobei 7 Aminosäure-Austausche resultieren. Dabei sind 4 dieser Mutationen konservativ (C6G, Q89R, V143I, G251C), 3 führen zu starken Veränderungen der Aminosäure (L42P, W256R, P321S). Zum *genome strain* bestehen 22 unterschiedliche bp, die ebenfalls in 7, zu CL101 teilweise jedoch unterschiedlichen Aminosäure-Austausche resultieren.
- **CL101 strain** (*Genebank accession number* J02224; Wagner *et al.* 1981): davon abgeleitete Plasmide sind **G1TKINa** (GTI), **pWZLneoTK** (Rogulski *et al.* 1997) sowie die pWZLneoTK-Derivate der vorliegenden Arbeit.
- **genome strain** (*Genebank accession number* X14112; ohne Literaturzitat): davon abgeleitete Plasmide sind **pHSV106** (Life Technologies) sowie alle Derivate davon in der vorliegenden Arbeit (z.B. 8347-TK). Zwischen CL101 und dem *genome strain* bestehen 13 bp Sequenz-Unterschied.

In der Literatur finden sich keine Anhaltspunkte darüber, ob die HSV-1 TK-Subtypen unterschiedliche Transkriptions- oder Expressionsverhalten aufweisen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Gene der *E. coli* Cytosin-Desaminase und HSV-1 VP22 wurden von einer singulären Quelle abgeleitet und weisen somit untereinander keine Sequenzdifferenzen auf.

Da die VP22-Fusionen der vorliegenden Arbeit größtenteils durch PCR-Klonierung erzeugt worden waren, wurde die komplette Expressionskassette der jeweiligen Plasmide sequenziert. Dabei ergaben sich folgende zusätzliche Sequenzunterschiede, die meistens in konservativen Aminosäure-Austauschen resultieren:

- P42P des TK Gens von 8347-TK.
- A51T des VP22-Gens von 6600-TK-VP22, 6600-CD-VP22 und 6600-CD-TK-VP22; die Fähigkeit des VP22-vermittelten interzellulären Transports wurde hierbei nicht beeinträchtigt.

Ergebnisse

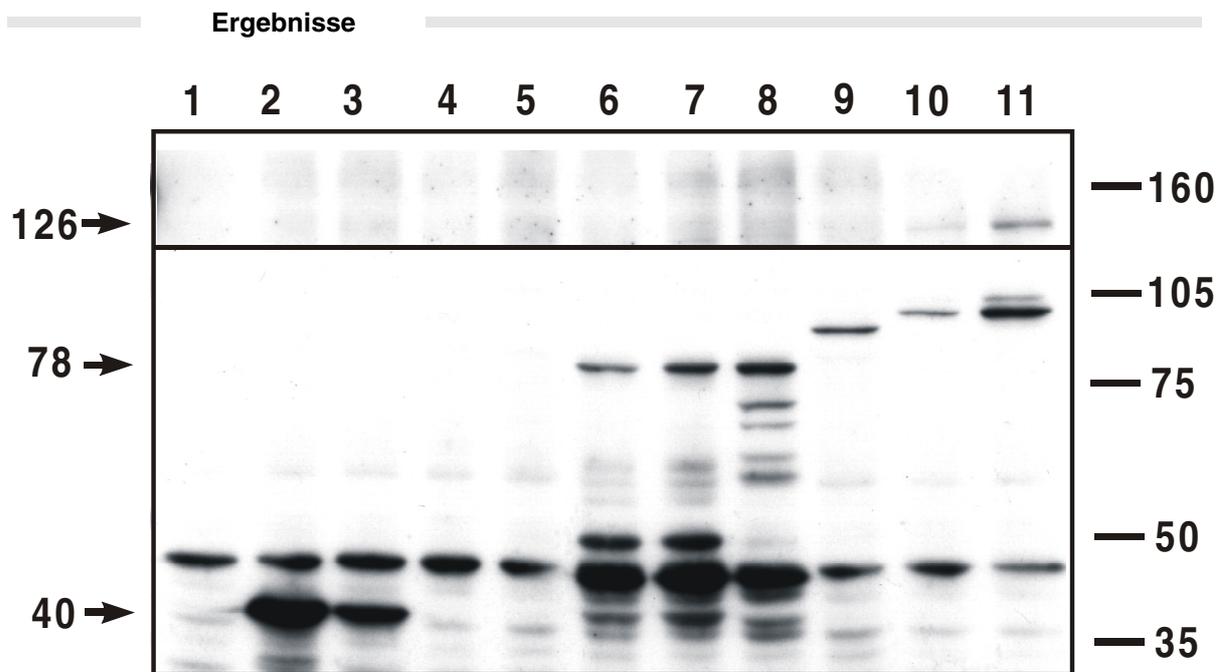
- Q342R des TK-Gens von pL-TK-VP22; diese konservative Mutation am C-terminalen Ende des TK-Gens resultierte weder in einer Beeinträchtigung des Transports noch des Suizidgen-Effektes.
- R176R des TK-Gens und P282L des VP22-Gens von 6600-VP22-TK; auch hier wurde keine Verminderung des VP22-vermittelten Proteintransports beobachtet.

3.1.4 Expressions-Analyse der Plasmidkonstrukte durch Western-Blotting

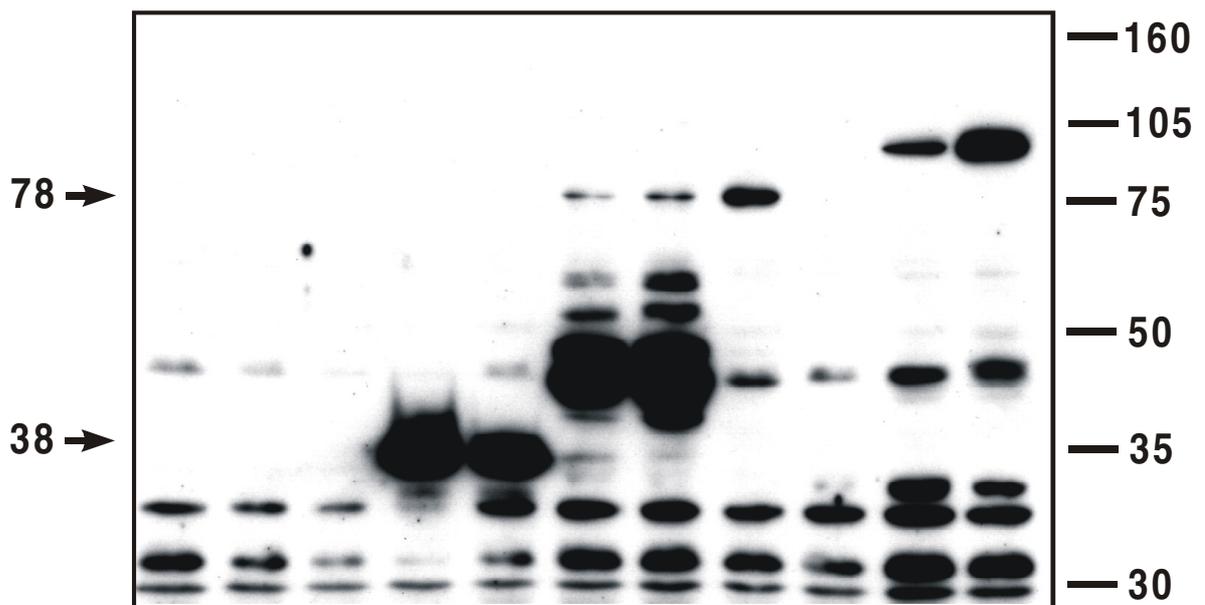
Um zu gewährleisten, dass die erzeugten Plasmidkonstrukte funktionelle Proteine der postulierten Größe exprimieren, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Eingesetzt wurden ein polyklonales Antiserum gegen HSV-1 VP22 (AGV30; freundlicherweise von P. O'Hare, MCRI, UK, zur Verfügung gestellt), ein polyklonales Antiserum gegen *E. coli* CD (Rogulski *et al.* 1997); freundlicherweise von C. Richards, Glaxo-Wellcome, zur Verfügung gestellt), sowie ein polyklonales Antiserum gegen HSV-1 TK (von W. Summers, Yale, USA, gegen Aufwandsentschädigung erhältlich). Somit konnten alle Teilbereiche der verwendeten Fusionskonstrukte einzeln detektiert werden, so dass auch interne Deletionen detektiert werden können.

Zunächst wurden COS-1- oder MH-Zellen mit je 2 µg DNA der retroviralen bzw. adenoviralen Expressionsplasmide (s. 3.1.1 und 3.1.2) transfiziert, nach 48 h geerntet, lysiert und das Gesamtprotein isoliert (s. 2.4.1). Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.4.3), auf eine PVDF-Membran transferiert (s. 2.4.4) und detektiert. Für die spezifische Detektion wurden als primäre Antikörper die oben aufgelisteten Reagenzien in den Verdünnungen 1:7.500 (anti-VP22), 1:1.000-3.000 (anti-CD) und 1:2.000 (anti-TK) verwendet. Als sekundärer Antikörper kam ein mit Meerrettich-Peroxidase- (*horseradish peroxidase*, HRP)-konjugierter Antikörper (Amersham-Pharmacia Biotech) in einer Verdünnung von 1:4.000 zum Einsatz, der gegen Kaninchen-IgG (anti-*rabbit*) gerichtet war.

Abbildung 3.4 zeigt die Western-Blot-Resultate für TK-enthaltende adenovirale Plasmidkonstrukte. Im oberen Teil der Abbildung sind die Ergebnisse bei Verwendung des polyklonalen TK-Antiserums dargestellt. Spuren 2 und 3 zeigen monomere TK-Proteine in der erwarteten Größe von 40 kDa, wobei die Expression des hCMV-Promotor-gesteuerten Konstruktes (Spur 2: 6600-TK) stärker ist als bei Verwendung des RSV-Promoters (Spur 3: 8347-TK). Das Kontrollplasmid pTG6600 ohne Transgen (Spur 1) zeigt kein TK-spezifisches Signal. Die Störbande in Höhe von knapp unter 50 kDa tritt bei allen Proben auf und resultiert aus einer unspezifischen Bindung des polyklonalen TK-Antiserums. In Spur 4 und 5 sind Lysate von VP22-Kontroll-Konstrukten aufgetragen, die kein TK-Gen enthalten und entsprechend nicht von anti-TK-Antikörpern erkannt werden.



anti-TK (polyklonal)



anti-VP22

Abbildung 3.4: Western-Blot-Nachweis der TK- und VP22-Expression mit adenviralen TK-Expressions-Plasmiden.

oben: Detektion mit polyklonalem anti-TK-Antiserum,

unten: Detektion mit polyklonalem anti-VP22-Antiserum.

jeweils Spur 1: pTG6600 (Negativkontrolle), Spur 2: 6600-TK, Spur 3: 8347-TK, Spur 4: 6600-VP22, Spur 5: pcGreen-VP22, Spur 6: 8347-TK-VP22, Spur 7: 6600-TK-VP22, Spur 8: 6600-VP22-TK, Spur 9: 6600-CD-TK, Spur 10: 6600-CD-TK-VP22, Spur 11: 6600-CD-ΔTK-VP22.

Pro Spur wurden 30 µg gesamtzelluläres Protein aufgetragen. Lysate wurden aus transfizierten COS-1-Zellen gewonnen.

Im unteren Teil der Abbildung 3.4 wurde anti-VP22 als Antiserum verwendet, welches das exprimierte Protein bei 6600-VP22 (Spur 4) und pcGreen-VP22 (Spur 5²⁸) in der postulierten Größe von 38 kDa erkennt. Die Fusion des Suizidgens TK mit VP22 wird in beiden Orientierungen TK-VP22 und VP22-TK, bei beiden eingesetzten Promotoren CMV und RSV und mit beiden Antikörpern anti-TK und anti-VP22 bei 78 kDa detektiert (Spur 6: 8347-TK-VP22, Spur 7: 6600-TK-VP22, Spur 8: 6600-VP22-TK). Auch hier resultiert die Verwendung des CMV-Promotors im Vergleich zum RSV-Promotor in einer größeren Proteinmenge. TK- und VP22-spezifische Fragmentierungsbanden wurden bei allen Fusionskonstrukten beobachtet (Spuren 6-11). Im Falle der Dreifach-Fusionen konnte bei Einsatz des anti-VP22-Antiserums kein Volllängen-Konstrukt detektiert werden (Spuren 10 und 11; unterer Teil der Abbildung, erwartete Größe: 126 kDa). Dieses wird erst bei deutlich längerer Belichtung und Verwendung von polyklonalem anti-TK-Serum sichtbar (oberer Teil der Abbildung 3.4; 126 kDa-Bande in Spur 10: 6600-CD-TK-VP22 und Spur 11: 6600-CD- Δ TK-VP22; letztere entspricht der verkürzten Version der CD-TK-VP22-Dreifach-Fusion). Da deutliche Fragmentierungsbanden bei 100 kDa auftreten (Abbildung 3.4 oben und unten: jeweils Spuren 10 und 11), ist hier die Menge der gebildeten Fusionsproteine mit voller Länge stark vermindert. Der ausbleibende Nachweis mit VP22-Antiserum (unten: Spuren 10 und 11) scheint bei C-terminaler Lage des VP22-Gens innerhalb der Fusion darauf hinzudeuten, dass überwiegend deletierte Versionen der CD-TK-VP22-Fusion gebildet werden. Die Doppelfusion der Suizidgene CD-TK (ohne VP22) mit einer Größe von 88 kDa wird wie erwartet nur von anti-TK (Spur 9: 6600-CD-TK; oben), nicht aber von anti-VP22 erkannt (unten).

Eine Western-Blot-Analyse der adenoviralen Plasmidkonstrukte, die das Suizidgen *E. coli* CD enthalten, mit polyklonalem anti-CD Serum in Abbildung 3.5 dargestellt. Die Expression unter Kontrolle des CMV-Promotors führt auch hier zu mehr CD-Protein als bei Verwendung des RSV-Pendants (Spur 2 oben: 6600-CD, Spur 3 oben: 8347-CD). In den Negativkontrollen „leerer“ Vektor (Spur 1 oben: pTG6600) und VP22-Monomer (Spur 4 oben: 6600-VP22), die kein CD-Gen enthalten, finden sich ausschließlich Hintergrundbanden. Im Gegensatz zu den TK-Expressionskonstrukten kann die Dreifach-Fusion bei

²⁸ dieses Plasmid dient nur hier als Kontrolle des monomeren VP22 und wurde ansonsten in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

Verwendung des CD-Antiserums deutlich mit einer Größe von 126 kDa nachgewiesen werden (Spur 8 oben: 6600-CD-TK-VP22, Spur 9 oben: 6600-CD- Δ TK-VP22; oben). Spur 7 oben (6600-CD-TK) zeigt die Suizidgen-Doppelfusion (ohne VP22) bei 88 kDa. Im Gegensatz zur C-terminalen Fusion von VP22 an CD (Spur 5 oben: 6600-CD-VP22) wurde die Fusion am N-Terminus (Spur 6 oben: 6600-VP22-CD) in Lysaten von COS-1-Zellen nur schwach detektiert (im Original-Blot sichtbar, in der Reproduktion der Abbildung 3.5 nicht zur Darstellung kommend).

Im unteren Teil der Abbildung ist dies noch einmal genauer untersucht worden: bei gleichen Kontrollen wie oben (Spur 1 unten: pTG6600 („leerer“ Vektor), Spur 2 unten: 6600-CD), wird die N-terminale Fusion VP22-CD (Spur 4 unten) im Gegensatz zu CD-VP22 (Spur 3 unten) kaum erkannt. Werden allerdings anstatt der Affennieren-Zelllinie COS-1 (Spuren 1-4 unten) Hepatomzellen der Ratte (MH-Zellen) zur Transfektion verwendet, erscheint bei gleich aufgetragenen Proteinmengen die VP22-CD-Fusion in ähnlich starker Intensität (Spur 5 unten: 6600-VP22-CD) wie das CD-VP22-Pendant. Die Ursache dieses Zelllinien-spezifischen Unterschieds ist unklar; der verwendete Vektor verfügt grundsätzlich über eine mit den anderen Vektoren vergleichbare Expressionskapazität.

Im Gegensatz zu adenoviralen Expressionsplasmiden bilden die hergestellten retroviralen Konstrukte auf Grund des schwachen murinen LTR-Promotors nach Transfektion nur geringe Mengen an Protein, so dass an dieser Stelle auf die Darstellung des Expressions-Nachweises durch Western-Blot verzichtet wurde. Auch nach Transduktion mit retroviralen Vektorpartikeln war die Expression im Western-Test deutlich schwächer (Daten nicht gezeigt) als bei Verwendung von rekombinanten Adenoviren (siehe 3.2.2). Folglich wurden retrovirale Konstrukte nur durch indirekte Immunfluoreszenz ausgewertet (siehe 3.4.3).

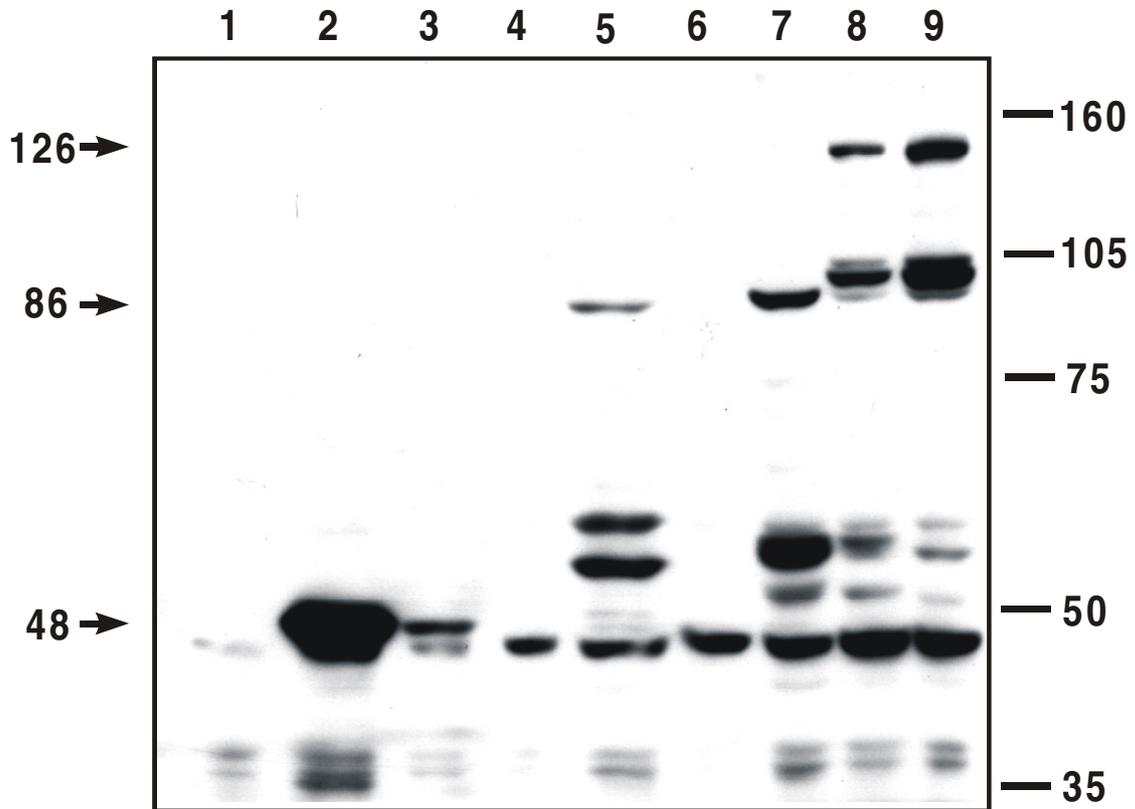
Abbildung 3.5 (folgende Seite): Western-Blot-Nachweis der CD-Expression mit adenoviralen CD-Expressionsplasmiden.

oben: Detektion mit polyklonalem anti-CD-Antiserum; Lysate aus transfizierten **COS-1-Zellen**.

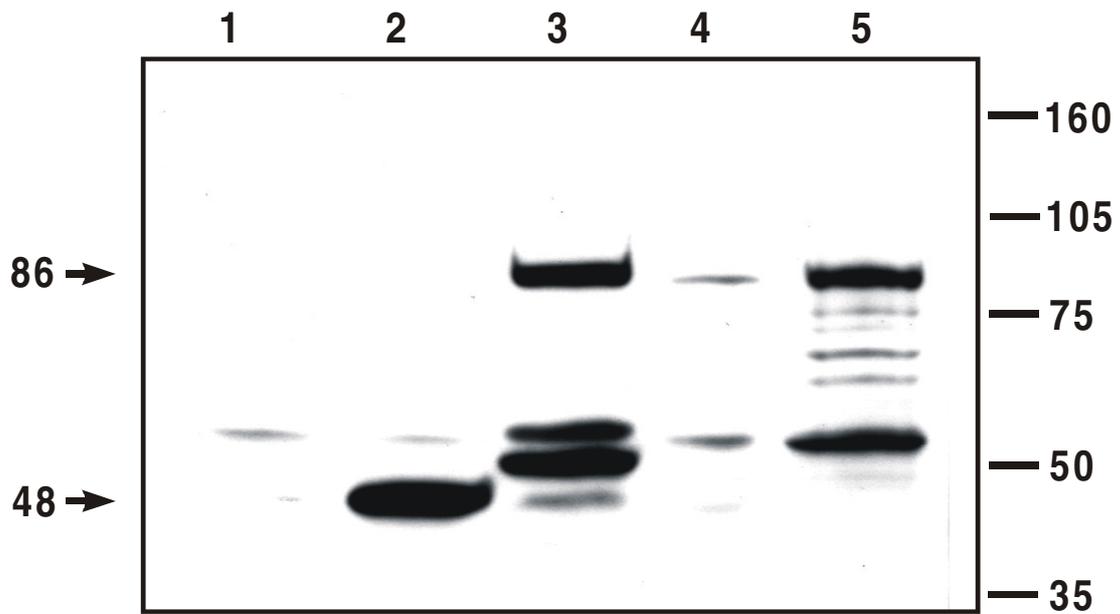
Spur 1: pTG6600 (Negativkontrolle), Spur 2: 6600-CD, Spur 3: 8347-CD, Spur 4: 6600-VP22 (Negativkontrolle für anti-CD), Spur 5: 6600-CD-VP22, Spur 6: 6600-VP22-TK, Spur 7: 6600-CD-TK, Spur 8: 6600-CD-TK-VP22, Spur 9: 6600-CD- Δ TK-VP22. Pro Spur wurden 30 μ g gesamtzelluläres Protein aufgetragen. Lysate wurden aus transfizierten COS-1-Zellen gewonnen.

unten: Detektion mit polyklonalem anti-CD-Antiserum; Lysate aus transfizierten **COS-1-** (Spuren 1-4) oder **MH-Zellen** (Spur 5).

Spur 1: pTG6600 (Negativkontrolle), Spur 2: 6600-CD, Spur 3: 6600-CD-VP22, Spur 4: 6600-VP22-CD, Spur 5: 6600-VP22-CD. Pro Spur wurden 30 μ g gesamtzelluläres Protein aufgetragen. Lysate wurden aus transfizierten COS-1- oder MH-Zellen gewonnen.



anti-CD



anti-CD

3.2 Herstellung rekombinanter Adenoviren

3.2.1 Homologe Rekombination

Adenovirale Vektoren wurden durch homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183 hergestellt (s. 2.1.2, 2.3.1.1; Chartier *et al.* 1996). Die Ausgangsplasmide zur Herstellung rekombinanter Adenoviren sind die Rekombinationsplasmide pTG6600 und pTG8347. Diese enthalten adenovirale Sequenzen, die den Bereich der Expressionskassette umgeben (s. 2.1.1). Die für die Rekombination relevanten Sequenzbereiche der in 3.1.2 aufgelisteten Rekombinationsplasmide wurden mittels *Apa*LI- oder *Drd*I-Verdau freigesetzt bzw. linearisiert und nachfolgend gelgereinigt. Für die Co-Transformation von *E. coli* BJ5183 wurden im Regelfall 100 ng des gereinigten Fragmentes und 100 ng des Genom-Plasmids pTG3602 verwendet (s. 2.3.1.1). Die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone wurde anschließend einem Restriktionsverdau unterzogen. Dabei wurden Enzyme verwendet, die im Agarose-Gel aussagekräftige Bandenmuster ergeben, so dass sich Ausgangs-Genom-Plasmid und rekombinantes Plasmid leicht unterscheiden lassen. Die auf diese Weise identifizierten rekombinanten Plasmide wurden in den Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue umtransformiert, vermehrt und abschließend erneut durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen charakterisiert. Die entstehenden Plasmide enthalten jeweils die Sequenzen bp 1-454 sowie bp 3329-35935 des Genoms von Ad5. Der E1-Genbereich ist dabei deletiert und durch die Expressionskassette des gewünschten Transgens ersetzt. Nach Linearisierung der rekombinanten Virusgenome mit *Pac*I erfolgt die Transfektion in 293-Zellen. Diese können die E1-deletierten Plasmide komplementieren, da die zur Herstellung adenoviraler Partikel notwendigen E1-Genprodukte von der 293-Zelllinie stabil exprimiert werden. Dabei entstehen rekombinante adenovirale Partikel, die geerntet und in 293-Zellen vermehrt werden. Vermehrung, Virussernte und Reinigung des Rohextraktes durch Cäsiumchlorid-Zentrifugation sind in 2.3.1.2 beschrieben. Die Titer der gereinigten Adenovirus-Lösungen lagen zwischen 1×10^9 und 5×10^{12} pfu/ml Viruslösung.

Alle gereinigten Viruspräparationen wurden auf Verunreinigung mit Wildtyp-Adenovirus getestet (s. 2.3.1.3; nicht gezeigt). Dabei wird eine PCR gleichzeitig mit zwei Primerpaaren durchgeführt. Das erste Primerpaar bindet im E1-Bereich, der bei rekombinanten Adenoviren deletiert ist, und dient somit der Detektion der Wildtyp-Kontamination. Als interne Kontrolle dient das zweite Primerpaar, welches in der konstitutiv vorhandenen

E2B-Region bindet (Zhang *et al.* 1995). Darüber hinaus wurde das Vorhandensein der inklonierten Transgene durch PCR-Amplifikation mit Primern nachgewiesen, die stromaufwärts und -abwärts der jeweiligen Expressionskassette binden (nicht gezeigt).

3.2.2 Expressions-Analyse der Adenovirus-Vektoren durch Western-Blotting

Wie schon bei den Plasmidkonstrukten fand der Nachweis der viral vermittelten Expression durch Western-Blotting statt. Die verwendeten Antikörper anti-VP22, anti-TK und anti-CD sind bereits in 3.1.4 aufgelistet; zusätzlich kam ein monoklonaler Antikörper CMV-018-48151 (Capricorn Products), der die hCMV-Epitop-Sequenz ERKTPRVTGG (CMV-ep) erkennt, zum Einsatz. Somit konnten alle Teilbereiche der verwendeten Fusionskonstrukte wie auch das C-terminale Epitop einzeln detektiert werden, so dass jegliche, unter Umständen auftretende Trunkierungen als Abweichungen vom Volllängenprodukt sichtbar gemacht werden konnten.

Dazu wurden COS-1-Zellen mit den rekombinanten Suizidgen-exprimierenden Adenoviren mit einer MOI von 10 transduziert, nach 48 h geerntet, lysiert und das Gesamtprotein isoliert (s. 2.4.1). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben (s. 2.4.3) und dem Transfer auf eine PVDF-Membran (s. 2.4.4) fand die eigentliche Detektion statt. Als primäre Antikörper dienten die oben aufgelisteten Reagenzien in den Verdünnungen 1:7.500 (anti-VP22), 1:1.000-3.000 (anti-CD), 1:2.000 (anti-TK) und 1:3000 (anti-CMV-ep). Als sekundäre Antikörper kamen HRP-konjugierte Antikörper (Amersham-Pharmacia Biotech) in einer Verdünnung von 1:4.000 zum Einsatz, die wahlweise gegen Kaninchen (anti-*rabbit*; detektiert die polyklonalen Antiseren) oder Maus (anti-*mouse*; detektiert die monoklonalen Antikörper) gerichtet waren.

In Abbildung 3.6 ist die Western-Blot-Analyse der CD-enthaltenden Adenovirus-Vektoren mit den Antikörpern anti-CD (oben), anti-VP22 (Mitte) und anti-CMV-ep (unten) gegenüber gestellt. Dabei sind die Spuren 1 bis 8 in allen drei Teilbereichen analog aufgetragen. Die CD-Konstrukte ohne Fusionspartner werden erwartungsgemäß nur vom CD-Antiserum erkannt (jeweils Spur 2: Ad-RSV-CD, Spur 3: Ad-CMV-CD), wobei bei Verwendung des CMV-Promoters mehr Protein gebildet wird als mit dem RSV-Pendant. Die Negativkontrolle (jeweils Spur 1: uninfiziert) zeigt keine spezifischen Banden. Sowohl die N- als

auch die C-terminale Fusion von CD mit VP22 lassen sich bei einer Größe von 86 kDa von beiden Antiseren detektieren (Spur 4: Ad-CMV-CD-VP22, Spur 5: Ad-CMV-VP22-CD; oben und Mitte). Da bei der Konstruktion des Rekombinations-Vektors 6600-VP22-CD das CMV-Epitop nicht mehr im Leserahmen des Restproteins liegt, ist bei Verwendung von anti-CMV-ep kein Protein nachweisbar (Spur 5: Ad-CMV-VP22-CD; unten), was als interne Kontrolle des Antikörper-Spezifität diente. Die umgekehrte Fusion mit intaktem Leserahmen ist dagegen direkt detektierbar (Spur 4: Ad-CMV-CD-VP22; unten). Der Nachweis der Expression der Dreifach-Fusion CD-TK-VP22 in voller Länge gelang mit allen drei Antikörpern (jeweils Spur 7: Ad-CMV-CD-TK-VP22, Spur 8: Ad-CD- Δ TK-VP22), wobei auch verkürzte Produkte detektiert wurden. Aus dem Blot ergibt sich jedoch, dass bei Verwendung adenoviraler Expressionsvektoren die Dreifach-Fusion in ausreichender Menge synthetisiert wird. Dabei ist die gebildete Proteinmenge der Fusion mit direkter CD-TK-Verknüpfung – bei gleich aufgetragener Gesamtproteinmenge – größer als mit Glycin-Linker-Verbindung (s. 3.1.2). Schließlich wird die CD-TK-Doppel-Fusion mit einer Größe von 88 kDa bei Abwesenheit beider anderer detektierbarer Polypeptidketten nur vom polyklonalen CD-Antiserum erkannt (Spur 6: Ad-CMV-CD-TK; oben).

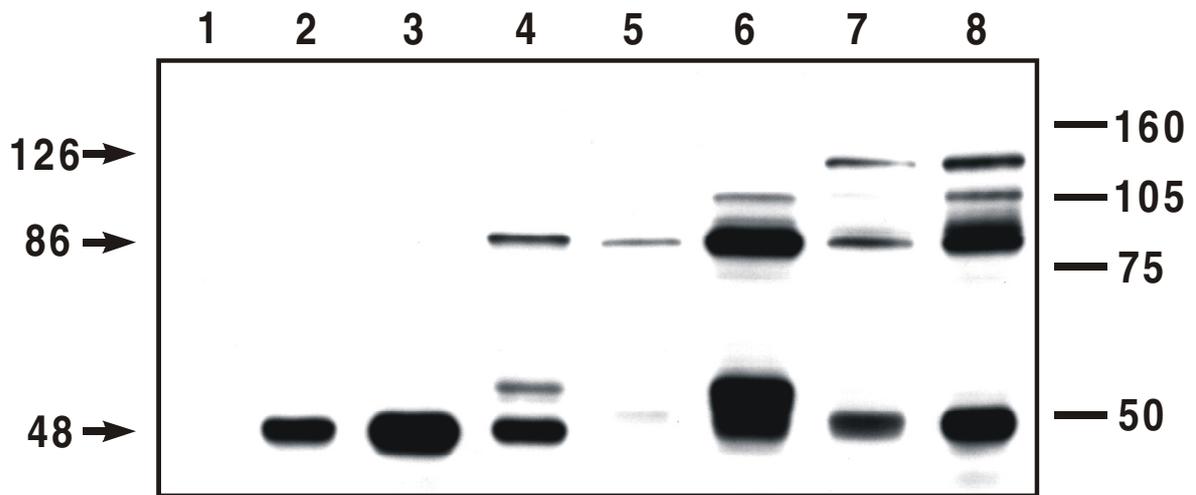
Abbildung 3.6 (folgende Seite): Western-Blot-Nachweis der CD-, VP22- und CMV-ep-Expression mit CD-Adenovirus-Vektorpartikeln.

oben: Detektion mit polyklonalem anti-CD-Antiserum

Mitte: Detektion mit polyklonalem anti-VP22-Antiserum

unten: Detektion mit monoklonalem anti-CMV-ep-Antikörper

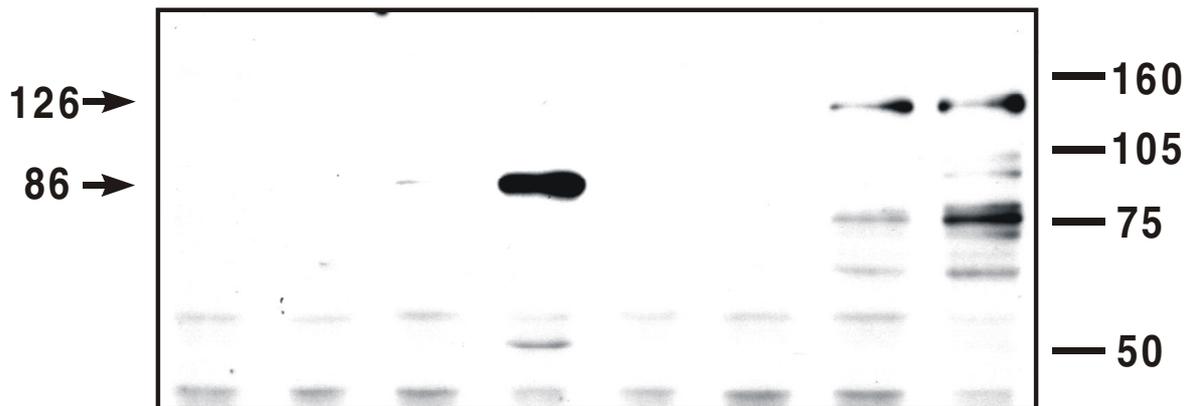
jeweils Spur 1: uninfizierte COS-1-Zellen (Negativkontrolle), Spur 2: Ad-RSV-CD, Spur 3: Ad-CMV-CD, Spur 4: Ad-CMV-CD-VP22, Spur 5: Ad-CMV-VP22-CD, Spur 6: Ad-CMV-CD-TK, Spur 7: Ad-CMV-CD-TK-VP22, Spur 8: Ad-CD- Δ TK-VP22. Pro Spur wurden 100 μ g gesamtzelluläres Protein aufgetragen. Lysate wurden aus Ad-transduzierten COS-1-Zellen gewonnen (MOI 10).



anti-CD



anti-VP22



anti-CMV-ep

Die Expressionskontrolle der adenoviralen Konstrukte mit TK als Suizidgen ist in Abbildung 3.7 dargestellt. In Vorversuchen stellte sich heraus, dass bei Verwendung des Vektors Ad-RSV-TK-VP22 keine detektierbaren Proteine gebildet wurden. Dies steht im Gegensatz zu den Western-Blot-Ergebnissen des analogen Plasmidkonstruktes 8347-TK-VP22 (Abbildung 3.4, jeweils Spur 6), bei denen Banden gefunden wurden. Eine Deletion lag jedoch nicht vor, da eine PCR-Analyse der adenoviralen DNA das Vorhandensein der Expressionskassette in der erwarteten Größe nachwies (nicht gezeigt). In den weiteren Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde auf die Verwendung von Ad-RSV-TK-VP22 Vektorpartikeln verzichtet.

Wie bei Abbildung 3.6. sind im oberen (polyklonales anti-TK-Antiserum), mittleren (polyklonales anti-VP22-Antiserum) und unteren (monoklonaler anti-CMV-ep-Antikörper) Teil der Darstellung in gleichen Spuren Lysate gleicher Proben aufgetragen, um den Vergleich der unterschiedlichen Detektions-Entitäten zu erleichtern. Dabei wird, wobei ausgehend vom CMV-Promotor mehr Produkt gebildet wird, Thymidin-Kinase mit einer Größe von 40 kDa nur durch anti-TK erkannt (jeweils Spur 2: Ad-RSV-TK, Spur 3: Ad-CMV-TK). Dagegen ist die Fusion von TK mit VP22 (78 kDa) in beiden Kombinationen mit allen drei Antikörpern nachweisbar (Spur 4: Ad-CMV-TK-VP22, Spur 5: Ad-CMV-VP22-TK). Da bei 6600-VP22-TK das CMV-Epitop im Leserahmen liegt, wird dieses – im Gegensatz zur VP22-CD-Fusion, siehe Abbildung 3.5 – auch durch anti-CMV-ep erkannt (Spur 5: Ad-CMV-VP22-TK; unten). Der Expressionsnachweis der Fusion CD-TK-VP22 gelingt ebenfalls mit allen drei Antikörpern (jeweils Spur 7: Ad-CMV-CD-TK-VP22, Spur 8: Ad-CD- Δ TK-VP22), wobei mit anti-TK die Detektionsgrenze erreicht wird. Wiederum zeigt sich eine leicht verbesserte Expression der kürzeren CD-TK-Verbindung gegenüber der Glycin-Verknüpfung. Verkürzte Fragmente sind bei allen Fusionsproteinen in unterschiedlichen Mengen nachweisbar. Die CD-TK-Doppel-Fusion kann wie erwartet nur vom anti-TK-Serum erkannt werden (Spur 6: Ad-CMV-CD-TK; oben).

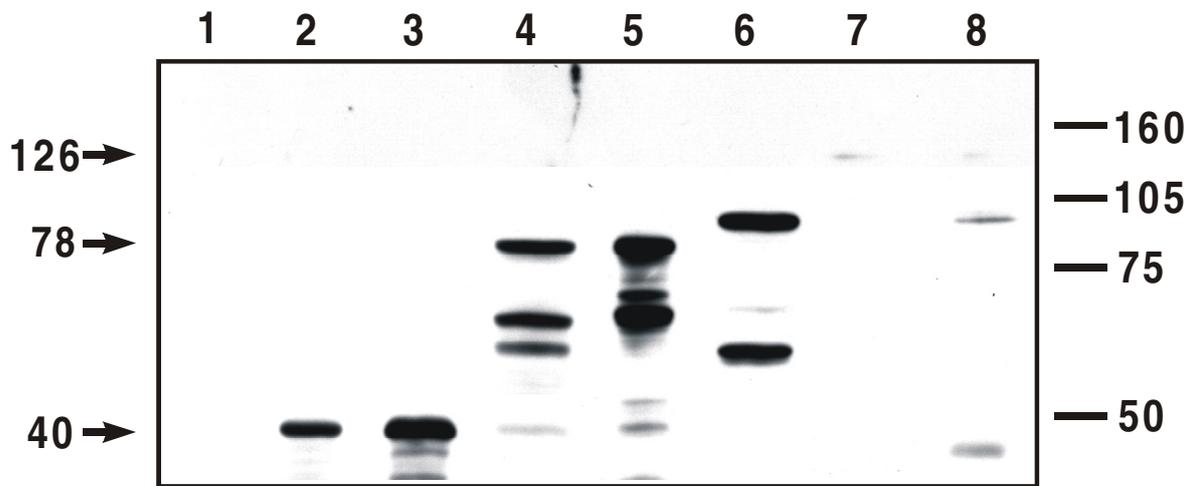
Abbildung 3.7 (folgende Seite): Western-Blot-Nachweis der TK-, VP22- und CMV-ep-Expression mit TK-Adenovirus-Vektorpartikeln.

oben: Detektion mit polyklonalem anti-TK-Antiserum

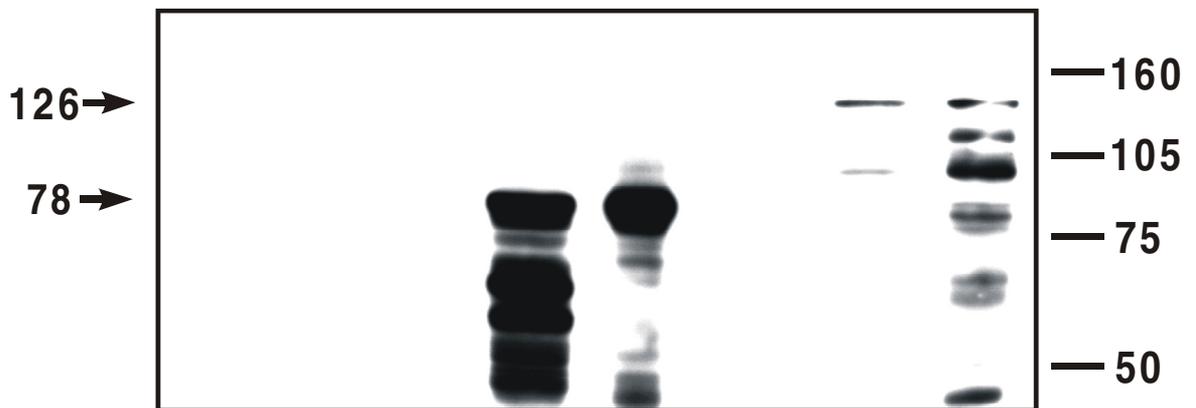
Mitte: Detektion mit polyklonalem anti-VP22-Antiserum

unten: Detektion mit monoklonalem anti-CMV-ep-Antikörper

jeweils Spur 1: uninfizierte COS-1-Zellen (Negativkontrolle), Spur 2: Ad-RSV-TK, Spur 3: Ad-CMV-TK, Spur 4: Ad-CMV-TK-VP22, Spur 5: Ad-CMV-VP22-TK, Spur 6: Ad-CMV-CD-TK, Spur 7: Ad-CMV-CD-TK-VP22, Spur 8: Ad-CD- Δ TK-VP22. Bedingungen wie bei Abbildung 3.6.



anti-TK (polyklonal)



anti-VP22



anti-CMV-ep

Ergebnisse

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der erreichbaren Proteinmenge zu der Menge an zur Transduktion eingesetzten Vektorpartikeln wurden die beiden Kontrollviren Ad-VP22 und Ad-VP22-GFP in unterschiedlichen Mengen zur Transduktion von COS-1-Zellen eingesetzt und nachfolgend die erzielte Expression durch Western-Blotting (Methode siehe oben) quantifiziert (Abbildung 3.8). Werden mehr als 100 adenovirale Vektorpartikel pro Zelle eingesetzt (MOI > 100) kommt es bei COS-Zellen zur massiven Zell-Lyse, so dass diese Präparationen nicht mehr ohne Qualitätsverluste analysiert werden können. In der Abbildung dargestellt ist eine absteigende Partikelzahl von MOI 30 bis MOI 0,1. Es zeigt sich, dass die gebildete Proteinmenge auch bei einer MOI von nur 0,1 noch gut nachweisbar ist. Die exprimierten Produkte VP22 bzw. VP22-GFP wurden in den erwarteten Größen von 38 bzw. 65 kDa detektiert.

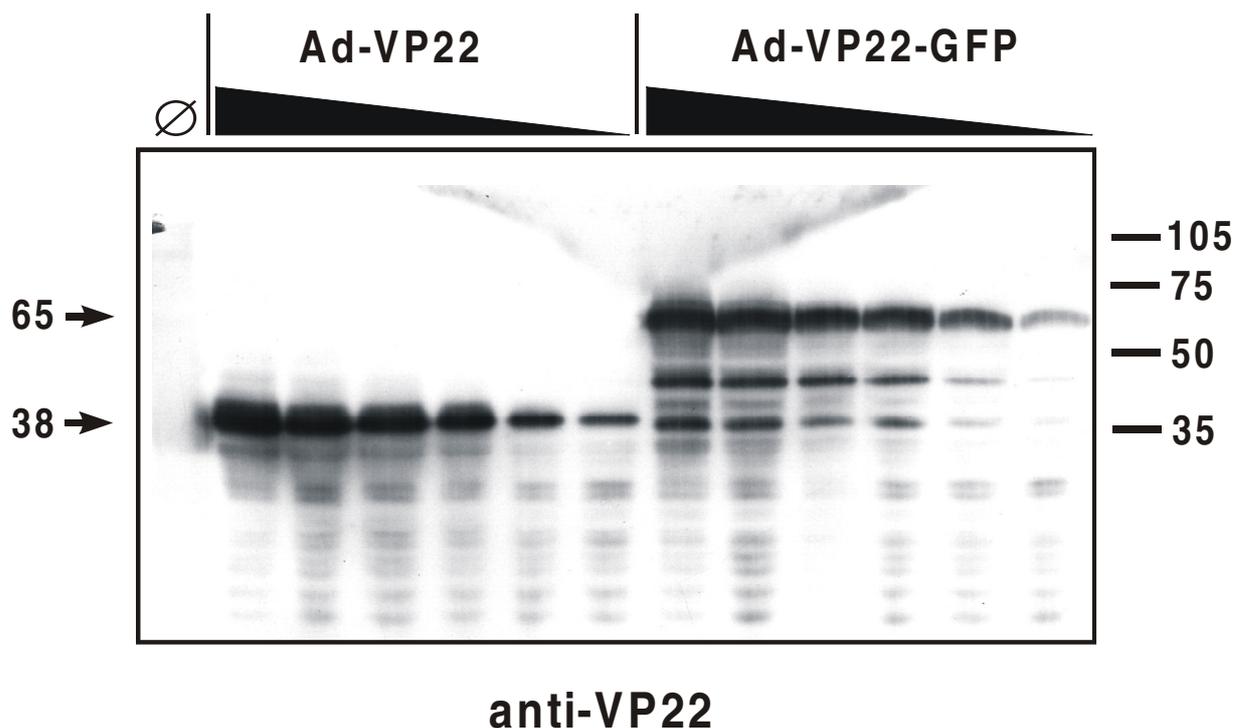


Abbildung 3.8: Western-Blot-Nachweis der VP22- und GFP-Expression mit Adenovirus-Kontroll-Vektoren.

Spur 1: uninfizierte COS-1-Zellen (Negativkontrolle), Spuren 2-7: Ad-CMV-VP22 (MOI 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1), Spuren 8-13: Ad-CMV-VP22-GFP (MOI 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1). Pro Spur wurden 100 µg gesamtzelluläres Protein aufgetragen. Lysate wurden aus Ad-transduzierten COS-1-Zellen gewonnen, zur Detektion wurde polyklonales anti-VP22-Antiserum verwendet (1:10.000).

3.3 Quantifizierung von VP22-vermitteltem *spread* in Säugerzelllinien

3.3.1 VP22-GFP als Modellprotein

Die Fähigkeit von VP22, chimäre Proteine, bestehend aus dem therapeutischen Protein und VP22 selbst, effektiv in die umgebenden Zellen zu transportieren, wurde bislang nur exemplarisch an wenigen Zelllinien ausgetestet (Dilber *et al.* 1999; Phelan *et al.* 1998; Elliott & O'Hare 1997). Zur Beantwortung der Frage nach einer universellen Einsetzbarkeit dieses Transportsystem bei der Verbesserung des therapeutischen Gentransfers war es notwendig, zu untersuchen, ob dieser VP22-vermittelte *spread* ein generelles biologisches Phänomen darstellt. Dazu wurde der VP22-Transport in 15 gebräuchlichen Säugerzelllinien, die von den unterschiedlichsten Geweben bzw. Organen abgeleitet sind, untersucht.

Als Modellprotein zur Messung des interzellulären Transports wurde VP22-GFP gewählt, da die GFP-Fluoreszenz sowohl lichtmikroskopisch als auch durch FACS-Analyse leicht detektiert werden kann. Die verwendeten Plasmide sind in Abbildung 3.3 aufgelistet. Als Vergleichskonstrukt zur Messung der GFP-Basis-Expression wurde pcDNA3-EGFP verwendet, welches nur für die GFP-Sequenz kodiert. Dieses Vergleichskonstrukt diene zur Standardisierung des Expressionsvergleichs nach transienter Transfektion, obwohl beide eingesetzte VP22-GFP-Fusionsplasmide von einem davon unterschiedlichen Basiskonstrukt, pEGFP-N1 (Clontech), abgeleitet waren. Wie eine Western-Blot-Analyse mit M-12-Zellen (eine Zelllinie, in der der VP22-Transport sehr gut nachweisbar ist, vergleiche Tabelle 3.1) zeigt, war die GFP-Expression nach Transfektion mit pEGFP-N1 deutlich stärker (Abbildung 3.9, Spur 4) als bei den drei weiteren GFP-Plasmiden (Spuren 1 bis 3). Dies kann auf die beträchtlich kleinere Größe des pEGFP-N1-Plasmids (4.7 kb) zurückgeführt werden, die zu einer höheren Transfektionseffizienz führt. Während alle vier im Western-Blot getesteten Plasmide die gleiche hCMV-Enhancer/Promotor-Kassette enthalten, zeigten nur pGE150, pVP22-GFP sowie pcDNA3-EGFP auf Grund ähnlicher Vektorgröße vergleichbare Expressionsniveaus (Abbildung 3.9, Spuren 1 bis 3) und wurden deshalb für die nachfolgenden Experimente ausgewählt. Die Plasmide pGE150 und pVP22-GFP enthalten dabei die Fusion VP22-GFP (65 kDa-Produkt; ein Degradationsprodukt ist ebenfalls im Western-Blot zu erkennen), pcDNA3-EGFP enthält hingegen nur die GFP-Sequenz (27 kDa-Protein).

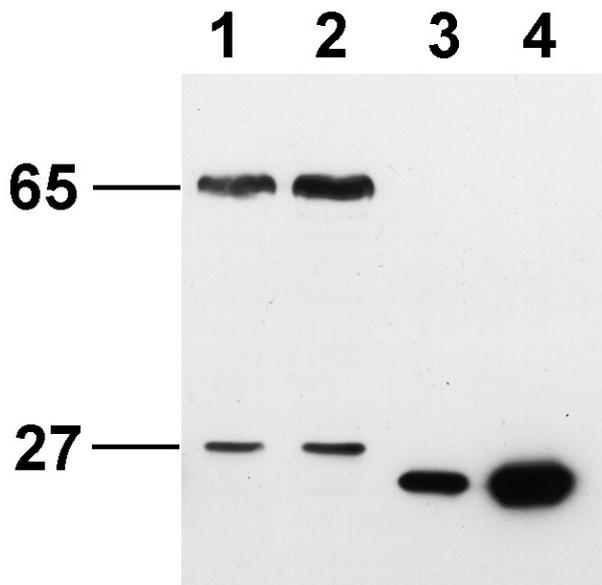


Abbildung 3.9: Western-Blot-Nachweis der GFP- und VP22-GFP-Fusionsproteine.

Spur 1: pGE150, Spur 2: pVP22-GFP, Spur 3: pcDNA3-EGFP, Spur 4: pEGFP-N1.

Pro Spur wurden 50 µg gesamtzelluläres Protein aufgetragen.

Lysate wurden aus transfizierten M-12-Zellen gewonnen (1 µg Plasmid-DNA); zur Detektion wurde polyklonaler anti-GFP-Antikörper (Clontech) verwendet (1:5.000).

Zur direkten Visualisierung des VP22-Transport-Effektes wurden zunächst exemplarisch die Zelllinien M-12, HeLa und COS-1 mit GFP- und VP22-GFP-Plasmiden transfiziert, Methanol-fixiert und mit Antikörpern gefärbt (Protokoll der Immunfluoreszenz-Färbung s. 2.2.6). Die Untersuchung der Proben im konfokalen Mikroskop ergab das für VP22 typische zweigeteilte Verteilungsmuster (Abbildung 3.10, linke Hälfte: Bilder A, C, E): ein Teil der transfizierten Zellen zeigt cytoplasmatische Anfärbung, während die umgebenden Zellen ausschließlich nucleäre Fluoreszenz aufweisen, was dem VP22-vermittelten *spread* in die Nachbarzellen entspricht. Im Gegensatz dazu ist bei Zellen, die mit dem GFP-Kontrollplasmid pcDNA3-EGFP transfiziert wurden, die GFP-Fluoreszenz nur im Cytoplasma detektierbar, ohne Akkumulation in Nuclei der Nachbarzellen (Abbildung 3.10, rechte Hälfte: Bilder B, D, F). Dabei ist zu beachten, dass der Nachweis der GFP-Fluoreszenz nach VP22-vermitteltem Transport nur mittels Antikörper-Anfärbung möglich ist. Die Detektion der direkten GFP-Fluoreszenz mit dieser Methode wird normalerweise stark durch Quencheffekte (auf Grund der Fixierungsprozedur) beeinträchtigt.

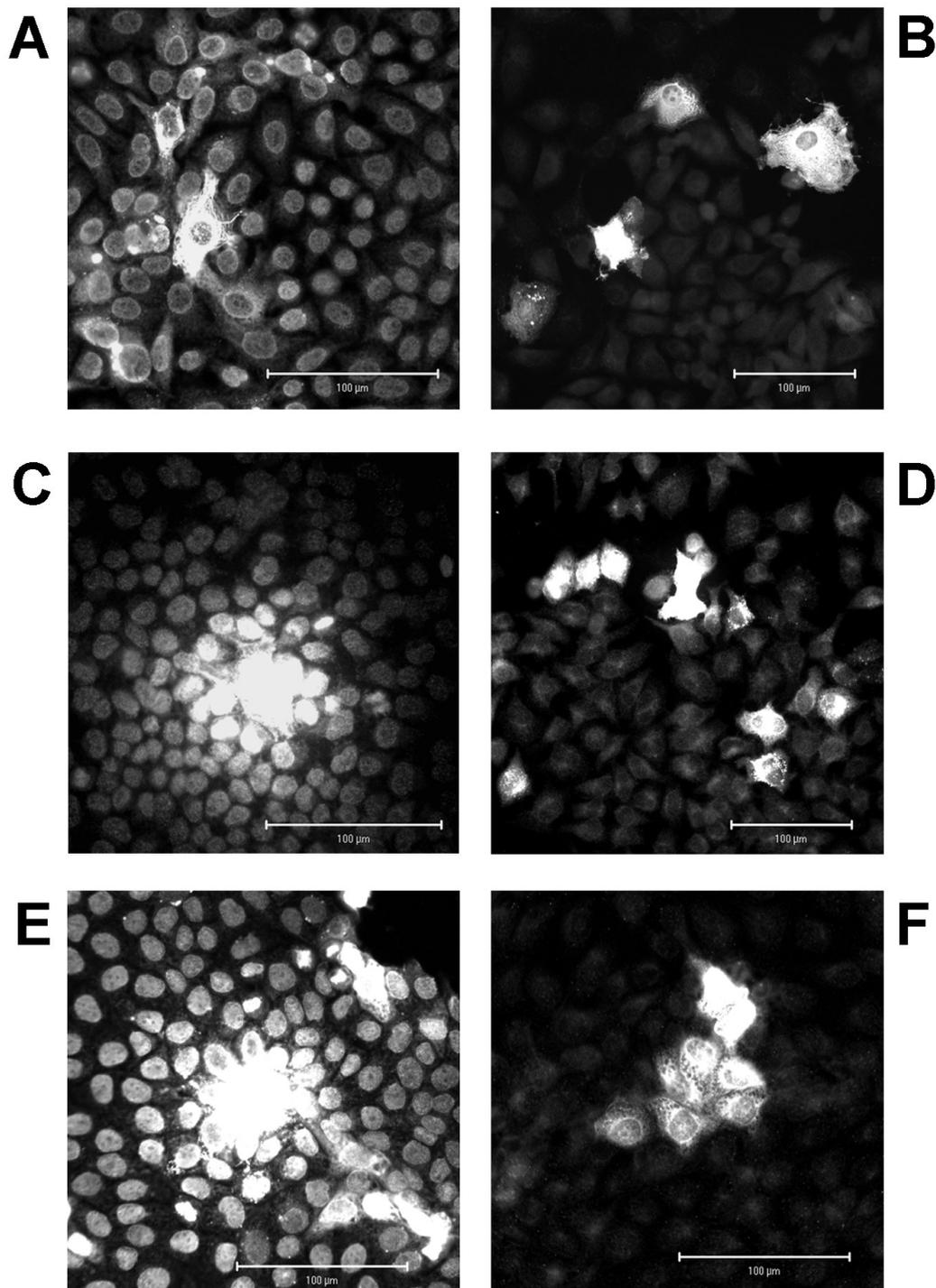


Abbildung 3.10: Immunhistochemische Lokalisation der GFP- und VP22-GFP-Fusionsproteine durch konfokale Mikroskopie.

COS-1- (Bilder A und B), HeLa- (C und D) und M-12-Zellen (E und F) wurden mit 500-2000 ng Expressionsplasmid pGE150 (VP22-GFP-Fusion; links: Bilder A, C, E) oder pcDNA3-EGFP (GFP alleine; rechts: Bilder B, D, F) mit LipofectAMINE™ transfiziert. Die Immunfluoreszenz-Detektion erfolgte 40-44 h später durch polyklonales anti-GFP-Antiserum (Clontech; 1:5.000). Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen Mikroskop vorgenommen. Der Strich entspricht 100 μm Länge.

3.3.2 FACS-Analyse des VP22-vermittelten *spread*

Um die aufwändige Prozedur der Fixierung und Antikörper-Färbung der Zellen zur Analyse mittels konfokaler Mikroskopie zu umgehen, wurde untersucht, ob ein Nachweis des VP22-vermittelten Transports auch durch direkte Detektion der GFP-Fluoreszenz erbracht werden kann. Eine einfache Methode zum Vergleich der GFP-Expression ist die *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Analyse (s. 2.2.5). In Vorversuchen wurde zunächst festgestellt, dass der Prozentsatz der primär durch VP22-GFP-Transfektion fluoreszierenden Zellen wie auch der Anteil der durch VP22-Transport GFP-fluoreszierenden Nachbarzellen von folgenden Parametern abhängt: (1) der jeweiligen Zelllinie selbst, (2) der Menge an für die Transfektion verwendetem Expressionplasmid (getesteter Bereich: 200 – 2000 ng) und (3) dem benutzten Transfektions-Reagenz (hier: LipofectAMINE™ und LipofectIN™; die verschiedenen polykationischen Lipid-Gemische ergaben in verschiedenen Zelllinien nicht nur unterschiedliche Transfektions-Effizienzen, sondern zeigten auch unterschiedliche Toxizitäts-Profile). Folglich wurde versucht, diesen unterschiedlichen Anforderungen in den quantitativ auszuwertenden Transfektionen Rechnung zu tragen. Dazu wurden alle 15 ausgewählten Säuger-Zelllinien mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert, nach 48 h ohne weitere Fixierung oder Färbung mit Antikörpern in Suspension genommen und anschließend mittels FACS analysiert (Tabelle 3.1). Für alle 15 getesteten Zelllinien wurde gefunden, dass der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen mit VP22-GFP (also die kumulierte Expression der primär transfizierten Zellen plus der durch VP22-*spread* positiven Nachbarzellen) höher ist als die GFP-Basis-Expression (kein *spread*). Die entsprechenden FACS-Analyse-Kurven sind beispielhaft für die M-12-Zelllinie in Abbildung 3.11 dargestellt. Die Expression von VP22-GFP resultierte in 50,5% GFP-positiven Zellen (mit *spread*), während bei Expression von GFP alleine (kein *spread*) lediglich 12,3% GFP-positive M-12-Zellen gefunden wurden. Der Anteil GFP-fluoreszierender Zellen liegt somit für das Fusionsprotein bei M-12-Zellen um den Faktor 4,2 höher als für GFP alleine. Vergleicht man die verwendeten Zelllinien untereinander, so wurden Quotienten-Werte bis maximal 8,7 erreicht (Zelllinien NIH-3T3 und M-12 nach Transfektion mit LipofectIN™; Tabelle 3.1). Eine Auflistung der hier untersuchten Zelllinien entsprechend des ermittelten FACS-Verhältnisses befindet sich in Tabelle 3.2. Zusätzlich sind die in der Literatur bislang für VP22-vermittelten Transport getesteten Zelllinien angegeben.

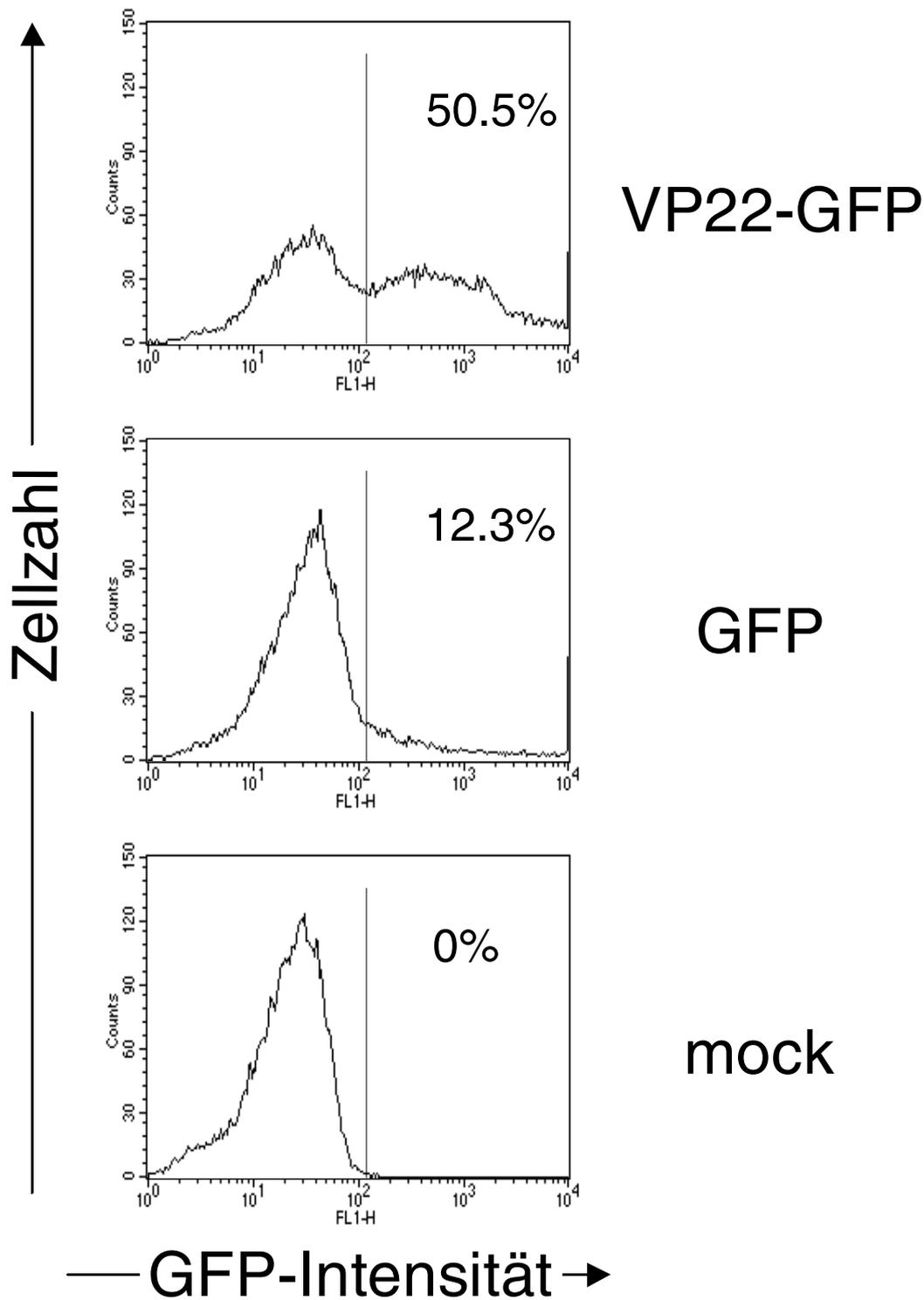


Abbildung 3.11: Quantitative FACS-Analyse der GFP- und VP22-GFP-Expression.

M-12-Zellen wurden mit 2000 ng pVP22-GFP bzw. pcDNA3-EGFP mit Hilfe von LipofectAMINE™ transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen durch Trypsinierung resuspendiert und direkt für die FACS-Analyse eingesetzt (20.000 ausgezählte Zellen). Dargestellt ist die FL1-H-Fluoreszenz nach Transfektion mit Expressionsplasmiden für VP22-GFP (oben), GFP (Mitte) oder untransfizierten M-12-Zellen (unten; notwendig zur Einstellung der Hintergrund-Kalibrierung).

Ergebnisse

Zelllinie	Herkunft der Zelllinie	Expressions-Plasmid	Prozentsatz der GFP-positiven Zellen [in %]	
			2000 ng Plasmid LipofectAMINE™	200 ng Plasmid LipofectIN™
HepG2	humanes Hepatom	VP22-GFP [#]	19.4	14.1
		GFP [*]	14.3	9.4
Hep3B	humanes Hepatom	VP22-GFP	43.2	34.9
		GFP	34.6	10.0
HuH7	humanes Hepatom	VP22-GFP	37.6 ^a	29.4
		GFP	35.9 ^a	22.9
HeLa	humanes Cervix-Adenocarcinom	VP22-GFP	38.3 ^a	12.9
		GFP	10.5 ^a	1.9
MCF-7	humanes Mamma-Carcinom	VP22-GFP	61.7	41.5
		GFP	43.0	19.8
293	humane embryonale Niere, HEK-Derivat	VP22-GFP	73.6 ^b	46.2
		GFP	51.4 ^b	33.9
ΦNX-ampho	humane retrovirale Verpackungszellen, 293T-Derivat	VP22-GFP	67.2 ^b	63.7
		GFP	47.8 ^b	30.1
CV-1	Affen-Niere	VP22-GFP	17.6	12.1
		GFP	8.0	2.7
COS-7	Affen-Niere	VP22-GFP	43.5 ^b	25.1
		GFP	17.4 ^b	5.0
NIH-3T3	Maus-Fibroblasten	VP22-GFP	51.9	7.9
		GFP	14.3	0.9
PA317	retrovirale Verpackungszellen, NIH-3T3-Derivat	VP22-GFP	70.6	9.3
		GFP	37.8	1.3
M-12	Hunde-Niere, MDCK-Derivat	VP22-GFP	48.1	6.1 ^c
		GFP	11.5	0.7 ^c
CRFK	Katzen-Niere	VP22-GFP	83.4 ^b	2.8
		GFP	60.4 ^b	1.1
CHO-B66	Hamster-Ovarien, CHO-Derivat	VP22-GFP	27.9 ^a	17.1 ^c
		GFP	12.6 ^a	6.9 ^c
MH3924a	Ratten-Hepatom, „Morris-Hepatom“	VP22-GFP	59.8 ^a	28.8
		GFP	22.0 ^a	3.7

^a 1000 ng Expressions-Plasmid, ^b 200 ng Plasmid, ^c 2000 ng Plasmid; [#] pGE150 or pVP22-GFP, ^{*} pcDNA3-GFP

Tabelle 3.1: FACS-Analyse von GFP- und VP22-GFP-Expression in 15 Säugerzelllinien.

Die Zellen wurden mit 200-2000 ng Expressionsplasmid und den Transfektions-Reagenzien LipofectAMINE™ oder LipofectIN™ transfiziert. VP22-GFP-enthaltende Plasmide waren pVP22-GFP oder pGE150, das Plasmid pcDNA3-EGFP kodiert nur für GFP. FACS-Analyse wie in Abb. 3.11. Alle Experimente wurden mindestens dreifach ausgeführt, die angegebenen Prozentsätze entsprechen den Durchschnittswerten. Die Standardfehler betragen in keinem Fall mehr als 15% und sind der besseren Übersichtlichkeit der Tabelle wegen nicht angegeben.

<i>Zelllinie</i>	<i>Herkunft der Zelllinie</i>	<i>Literatur-Zitat</i>
<u>Exzellenter VP22-Transport (FACS-Verhältnis VP22-GFP/GFP > 5):</u>		
M-12	Hunde-Niere, MDCK-Derivat	
MH3924a	Ratten-Hepatom; „Morris-Hepatom“	
NIH-3T3	Maus-Fibroblasten	
HeLa	humanes Cervix-Adenocarcinom	Elliott & O'Hare, 1997
COS-7	Affen-Niere	
COS-1	Affen-Niere	Elliott & O'Hare, 1997
PA317	retrovirale Verpackungszellen, NIH-3T3-Derivat	
<u>Effizienter VP22-Transport (FACS-Verhältnis VP22-GFP/GFP 2 - 5):</u>		
CV-1	Affen-Niere	
CHO-B66	Hamster-Ovarien, CHO-Derivat	
Hep3B	humanes Hepatom	
MCF-7	humanes Mamma-Carcinom	
CRFK	Katzen-Niere	
<u>Detektierbarer VP22-Transport (FACS-Verhältnis VP22-GFP/GFP < 2):</u>		
HuH7	humanes Hepatom	
HepG2	humanes Hepatom	
ΦNX-ampho	humane retrovirale Verpackungszellen, 293T-Derivat	
HepG2	humanes Hepatom	
293	humane embryonale Niere, HEK-Derivat	
<u>Effizienter VP22-Transport nach Literaturangaben:</u>		
H-1299	Affen-Niere	Elliott & O'Hare, 1999
BHK-21	Hamster-Niere (<i>baby hamster kidney</i>)	Elliott & O'Hare, 1997
SAOS-2	humanes Osteosarkom	Phelan <i>et al.</i>, 1998
Neuro 2A	Maus-Neuroblastom	Dilber <i>et al.</i>, 1999
Vero	Affen-Niere	Phelan <i>et al.</i>, 1998

Tabelle 3.2: Übersicht der Effizienz des VP22-GFP-Transports in Säugerzelllinien.

Aus Tabelle 3.1 ergibt sich, dass maximaler VP22-*spread* sowohl bei Verwendung kleiner Mengen an Expressionsplasmid (200 ng; Transfektion mit LipofectIN™) als auch bei niedrigem Basis-GFP-Expressionsniveau (optimal zwischen 0,7% und 5%) gemessen wurde (Zelllinien HeLa, CV-1, NIH-3T3, PA317, M-12, MH). Wenn die Transfektions-Effizienz mit dem GFP-Basis-Konstrukt schon sehr hoch war, war dagegen der prozentuale Anteil an interzellulärem Transport weniger stark steigerbar (Zelllinien HepG2, Hep3B, HuH-7, MCF-7, 293, ΦNX-ampho, CRFK). Für diese Zelllinien musste die verwendete Menge an Plasmid-DNA so angepasst werden, dass ausgangsmäßig die GFP-Kontrolle unter 60% GFP-Fluoreszenz lag, um eine zuverlässige Auswertung des VP22-vermittelten interzellulären Transportes zu gewährleisten. Somit waren die beiden Parameter DNA-Menge und eingesetztes Transfektions-Reagenz von entscheidender Bedeutung. So sind bestimmte Zelllinien mit dem einen Lipidgemisch überhaupt nicht transfizierbar (z.B. Tabelle 3.1: CRFK-Zellen, 2000 ng DNA, LipofectIN™), während das andere Transfektions-Reagenz schon bei niedrigen DNA-Mengen hohe Transfektions-Effizienzen ergibt (z.B. gleiche Zelllinie, 200 ng DNA, LipofectAMINE™).

Um den Einfluß der Transfektions-Bedingungen auf optimalen VP22-vermittelten Transport noch genauer zu charakterisieren, wurde folgendes Zusatzexperiment durchgeführt. Die Zelllinien ΦNX-ampho und MH wurden mit steigenden Mengen (0,2 – 2000 ng) an DNA transfiziert (Tabelle 3.3). Bei Verwendung von LipofectIN™ als Transfektions-Vermittler ergaben sich bei beiden Zelllinien maximale VP22-GFP vs. GFP-Quotienten bei Verwendung von 200 ng Expressionsplasmid (Tabelle 3.3: FACS-Verhältnis von 2,2 bzw. 7,6 bei ΦNX-ampho bzw. MH). Transfektionen mit 0,2 ng (ΦNX-ampho) oder 2 ng (MH) Plasmid-DNA ergaben GFP-Basis-Fluoreszenzen nahe dem Hintergrundsignal (0,1% bzw. 0,2%), so dass die berechneten Verhältnisse (3,0 bzw. 5,0) nicht auswertbar sind. Bei hoher GFP-Basis-Expression (z.B. 78,5% bei ΦNX-ampho und 2000 ng DNA) kann dagegen keine Steigerung der GFP-Fluoreszenz mehr detektiert werden (Verhältnis 1,0). Es kann geschlossen werden, dass zur optimalen Messung des interzellulären Transports definierte Transfektions-Bedingungen eingehalten werden müssen (Tabellen 3.1 und 3.3) und das verwendete Lipidgemisch auf die jeweilige Zelllinie abgestimmt sein muss.

Insgesamt wurde in allen 15 getesteten Säuger-Zelllinien ein *spread* des VP22-GFP-Proteins gefunden. Dies konnte durch direkte Messung der GFP-Fluoreszenz in der FACS-Analyse quantifiziert werden. Somit weisen diese Daten darauf hin, dass VP22-vermittelter

Transport von Fusionsproteinen ein allgemeines biologisches Phänomen ist, das nicht auf bestimmte Organe oder Gewebe beschränkt ist.

Zelllinie	Menge des Expressions-Plasmides	Prozentsatz der GFP-positiven Zellen [in %]		Verhältnis VP22-GFP/GFP
		VP22-GFP	GFP	
ΦNX-ampho	2000 ng	78.4	78.5	1.0
	200 ng	65.6	30.0	2.2
	20 ng	31.6	19.2	1.6
	2 ng	3.9	2.8	1.4
	0.2 ng	0.6	0.2 ^b	(3.0) ^a
MH	2000 ng	51.8	25.8	2.0
	200 ng	37.3	4.9	7.6
	20 ng	5.9	3.9	1.5
	2 ng	0.5	0.1 ^b	(5.0) ^a

^a berechnetes Verhältnis GFP-positiver Zellen nicht auswertbar, da sehr niedrige GFP-Basal-Expression.

Tabelle 3.3: FACS-Analyse zur Bestimmung des Einflusses der Transfektions-Bedingungen.

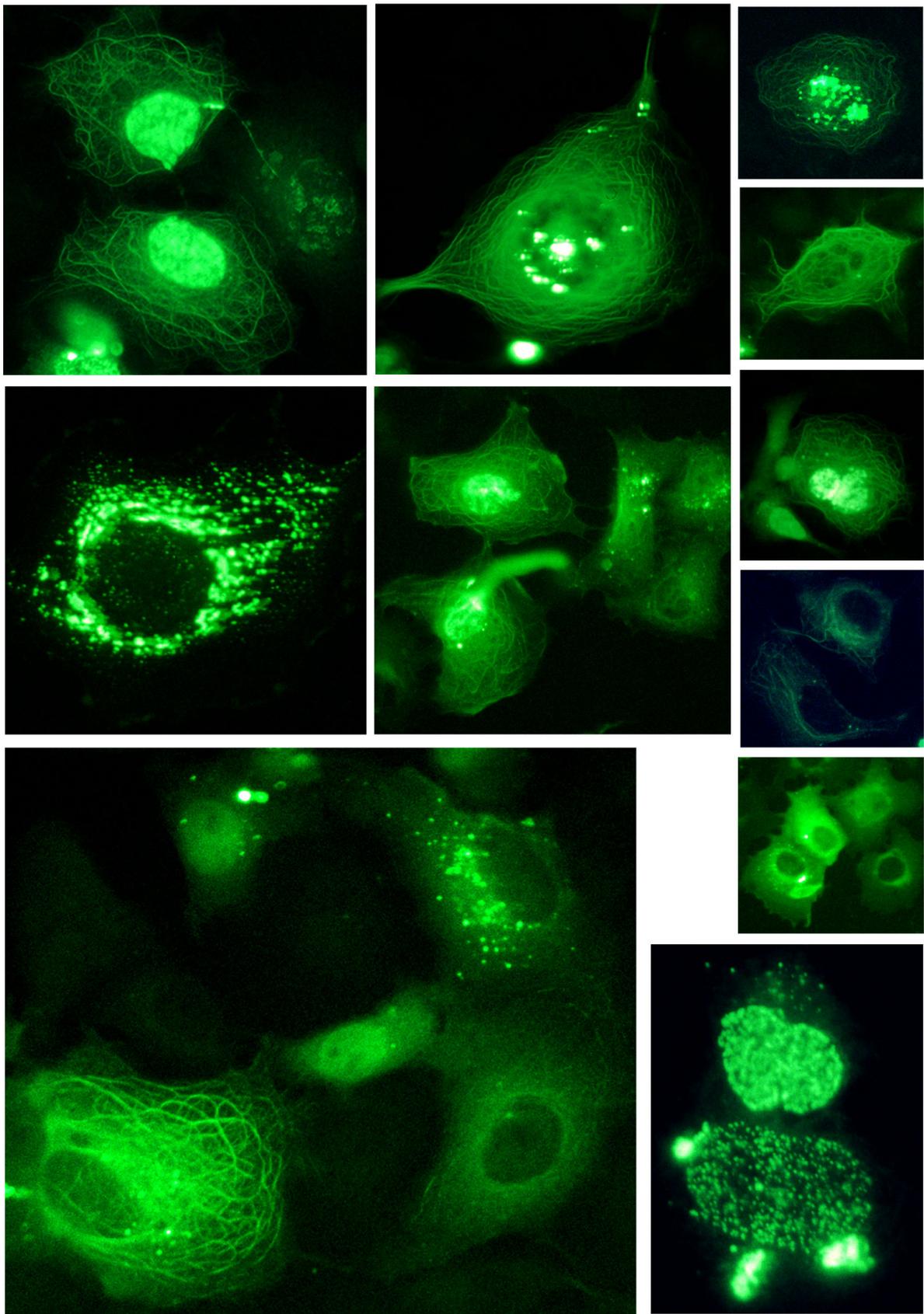
ΦNX-ampho- oder **MH**-Zellen wurden mit 0,2 bis 2000 ng Expressionsplasmid transfiziert, wie in der Tabelle angegeben. Als Transfektions-Reagenz wurde LipofectIN™ verwendet. VP22-GFP-enthaltende Plasmide waren pVP22-GFP oder pGE150, das Plasmid pcDNA3-EGFP kodierte nur für GFP. Nach 48 h wurden die Zellen durch Trypsinierung resuspendiert und direkt für die FACS-Analyse (FL1-H-Fluoreszenz; 20.000 gezählte Zellen) eingesetzt. Alle Experimente wurden mindestens dreifach ausgeführt, die angegebenen Prozentsätze entsprechen den Durchschnittswerten. Die Standardfehler betragen in keinem Fall mehr als 15% und sind der besseren Übersichtlichkeit der Tabelle wegen nicht angegeben.

3.4 Immunfluoreszenz-Detektion des VP22-vermittelten Transports

3.4.1 VP22-GFP-Kontrolle

Als Kontrollkonstrukt zur Messung des VP22-vermittelten interzellulären Transports diente das Plasmid pGE150, welches eine VP22-GFP-Fusion enthält. Nach transienter Transfektion konnte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie die direkte GFP-Fluoreszenz nur bei den primär transfizierten VP22-Produzentenzellen beobachtet werden. Die Fluoreszenz-Intensität der benachbarten Zellen, die VP22-GFP durch interzellulären Transport erhalten haben, war zur direkten lichtmikroskopischen Detektion nicht ausreichend, so dass eine Anfärbung mit Antikörpern notwendig wurde (vergleiche 3.3). Dennoch konnten die unterschiedlichen Stadien der ursprünglich transfizierten Zelle gut beobachtet werden. Zum einen bindet VP22 an Mikrotubuli und stabilisiert diese dadurch, was in einer filamentösen, cytoplasmatischen Anfärbung sichtbar wird. Gleichzeitig findet ein Transport von VP22 zum Nucleus und aus der Zelle hinaus in die Nachbarzellen statt, wo das Transportprotein ausschließlich im Kern gefunden wird. Darüber hinaus bindet VP22 stark an Chromatin, so dass nach erfolgter Zellteilung zwei Tochterzellen mit nukleärem VP22 gefunden werden. Wurde zur Visualisierung das Kontrollkonstrukt mit VP22-GFP-Fusion verwendet, konnte man alle Stadien der Mitose mit Dekondensation des Zellkerns und Bildung von Vesikeln im Fluoreszenz-Mikroskop gut beobachten (Abbildung 3.12).

Abbildung 3.12 (folgende Seite): **Direkte GFP-Fluoreszenz nach Transfektion von VP22-GFP.** COS-1-Zellen wurden mit 200 ng pGE150 (enthält eine pVP22-GFP-Fusion) durch LipofectAMINE™ transfiziert. Dargestellt ist die GFP-Fluoreszenz 48 h nach Transfektion bei direkter Beobachtung der Zellen ohne Fixierung oder Anfärbung durch Antikörper. Sichtbar sind nur die unterschiedlichen Stadien der primär transfizierten Zelle; die Fluoreszenz-Intensität der Nachbarzellen reicht zur Detektion nicht aus.



3.4.2 Adenovirale Plasmidkonstrukte

Zunächst sollte festgestellt werden, ob die N- und C-terminalen Fusionsproteine (s. 3.1.2), bestehend aus den Suzidgenen CD oder TK und dem Transportprotein VP22, die Fähigkeit des interzellulären Transports besitzen, also funktionell aktiv sind. Dazu wurden zunächst alle Konstrukte nach transienter Transfektion der Expressionsplasmide durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Die Zellen wurden zunächst mit Methanol fixiert und mit Antikörpern gefärbt (s. 2.2.6). Als primäre Antikörper dienten die polyklonalen Antiseren anti-VP22, anti-CD und anti-TK (vergleiche 3.1.4 und 3.2.2) sowie der monoklonale Antikörper CMV-018-48151 (Capricorn Products), der die hCMV-Epitop-Sequenz ERKTPRVTTGG (CMV-ep) erkennt. Diese wurden in den Verdünnungen 1:500 (anti-VP22, anti-CD, anti-TK) und 1:100 (anti-CMV-ep) verwendet. Als sekundäre Antikörper kamen ein FITC-konjugierter Antikörper (Vector), der gegen Maus-IgG gerichtet war (anti-*mouse*; detektiert die monoklonalen Antikörper; 1:100-Verdünnung), oder ein Alexa546TM-konjugierter Antikörper (Molecular Probes), der Kaninchen-IgG erkennt (anti-*rabbit*; detektiert die polyklonalen Antiseren; 1:200-Verdünnung), zum Einsatz.

Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie nach transienter Transfektion der adenoviralen Rekombinationsplasmide mit TK als Transgen. Nach Transfektion des Plasmids 6600-TK, welches nur TK als kodierende Sequenz enthält, sind einzelne positive Zellen erkennbar (Abbildung 3.13 oben: Mitte und rechts). Verwendet man dagegen Fusionsproteine von TK mit VP22 sind alle Zellen des beobachteten Monolayers VP22-positiv, wobei sich das typische zweigeteilte Muster ergibt (Abbildung 3.13 Mitte und unten): Zellen mit starker cytoplasmatischer Anfärbung, die weniger häufig vorkommen, entsprechen den ursprünglich transfizierten Zellen, die das Fusionsprotein synthetisieren. Zahlreiche benachbarte Zellen, die etwas weniger stark angefärbt sind, zeigen hauptsächlich nucleäre Anfärbung und stellen Zellen dar, die VP22 durch Protein-Transport erhalten haben. Dabei wurden diese Färbemuster bei beiden Fusionen TK-VP22 und VP22-TK gleichartig gefunden, sowohl bei Verwendung des anti-VP22 als auch des anti-CMV-ep-Antikörpers. Der anti-Epitop-Antikörper dient der Detektion von Fusionsproteinen mit voller Länge (siehe Abbildung 3.2).

Dagegen war das polyklonale anti-TK-Antiserum nicht in der Lage, VP22-vermittelten Transport zu visualisieren. Dies wurde in einem Zusatz-Experiment genauer untersucht (Abbildung 3.14): neben dem polyklonalen Antiserum standen auch drei monoklonale Antikörper zur Verfügung, die gegen bestimmte Epitope der HSV-1 Thymidin-Kinase gerichtet waren (4C8, 9G10, 10C11; alle freundlicherweise von W. Summers, Yale, USA, zur Verfügung gestellt; Verdünnung 1:100). Auch bei Verwendung der monoklonalen Antikörper konnte kein VP22-*spread* detektiert werden. Wie schon bei polyklonalem anti-TK wurde lediglich die primär exprimierende Zelle angefärbt (Abbildung 3.14, 2. und 3. Zeile). Auch die Kombination aller drei monoklonalen Antikörper zeigte ein negatives Transport-Ergebnis. Wurde dagegen in einer Doppelfärbung gleichzeitig mit anti-VP22 angefärbt, ergab sich, dass VP22-vermittelter Transport sehr wohl vorliegt, aber von keinem der verfügbaren anti-TK-Antikörper detektiert werden konnte (Abbildung 3.14, oberste Zeile). Bislang existiert keine schlüssige Erklärung für dieses Färbeverhalten.

Abbildung 3.13 (folgende Seite): **VP22-vermittelter Transport von adenoviralen TK-Expressionsplasmiden nach transienter Transfektion.**

oben: links: pTG6600 (mock), Mitte und rechts: 6600-TK

Mitte: 6600-TK-VP22

unten: 6600-VP22-TK

COS-1-Zellen wurden mit 500-1000 ng Expressionsplasmid durch LipofectAMINE™ transfiziert. 40-44 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz prozessiert und mit Antikörpern detektiert (siehe Text). Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen Mikroskop vorgenommen.

Abbildung 3.14 (fortfolgende Seite): **Test der monoklonalen und polyklonalen anti-TK Antikörper.**

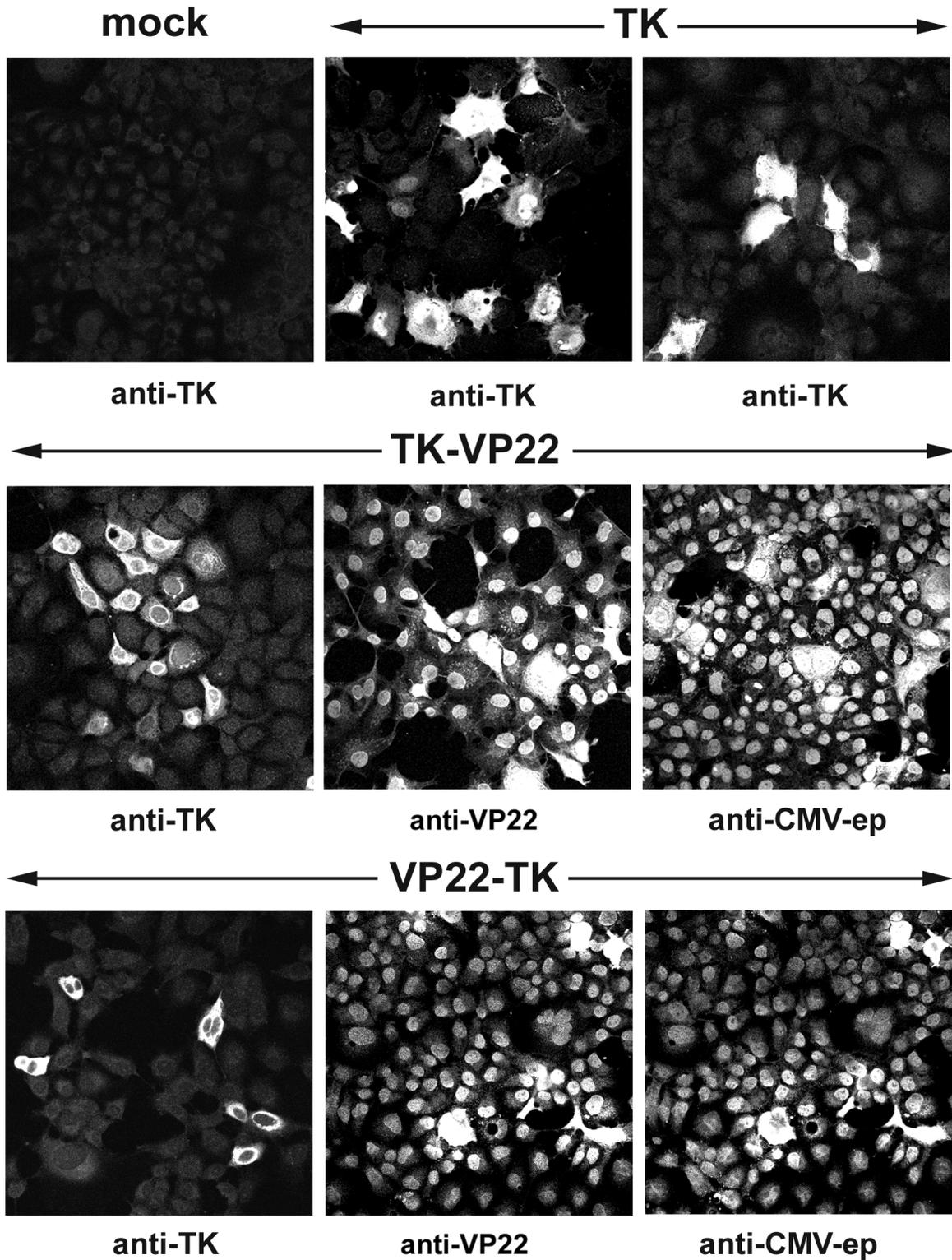
1. bis 3. Zeile: 6600-TK-VP22

4. Zeile: 6600-TK

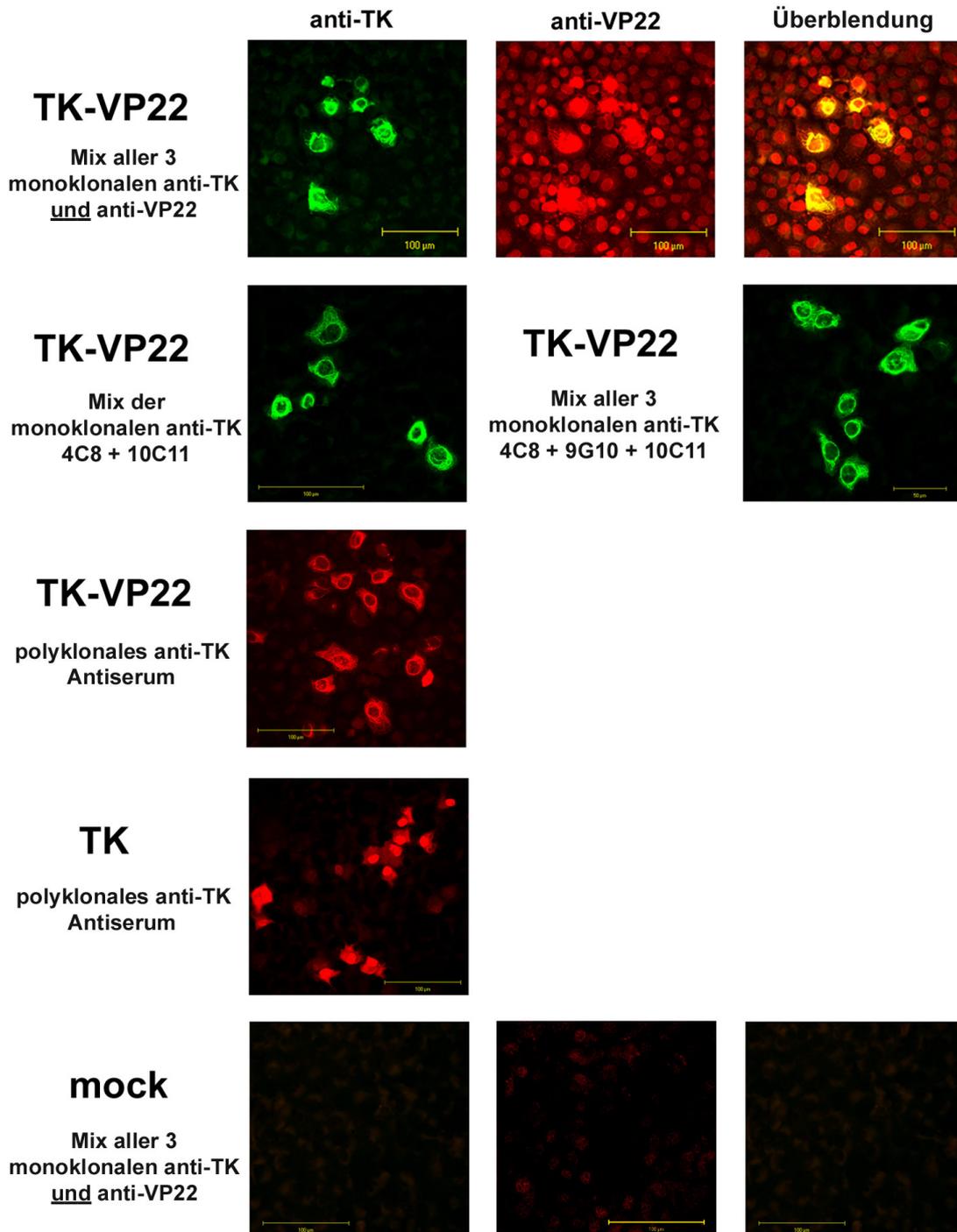
5. Zeile: pTG6600 (mock)

Bedingungen wie bei Abbildung 3.13.

Transfektion TK-Plasmide



Vergleich von mono- und polyklonalen anti-TK Antikörpern mit polyklonalem anti-VP22 Antiserum



Die Ergebnisse der transienten Transfektion mit adenoviralen Plasmiden, die CD als Suizidgen enthalten, ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Ist nur CD als Transgen vorhanden, waren nur vereinzelte Zellen positiv (Abbildung 3.15 oben: Mitte und rechts). Die C-terminale Anknüpfung von VP22 an CD zeigte dagegen das klassische Bild des VP22-vermittelten *spreads* mit filamentösen, cytoplasmatisch positiven Produzentenzellen und nucleär positiven Nachbarzellen (Abbildung 3.15 Mitte). Dieses Verteilungsmuster wurde von allen drei verfügbaren Antikörpern erkannt. Bei der N-terminalen Fusion VP22-CD ist dagegen kein interzellulärer Transport zu beobachten (Abbildung 3.15 unten). Bei Verwendung des anti-CMV-ep-Antikörpers, konnten selbst die primär transfizierten Zellen nicht visualisiert werden (Abbildung 3.15 unten: rechts), da bei der Klonierung des VP22-CD-Fusion das Epitop aus dem allgemeinen Leserahmen fiel (s. 3.1.2).

Fügt man als zusätzliches Transgen TK in die adenoviralen Rekombinations-Plasmide ein, erhält man CD-TK-VP22-Dreifach-Fusionen (siehe Abbildung 3.2). Diese wiesen nach transienter Transfektion ebenfalls Protein-Transport auf, wobei die Transport-Fähigkeit der direkten Fusion CD- Δ TK-VP22 der Glycin-verknüpften-Version CD-TK-VP22 überlegen scheint (Abbildung 3.16 Mitte und unten: mittleres und rechtes Bild). Der Nachweis des VP22-Transports gelang allerdings nicht in jedem Fall (Abbildung 3.16 Mitte und unten: links). Die Fusion der Suizidgene CD und TK ohne VP22 wies nur vereinzelte positive Zellen auf; ein Gradient der VP22-Expression konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.16 oben: Mitte und links).

Abbildung 3.15 (folgende Seite): **VP22-vermittelter Transport von adenoviralen CD-Expressionsplasmiden nach transienter Transfektion.**

oben: links: pTG6600 (mock), Mitte und rechts: 6600-CD

Mitte: 6600-CD-VP22

unten: 6600-VP22-CD

Bedingungen wie bei Abbildung 3.14.

Abbildung 3.16 (fortfolgende Seite): **VP22-vermittelter Transport von adenoviralen CD-TK-Expressionsplasmiden nach transienter Transfektion.**

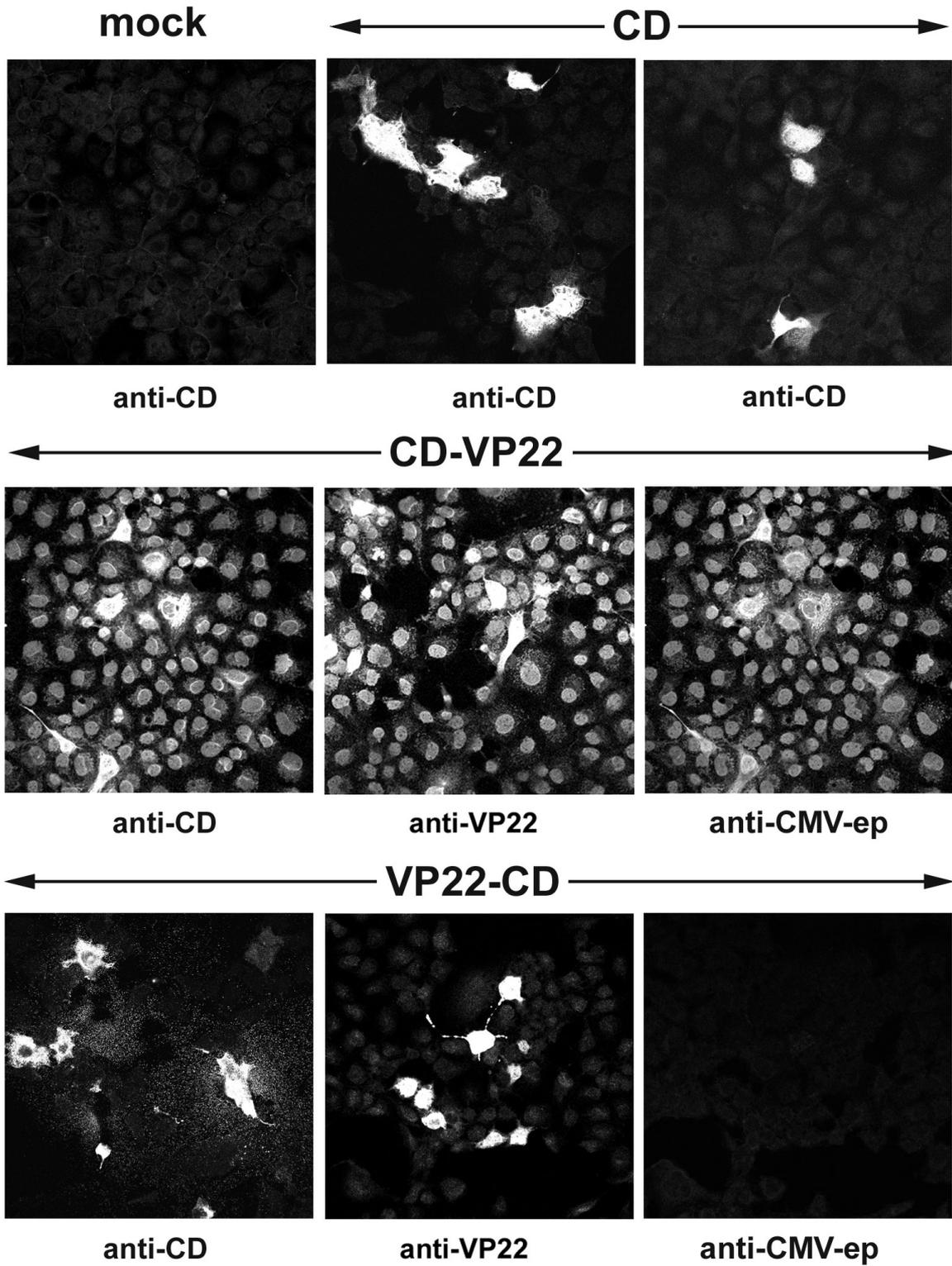
oben: links: pTG6600 (mock), Mitte und rechts: 6600-CD-TK

Mitte: 6600-CD- Δ TK-VP22

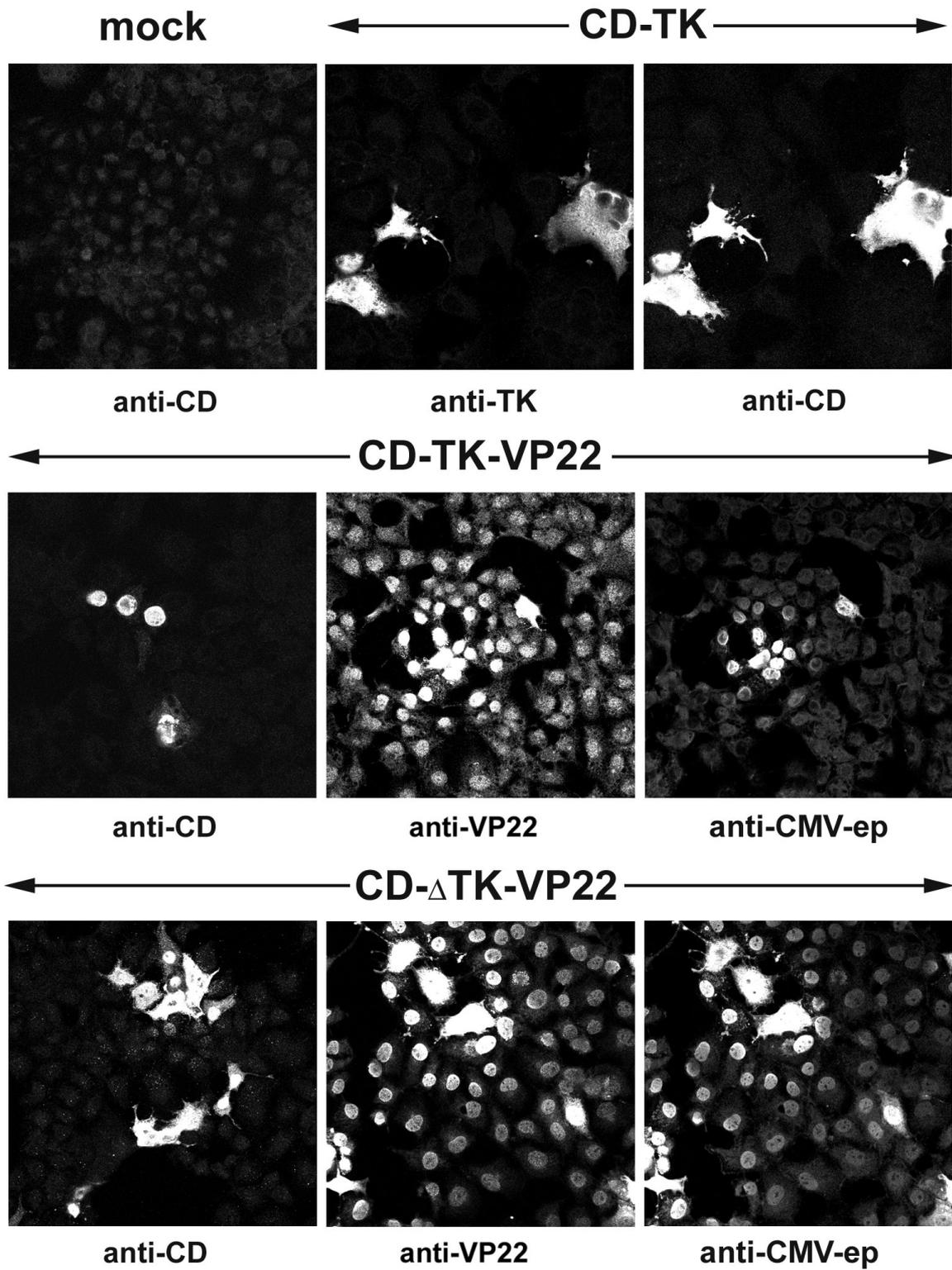
unten: 6600-CD-TK-VP22

Bedingungen wie bei Abbildung 3.14.

Transfektion CD-Plasmide



Transfektion CD-TK-Plasmide



3.4.3 Rekombinante Retroviren

Wie schon bei der Verwendung von adenoviralen Expressionsplasmiden sollte auch mit den in Kapitel 3.1.1 beschriebenen klonierten retroviralen Vektoren der VP22-vermittelte interzelluläre Transport untersucht werden. Nach transienter Transfektion der VP22-Suizidgen-Fusions-Konstrukte in COS-1-Zellen konnte jedoch kein Färbemuster in Form des typischen VP22-*spreads* detektiert werden (nicht gezeigt). Dies kann mit der nur geringen Aktivität des murinen LTR-Promotors in Nicht-Mäuse-Zellen erklärt werden.

Deshalb wurden im nächsten Schritt rekombinante retrovirale Partikel hergestellt. Dazu wurden die in 3.3.1 aufgelisteten Transfer-Plasmide in die retrovirale Verpackungszelllinie Phoenix-ampho transfiziert und der Überstand, der die Retrovirus-Partikel enthält, nach 48 h Stunden geerntet (s. 2.3.2.2). Der Titer dieser rekombinanten Retroviren nach transienter Transfektion betrug beim Test auf G418-Resistenz von transduzierten NIH-3T3-Zellen 1×10^4 bis 5×10^5 cfu/ml. Nachfolgend wurden COS-Zellen mit den retroviralen Überständen transduziert, wobei bei Verwendung von $2,5 \times 10^5$ Zielzellen die MOI von 0,04 bis 2 variiert werden konnte. Wie Abbildung 3.17 zeigt, konnte weder bei Einsatz von CD-VP22- noch bei VP22-TK-Fusionen ein interzellulärer Transport durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert werden²⁹. Da jedoch beide Fusionen von VP22 mit den jeweiligen Suizidgenen nach transienter Transfektion von adenoviralen Expressionsplasmiden deutlichen VP22-vermittelten Transport aufzeigten (siehe Abbildungen 3.13 und 3.15), wird gefolgert, dass die Expression unter LTR-Kontrolle und die erreichten retroviralen Titer nicht ausreichen, um genügende Mengen an Fusionsproteinen zu bilden.

²⁹ Dabei ist das polyklonale anti-TK Antiserum nicht in der Lage, VP22-vermittelten Transport zu detektieren; es wird lediglich die primär VP22-exprimierende Zelle nachgewiesen (vergleiche 3.4.2 und Abbildung 3.14).

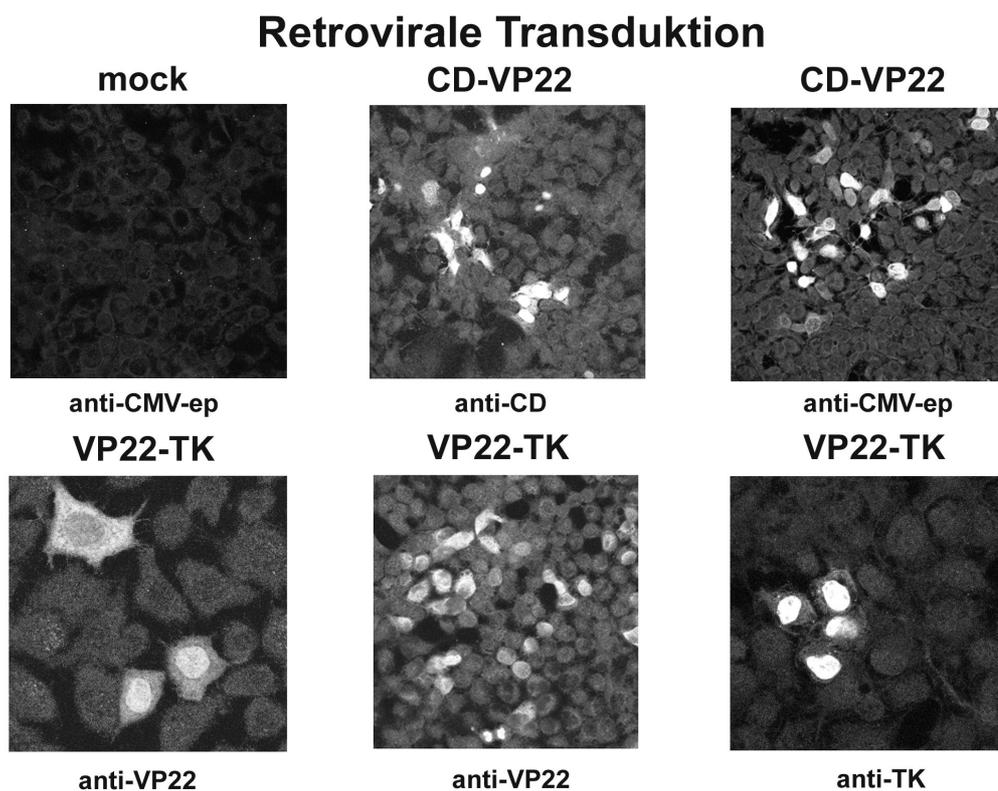


Abbildung 3.17: VP22-vermittelter Transport von retroviralen Expressionsplasmiden nach Transduktion mit Retrovirus-Partikeln.

oben: links: pLXSN (mock), Mitte und rechts: pL-CD-VP22

unten: jeweils pL-VP22-CD

COS-1-Zellen wurden mit 1 ml retroviralem Überstand (entsprechend MOI 0,04 - 2) für 3 h bei 37°C transduziert. Die Proben wurden 48 h später für die Immunfluoreszenz prozessiert und mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen Mikroskop vorgenommen.

3.4.4 Rekombinante Adenoviren

Adenoviren zeichnen sich im Gegensatz zu den meisten in der Gentherapie eingesetzten viralen Vektorsystemen dadurch aus, dass auf Grund der pantropen primären und sekundären Rezeptoren nahezu alle Zelllinien infiziert werden können. Werden Zellen mit rekombinanten Adenoviren transduziert, ergibt sich bei Verwendung einer geeigneten MOI, die prinzipiell über der Zahl der verwendeten Zielzellen liegen muss (d.h. $MOI > 2$), oft eine Transduktionsrate von nahezu 100%. Unter solchen Bedingungen kann der additive Effekt des VP22-vermittelten Transports nicht visualisiert werden. Deshalb verwendet man hier die Methode der Co-Plattierung. Dazu wird eine leicht identifizierbare Zelllinie mit rekombinanten Adenoviren transduziert und anschließend im Verhältnis 1:20 bis 1:100 mit unbehandelten Zellen eines anderen Zelltyps gemischt. Findet ein Export von VP22-Fusionsproteinen aus den transduzierten Zellen in die heterologen Nachbarzellen statt, kann dies durch Anfärbung in der indirekten Immunfluoreszenz dargestellt werden.

Als primäre Zelllinie wurde COS-1 bzw. CO60 verwendet, die stabil das *large T*-Antigen von SV40 exprimieren und somit leicht durch Antikörper-Nachweis von anderen Zellen unterschieden werden können. Nach Mischung mit untransduzierten HeLa-Zellen wird der VP22-Transport durch polyklonales anti-VP22 Antiserum nachgewiesen. Verwendet man beide Antikörper gleichzeitig in einer Doppelfärbung, kann durch Überblendung die ursprünglich transduzierte Zelle detektiert werden. Im vorliegenden Fall (Abbildung 3.18) wird das anti-VP22-Antiserum aus Kaninchen mit einem sekundären Antikörper erkannt, an den ein roter Farbstoff (Alexa™ 546) gekoppelt ist, der SV40 T-Antigen-Antikörper dagegen ist mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff (FITC) verknüpft. Entsprechend erscheinen die doppelt gefärbten VP22-Produzenten-Zellen in der Überblendung in gelber Farbe.

Abbildung 3.18 zeigt die Ergebnisse der Co-Plattierung nach Transduktion von CO60-Zellen mit Ad-VP22 und Ad-VP22-GFP, die als Kontroll-Vektoren zur Optimierung der Versuchsbedingungen verwendet wurden. Bei einer MOI von 50 waren alle HeLa-Zellen positiv für VP22 (Abbildung 3.17, 1. und 3. Reihe: jeweils linkes Bild). Da jedoch diese HeLa-Zellen nicht transduziert worden waren, kann gefolgert werden, dass VP22 durch *spread* eintransportiert worden ist. Die VP22-exprimierenden Produzenten-Zellen werden durch Anfärbung mittels SV40 T-Antigen-Antikörper als grün (jeweils mittleres Bild) und in der Doppelfärbung als gelb detektiert. Da GFP eine (nach Methanol-Fixierung

allerdings nur schwache) Eigenfluoreszenz aufweist, erscheinen alle Zellen in der Grün-Detektion leicht positiv (Abbildung 3.18, 3. Reihe: Mitte), während die Farbe der durch VP22-Transport positiven Zellen sich in der Überblendung von rot zu orange verschiebt (3. Reihe: rechts).

Verwendete man dagegen eine niedrigere Zahl an rekombinanten adenoviralen Partikeln (MOI 20), konnte festgestellt werden, dass nicht alle transduzierten Zellen einen VP22-Export aufweisen (2. Reihe). Hier wird ein zweigeteiltes Färbemuster in der Überblendung sichtbar: während links oben der für VP22-*spread* typische Verteilungs-Gradient (in der englischsprachigen Literatur als *focus*, Plural: *foci*, bezeichnet) erscheint, geht von den restlichen VP22-transduzierten Zellen kein Transport aus. Sie werden als singuläre, doppelt positive Zellen mit gelber Färbung detektiert. Die nicht-transduzierten Kontrollen lassen sich lediglich für das stabil exprimierte T-Antigen der Ausgangszelllinie CO60 anfärben (mock: Abbildung 3.18, untere Reihe).

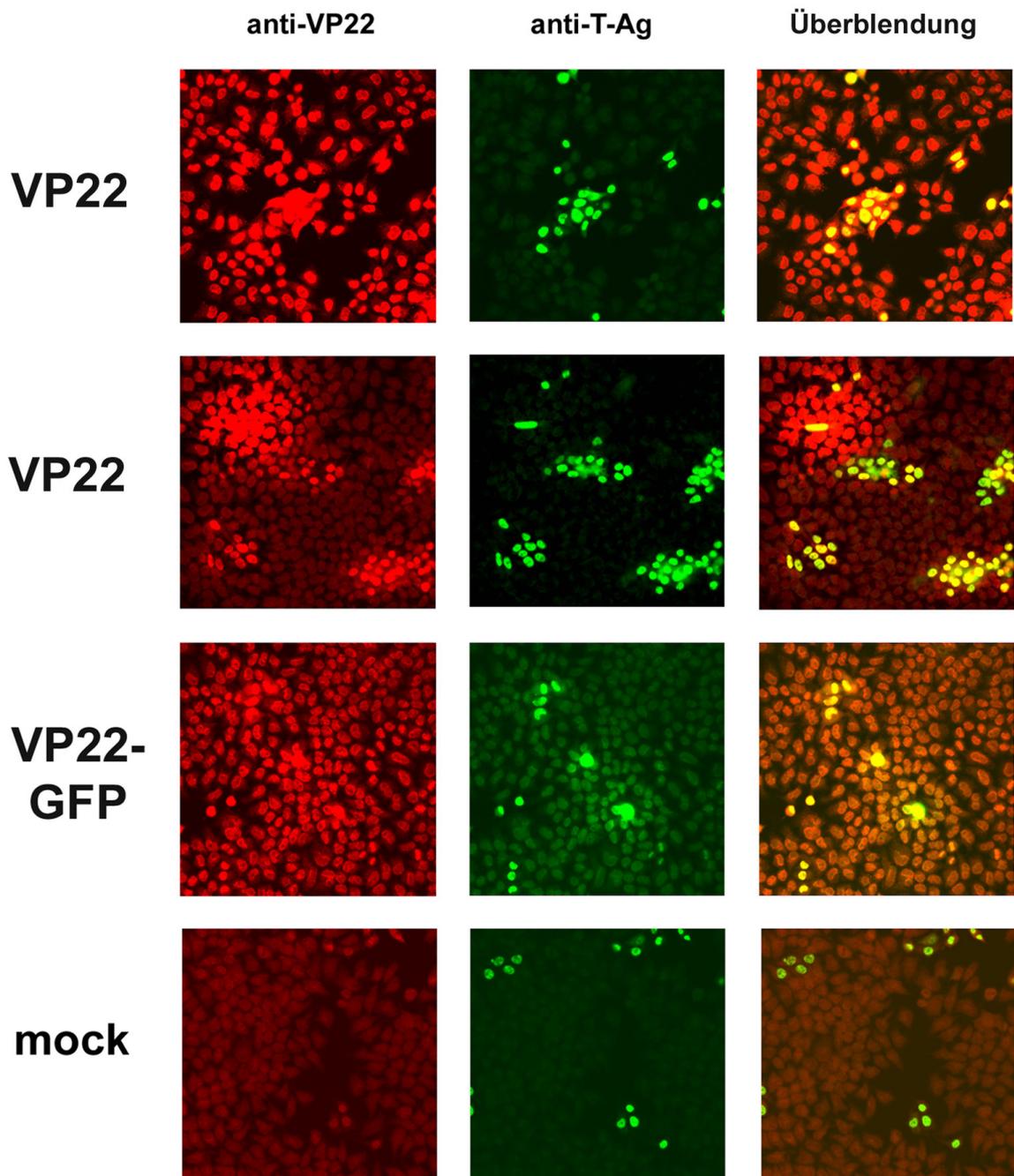
Abbildung 3.18 (folgende Seite): **Co-Plattierung von CO60- und HeLa-Zellen nach Adenovirus-Transduktion mit Kontroll-Vektoren.**

oberste Reihe: Ad-VP22, MOI 50; **2. Reihe:** Ad-VP22, MOI 20; **3. Reihe:** Ad-VP22-GFP, MOI 50; **unterste Reihe:** mock-Kontrolle (uninfizierte Zellen).

jeweils links: Detektion mit polyklonalem anti-VP22-Antiserum; Mitte: Detektion mit monoklonalem anti-T-Antigen-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology; Verdünnung 1:200); rechts: Überblendung.

CO60-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren in einem Volumen von 1 ml bei einer MOI von 20 oder 50 für 1 h bei 37°C transduziert. Die Proben wurden 20 h später trypsinisiert, mit unbehandelten HeLa-Zellen im Verhältnis von 1:20 neu ausgesät und 24 h danach für die Immunfluoreszenz prozessiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen Mikroskop vorgenommen.

Co-Plattierung Ad-VP22 & -VP22-GFP CO60 + Hela



Nach der Optimierung der Versuchsbedingungen für die Co-Plattierung mit den Kontroll-Vektoren Ad-VP22 und Ad-VP22-GFP wurden Adenovirus-Präparationen, die CD und TK als VP22-Fusionen enthielten, auf ihre Fähigkeit untersucht, interzellulären Transport zu vermitteln.

Abbildung 3.19 zeigt die Resultate für Ad-CD-Vektoren nach Transduktion von COS-Zellen und anschließender Mischung mit unbehandelten HeLa-Zellen in der oben erläuterten Überblendungs-Darstellung. Die Kontrollen uninfiziert (mock) und Ad-CD zeigten bei Abwesenheit des VP22-Transport-Gens wie erwartet nur einfach positive (d.h. nicht transduzierte COS-Zellen, grüne Anfärbung des T-Antigens: obere Reihe) oder singuläre doppelt-positive Zellen (Anfärbung von CD und T-Antigen; Abbildung 3.19, obere Reihe). Da der anti-T-Antigen-Antikörper nur den Nucleus der COS-Zellen detektiert, erscheinen die doppelt-positiven Zellen mit gelb-grünem Zellkern bei ausschließlich rot gefärbtem Cytoplasma. Die mittlere Reihe der Abbildung 3.19 zeigt drei Präparationen mit dem für VP22-Transport typischen *foci*-Muster. Die ursprünglich transduzierten COS-Zellen erscheinen gelb, HeLa-Zellen, welche die CD-VP22-Fusion durch Protein-Transport erhalten haben, dagegen in rot. Zur Detektion des VP22-vermittelten *spread* nach Co-Plattierung sind die Versuchsbedingungen entscheidend. Als Beispiel dient das linke Bild der unteren Reihe in Abbildung 3.19, in dem bei Verwendung derselben Ad-Präparation Ad-CD-VP22 kein Protein-Transport gefunden wurde. Im Gegensatz zur N-terminalen Fusion von VP22 an CD zeigt die C-terminale Verknüpfung VP22-CD wie schon bei den Plasmidkonstrukten (Abbildung 3.15) keine Transport-Fähigkeit (Abbildung 3.19, untere Reihe: Mitte und rechts).

Abbildung 3.19 (folgende Seite): **Co-Plattierung von COS-1- und HeLa-Zellen nach Adenovirus -Transduktion mit CD-VP22-Vektoren.**

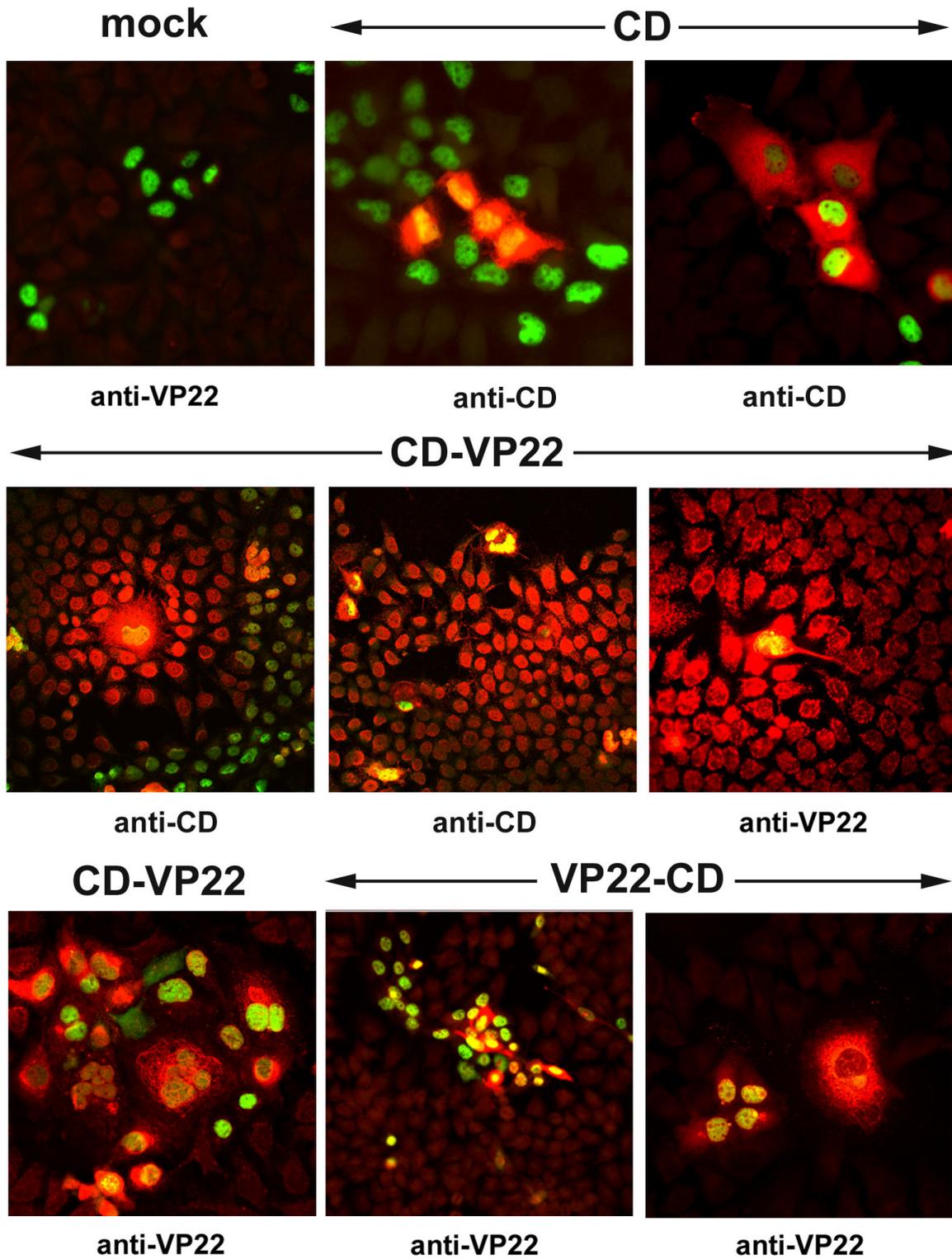
obere Reihe: links: mock-Kontrolle (uninfizierte Zellen); Mitte und rechts: Ad-CMV-CD, MOI 50

mittlere Reihe: jeweils Ad-CMV-CD-VP22, MOI 50

untere Reihe: links: Ad-CMV-CD-VP22; Mitte und rechts: Ad-CMV-VP22-CD; jeweils MOI 50

COS-1-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren in einem Volumen von 1 ml bei einer MOI von 50 für 1 h bei 37°C transduziert. Die Proben wurden 20 h später trypsiniert, mit unbehandelten HeLa-Zellen im Verhältnis von 1:20 bis 1:100 neu ausgesät und 24 h danach für die Immunfluoreszenz verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen Mikroskop aufgenommen. Dargestellt sind Überblendungen der Detektion mit jeweils 2 Antikörpern: monoklonaler anti-T-Antigen-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology; Verdünnung 1:200) sowie polyklonales Antiserum anti-VP22 oder anti-CD.

Co-Plattierung Ad-CD COS-Hela



Die Ergebnisse der Co-Plattierung nach Transduktion von COS-Zellen mit rekombinanten Adenoviren, die Fusionen von TK und VP22 enthielten, sind als Überblendung der Doppelfärbung in Abbildung 3.20 dargestellt. Präparationen ohne VP22-Fusion zeigten erwartungsgemäß keine *foci*-Muster (Abbildung 3.20, obere Reihe). Im Gegensatz zu Fusionen von CD und VP22 konnte sowohl bei N- als auch C-terminaler Verknüpfung des Suidgens TK mit VP22 ein Protein-Transport nachgewiesen werden (Abbildung 3.20, mittlere und untere Reihe: jeweils links und Mitte). Dieses Resultat entspricht dabei den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Färbungen mit Plasmidkonstrukten derselben Fusionen TK-VP22 und VP22-TK nach transienter Transfektion (Abbildung 3.13). Wie schon bei der Co-Plattierung von Ad-CD-VP22 (Abbildung 3.19), konnte auch mit TK-Fusionen nicht in jedem Experiment ein gleich ausgeprägter VP22-vermittelter Transport detektiert werden (Abbildung 3.20, mittlere und untere Reihe: jeweils rechtes Bild). Im Gegensatz zu anti-VP22 und anti-CD erkannten dabei alle zur Verfügung stehenden anti-TK-Antikörper nur die primär transduzierte Zellen, nicht jedoch VP22-vermittelten Transport (vergleiche Abbildung 3.14).

Abbildung 3.20 (folgende Seite): **Co-Plattierung von COS-1- und HeLa-Zellen nach Adenovirus -Transduktion mit TK-VP22-Vektoren.**

obere Reihe: links: mock-Kontrolle (uninfizierte Zellen); Mitte und rechts: Ad-CMV-TK, MOI 50

mittlere Reihe: jeweils Ad-CMV-TK-VP22, MOI 50

untere Reihe: jeweils: Ad-CMV-VP22-CD, MOI 50

Bedingungen wie bei Abbildung 3.19.

Abbildung 3.21 (fortfolgende Seite): **Co-Plattierung von COS-1- und HeLa-Zellen nach Adenovirus -Transduktion der Dreifach-Fusionen CD-TK-VP22.**

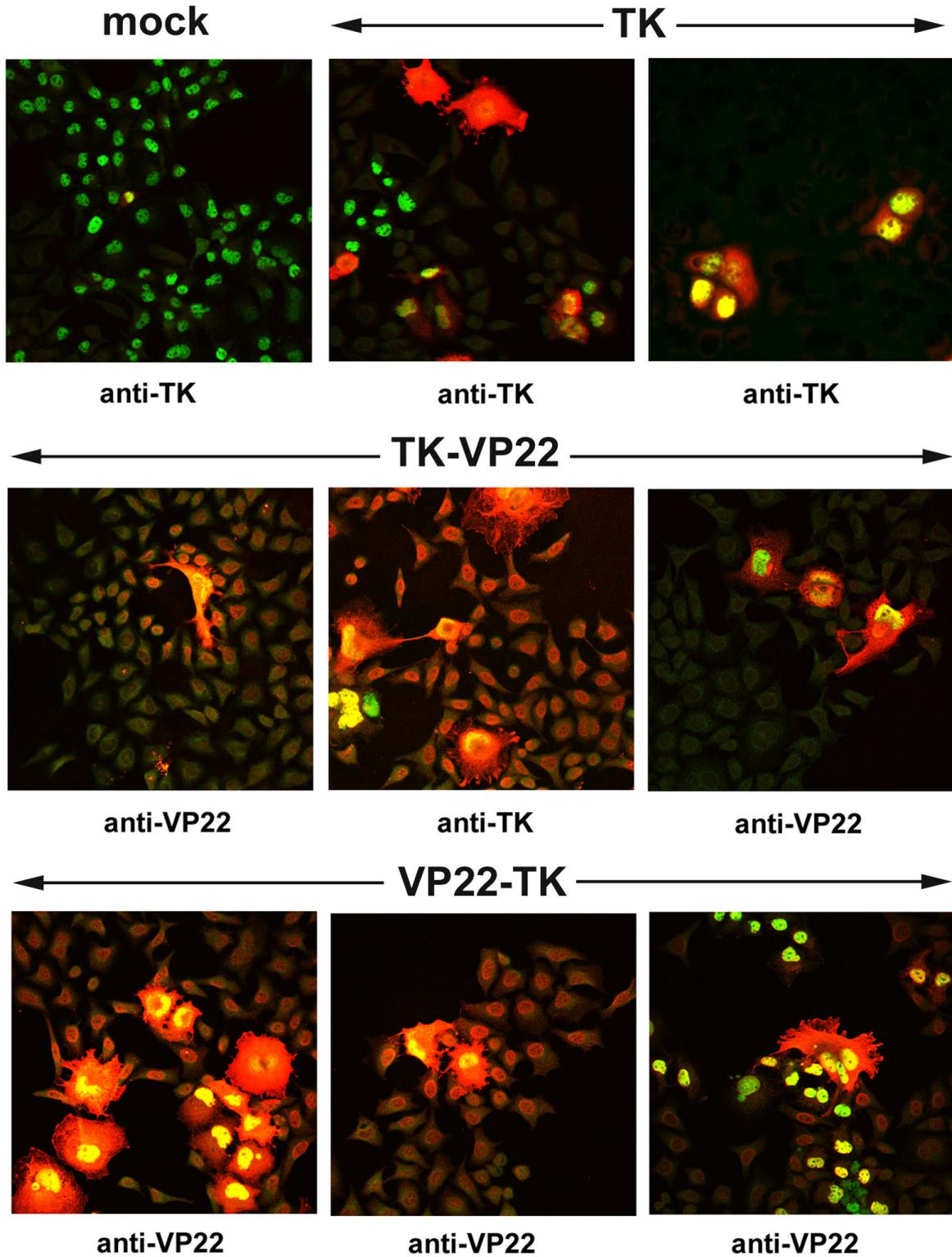
obere Reihe: links: mock-Kontrolle (uninfizierte Zellen); Mitte, rechts: Ad-CMV-CD-TK, MOI 50

mittlere Reihe: jeweils Ad-CMV-CD- Δ TK-VP22, MOI 50

untere Reihe: jeweils: Ad-CMV-CD-TK-VP22, MOI 50

Bedingungen wie bei Abbildung 3.19.

Co-Plattierung Ad-TK COS-Hela



Co-Plattierung Ad-CD-TK COS-Hela

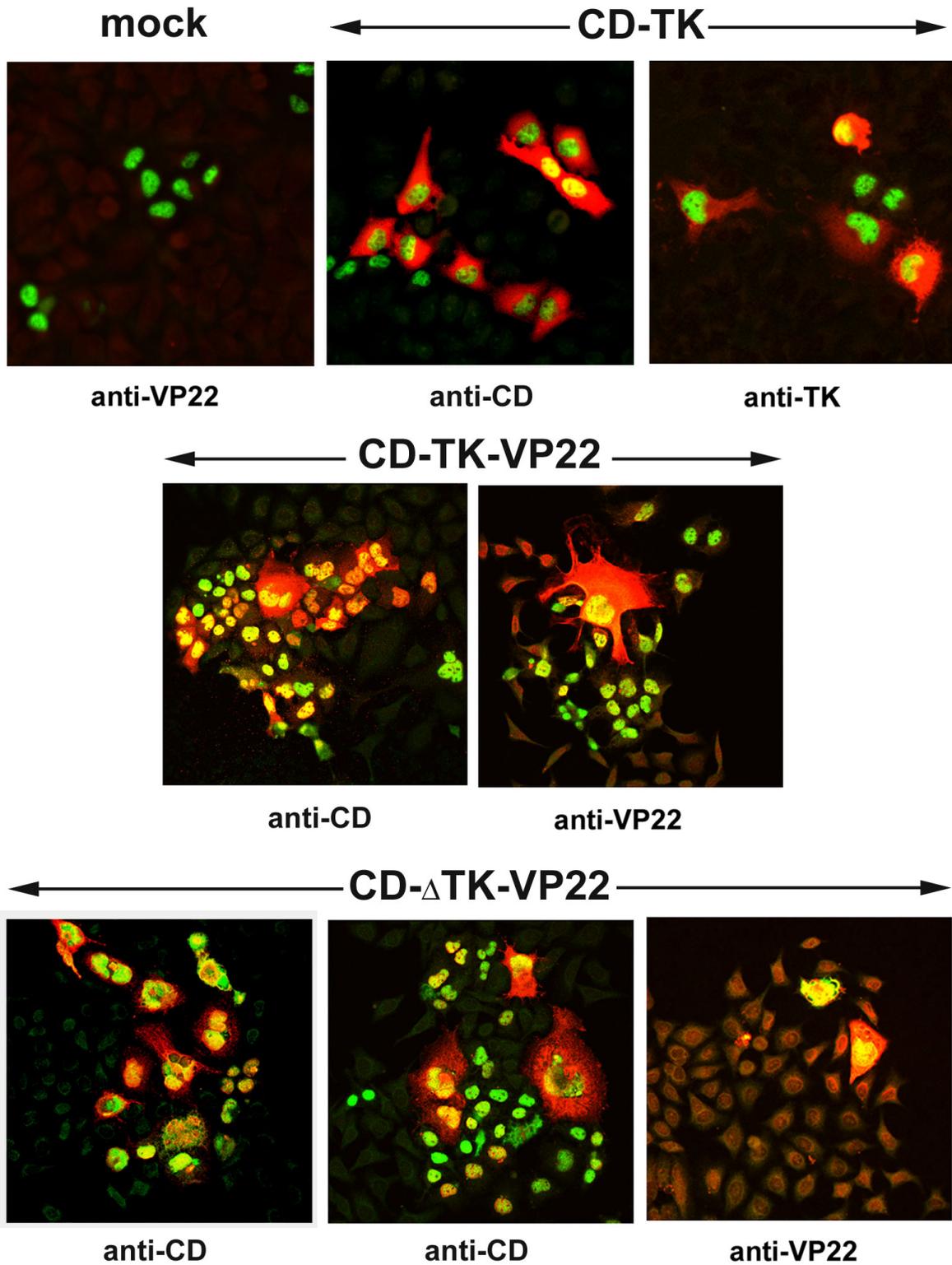


Abbildung 3.21 zeigt das Ergebnis der Untersuchung, ob VP22-Transport auch durch die Dreifach-Fusionen CD-TK-VP22 in rekombinanten Adenoviren vermittelt wird. Verwendet man lediglich die CD-TK-Suizidgen-Fusion, sind in der Überblendung nur doppelt-positive Zellen ohne Protein-Transport zu den Nachbarzellen zu sehen (Abbildung 3.21, obere Reihe: Mitte und rechts). Sieht man von der Verwendung der TK-Antikörper, die wie in Abbildung 3.14 dargestellt keinen VP22-*spread* detektieren können, ab, kann auch bei beiden Dreifach-Fusionen VP22-vermittelter Transport in der Co-Plattierung nachgewiesen werden (Abbildung 3.21, Mitte und unten: jeweils rechts). Dieser Nachweis gelingt jedoch – im Gegensatz zu den Doppelfusionen CD-VP22 und TK-VP22 – nur in Einzelfällen. Das Ergebnis bei Ausbleiben des Protein-Transports ähnelt dem der Ad-CD-TK-Kontrolle (Abbildung 3.21, Mitte: links; unten: links und Mitte). Wie schon nach transientscher Transfektion der Plasmidkonstrukte (Abbildung 3.16) scheint auch hier der Transport der direkten Suizidgen-Fusion CD- Δ TK-VP22 stärker ausgeprägt zu sein als bei Verknüpfung durch Glycin-Linker (Ad-CD-TK-VP22).

3.5 Quantifizierung des Suizidgen-Effektes

Nachdem, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, der qualitative Nachweis erbracht wurde, dass VP22-Fusionen der Suizidgene CD und TK die Eigenschaft des interzellulären Protein-Transports aufweisen (unabhängig davon, ob die Expression mit Hilfe rekombinater Adenoviren oder den entsprechenden Plasmid-Konstrukten direkt erfolgte), sollte das Ausmaß einer möglicherweise verbesserten Suizidgen-Wirkung quantifiziert werden. Da die metabolisierten *prodrugs* in CD- und TK-positiven Zellen cytotoxisch wirken, eignen sich zur Messung prinzipiell alle Proliferations- und Zelltod-Assays. Eine einfache, nicht-radioaktive, Quantifizierung des cytotoxischen Effektes gelingt dabei sowohl mit Hilfe des MTT-Proliferations-Tests, der die metabolische Aktivität lebender Zellen misst, als auch mit dem SRB-Assay, der die Inhibition des Zellwachstums detektiert (Skehan *et al.* 1990). Der SRB-Test beruht auf der Bindung des Protein-Farbstoffes Sulforhodamin B (SRB) und ist das Standard-Testverfahren des *National Cancer Institutes* der USA zum Screening zellschädigender Substanzen. Vergleiche von MTT- und SRB-Tests ergaben, dass das SRB-Reagenz die Wachstums-Inhibition über einen größeren linearen Bereich, empfindlicher und in mehr Zelllinien zuverlässig quantifiziert als der MTT-Farbstoff (Griffon *et al.* 1995;

Perez *et al.* 1993; Keepers *et al.* 1991; Rubinstein *et al.* 1990). Folglich wurden die Cytotoxizitäts-Tests der vorliegenden Arbeit wurden in der SRB-Methodik durchgeführt.

Da die Vorversuche zur Visualisierung des VP22-vermittelten Transports durch indirekte Immunfluoreszenz bei den Dreifach-Fusionen CD-TK-VP22 keine eindeutigen Ergebnisse lieferten (vergleiche Abbildungen 3.16 und 3.21), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf eine Auswertung per SRB-Assay verzichtet. Die Quantifizierung des cytotoxischen Effektes der Suizidgene wurde im Folgenden nach adenoviraler Transduktion von Morris Hepatom (MH)-Zellen durchgeführt. Die Zielzellen wurden ausgewählt, weil sie vom in der Arbeitsgruppe etablierten HCC-Modell der ACI-Ratte abgeleitet sind und als syngene Zelllinie nach orthotoper Implantation in die Leber wieder zu Lebertumoren auswachsen können. Damit können sie als Verfahren zur *in vivo* Evaluation der Suizidgen-therapie des Hepatozellulären Carcinomes herangezogen werden. Insgesamt sollte festgestellt werden, ob der Einsatz von VP22-Fusionen der Suizidgene CD und TK in adenoviralen Vektoren eine Steigerung des Suizidgen-Effektes gegenüber der Verwendung von CD und TK alleine bewirken kann.

3.5.1 Adenovirale CD-VP22-Vektoren

MH-Zielzellen wurden durch rekombinante Adenoviren, die CD und davon abgeleitete VP22-Fusionen exprimieren, transduziert und anschließend für 6 Tage mit verschiedenen Konzentrationen der *prodrug* 5-FC inkubiert. Als Kontrolle dienten uninfierte MH-Zellen, die mit derselben Menge an 5-FC versetzt wurden. Wie Abbildung 3.22 zeigt, war das Wachstum dieser Zellen von der alleinigen Anwesenheit der *prodrug* kaum beeinflusst. Im Folgenden wurde der Wert der uninfierten Kontrolle auf 100% festgesetzt und alle anderen Messwerte hierauf bezogen. Als weitere interne Kontrolle diente die Transduktion mit Ad-RSV-GFP. Da GFP im Gegensatz zum Transgen CD nicht die *prodrug* 5-FC umsetzen kann, wurde erwartungsgemäß keine Inhibition des Zellwachstums detektiert (Abbildung 3.23, Vierecke). Im Gegensatz dazu führte die Expression des Suizidgens CD mit steigender Konzentration an 5-FC zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl. Vergleicht man den inhibierenden Effekt von Ad-CD mit Ad-CD-VP22 nach 6 Tagen Inkubation mit 5-FC, so ist für jeden einzelnen Messwert eine signifikant bessere Suizidgenwirkung der VP22-Fusion nachweisbar (Abbildung 3.23 oben; Signifikanzen durch Stern angezeigt). Dagegen erreichte die N-terminale Fusion von VP22 an CD im Vergleich zu Ad-CD alleine nur für einen Wert eine signifikante Verbesserung, so dass insgesamt keine Steigerung des Suizid-

gen-Effektes der Fusion VP22-CD festgestellt werden konnte. Dies steht im Einklang zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Messungen von Plasmid und Adenovirus-Vektor, die keinen Protein-Transport der VP22-CD-Fusion aufwiesen. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 mM 5-FC erreichten alle CD-Konstrukte nach 6 Tagen ähnliche Werte der CD-induzierten Cytotoxizität. Vergleicht man dieselben adenoviralen Konstrukte nach 4 Tagen *prodrug*-Inkubation weisen alle Werte der CD-VP22-Fusion eine deutliche Steigerung des Suizidgen-Effektes auf, während CD und VP22-CD nahezu gleiche Überlebensraten liefern (Abbildung 3.23 unten). Die Konzentration, die notwendig ist, um mit 5-FC eine 50%-ige Inhibition des Zellwachstums zu erreichen (sog. *inhibitory concentration* IC_{50}) sinkt dabei nach 6-tägiger Inkubation von 2,5 mM für Ad-CD auf 0,45 mM für Ad-CD-VP22.

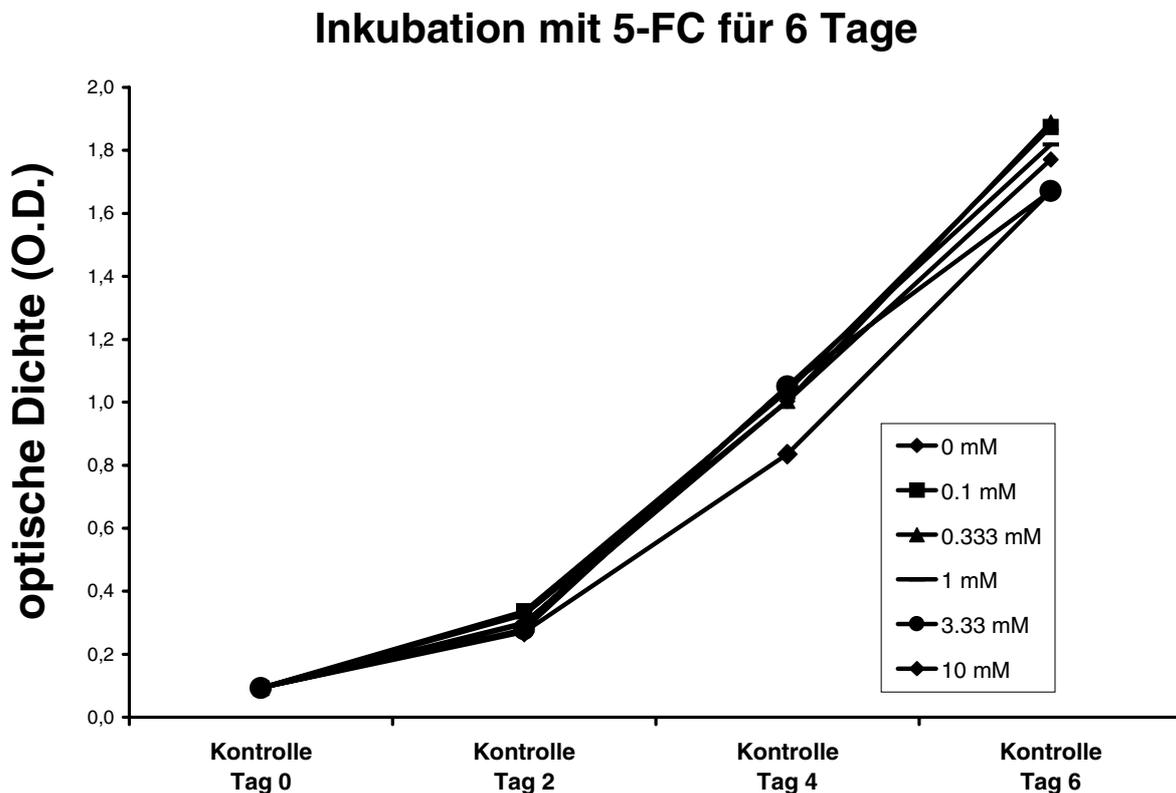


Abbildung 3.22: Proliferations-Test uninfizierter MH-Kontrollzellen nach Inkubation mit 5-FC.

MH-Zellen wurden in 24-*well*-Platten in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Kavität ausgesät und für 6 Tage mit den angegebenen Konzentrationen an 5-FC inkubiert. Die Zell-Proliferation wurde durch Messung der optischen Dichte (O.D.) nach Anfärbung mit dem SRB-Protein-Farbstoff bei 550 nm nachgewiesen. Alle Experimente wurden mindestens vierfach ausgeführt, die angegebene OD-Werte entsprechen den Durchschnittswerten. Die Standardfehler betragen in keinem Fall mehr als 15% und sind der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht angegeben.

Cytotoxizitäts-Assay (SRB): Ad-CD-Vektoren

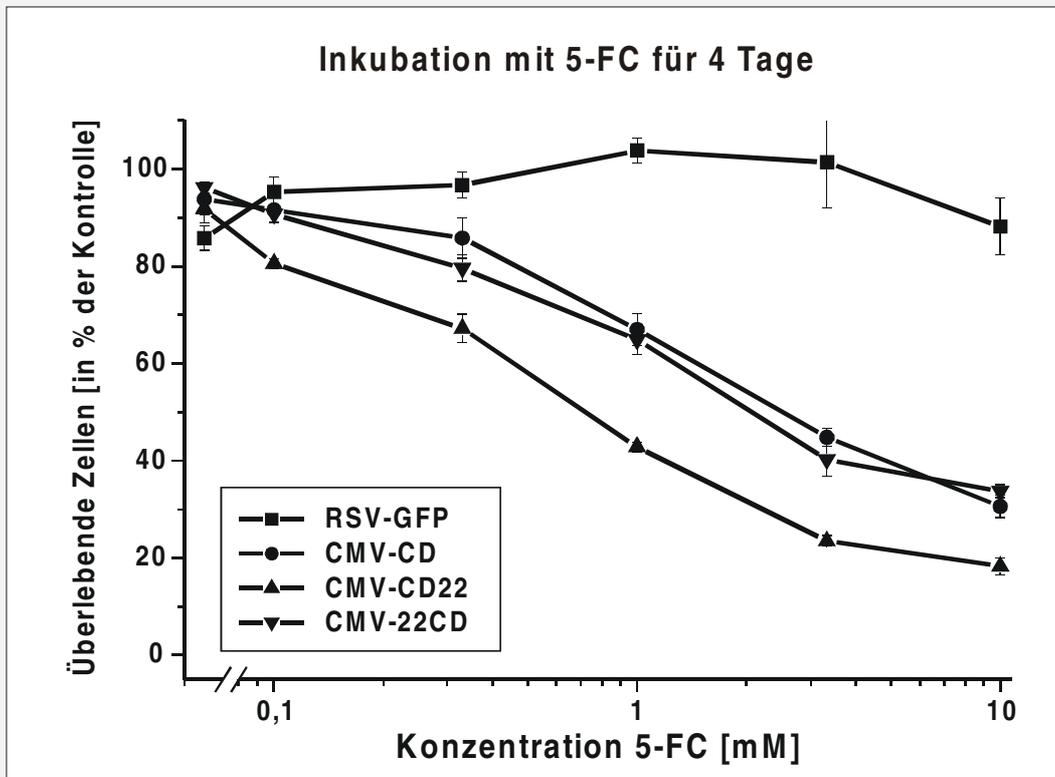
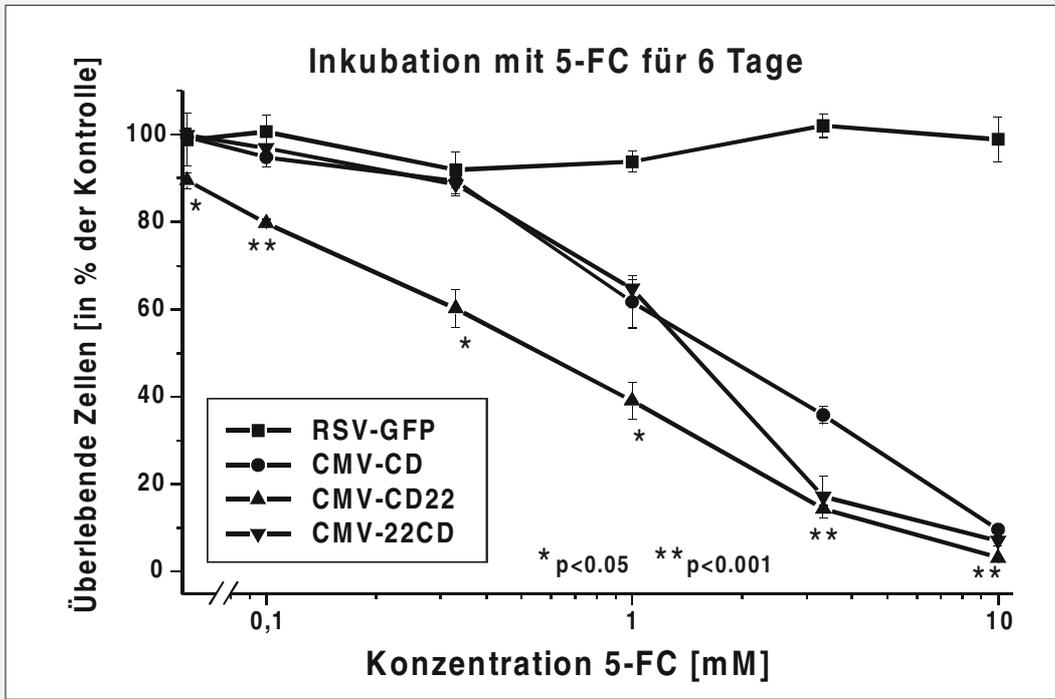


Abbildung 3.23 (vorhergehende Seite): **SRB-Assay rekombinanter Ad-CD-VP22-Vektoren.**

MH-Zellen wurden in 24-*well*-Platten in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Kavität ausgesät und am nächsten Tag für 3 h bei 37°C mit rekombinanten Adenoviren bei MOI 20 transduziert. Nach 24 h erfolgte die Inkubation mit 5-FC in den angegebenen Konzentrationen. Nach 4 bzw. 6 Tagen wurde die Inhibition des Wachstums mittels SRB-Assay bei 550 nm gemessen (s. 2.2.4). Alle Messwerte wurden auf die von uninfizierten Kontrollzellen bezogen und sind als Prozentsatz der überlebenden Zellen (Kontrolle als 100%-Wert) angegeben.

Alle Experimente wurden mindestens vierfach ausgeführt, die angegebene OD-Werte entsprechen den Durchschnittswerten. Die Fehlerbalken des Standardfehlers ($n=4$) sind im Diagramm mit angegeben. Die Auswertung der statistischen Signifikanzen wurde nach dem *student t*-Test durchgeführt und vergleicht nur die Werte von Ad-CD (●) mit denen von Ad-CD-VP22 (▲).

3.5.2 Adenovirale TK-VP22-Vektoren

Wie schon die CD-Fusionen wurden auch die N- und C-terminalen Verknüpfungen von TK mit dem Transport-Protein VP22 in adenoviralen Vektoren in Suizidgen-Assays untersucht. Als Kontrolle dienten wiederum uninfizierte MH-Zellen, die mit derselben Menge der *prodrug* GCV für 6 Tage versetzt wurden. Der Zusatz der *prodrug* zeigte auch hier keine Einschränkung des Wachstums von Kontrollzellen im Proliferations-Test (nicht dargestellt). Wiederum wurden alle Messwerte auf die uninfizierte Kontrolle (als 100% festgesetzt) bezogen. Wurden MH-Zellen mit adenoviralen Vektoren transduziert, die TK als Transgen enthalten, zeigte sich bei zunehmender GCV-Konzentration eine starke Inhibition des Zellwachstums (Abbildung 3.24). Sowohl für Ad-TK als auch die Fusionen Ad-TK-VP22 und Ad-VP22-TK ergab sich eine ähnlich verlaufende sigmoide Cytotoxizitäts-Kurve. Dabei zeigte sich keine bzw. keine deutliche Verbesserung des Suizidgen-Effektes bei Anwesenheit des VP22-Transport-Proteins. Die IC_{50} -Werte nach 6-tägiger Inkubation mit der *prodrug* GCV sind mit 1,4 μ M für Ad-TK und Ad-VP22-TK sowie 1,0 μ M für Ad-TK-VP22 nahezu gleich. Im Hinblick auf die positiven Transport-Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz-Messungen, sowohl nach Plasmid-Transfektion als auch nach Transduktion mit Adenovirus-Vektoren beider Fusionen TK-VP22 und VP22-TK, ist dies ein unerwartetes Resultat. Auf eine vergleichende Einzelauswertung der Signifikanzen wurde verzichtet. Die interne Kontrolle der Cytotoxizitäts-Messungen Ad-RSV-GFP zeigte wie erwartet keine Inhibition des Zellwachstums (Abbildung 3.24, Vierecke).

Cytotoxizitäts-Assay (SRB): Ad-TK-Vektoren

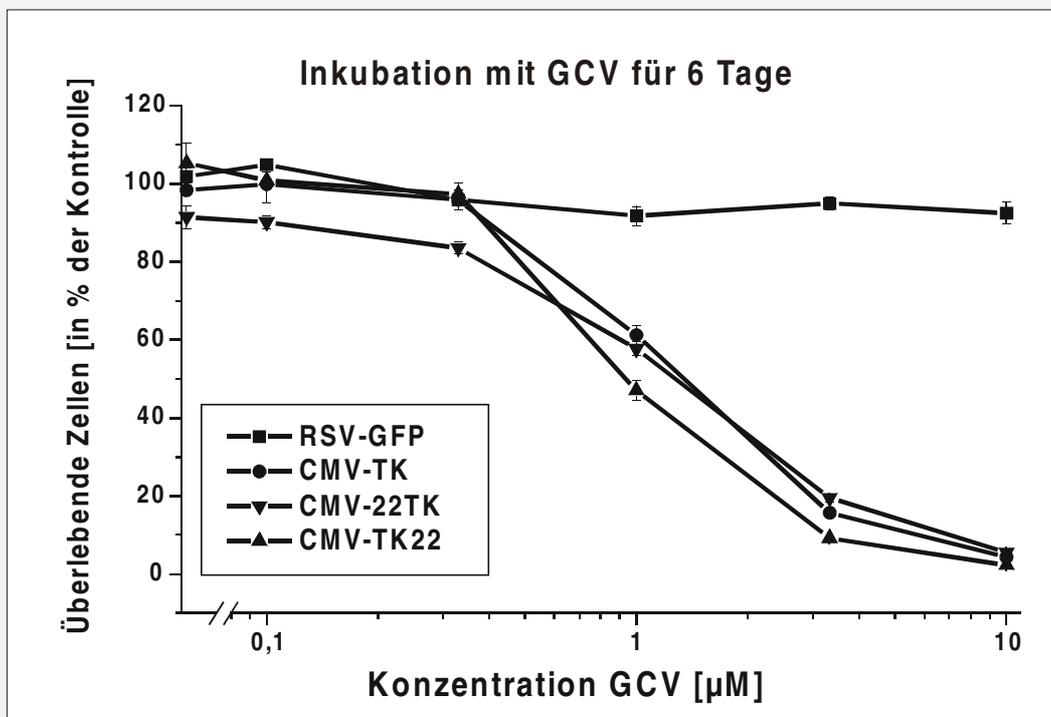


Abbildung 3.24: SRB-Assay rekombinanter Ad-TK-VP22-Vektoren. Bedingungen und Auswertung wie bei Abbildung 3.23.

3.6 Immunogenität von VP22

Vor einem Einsatz der VP22-Transportfunktion in gentherapeutischen Studien an Patienten muss geklärt sein, ob durch die zusätzliche Anwesenheit von VP22 inflammatorische Reaktionen hervorgerufen werden. In der Immunologie unterscheidet man grundsätzlich zwei Arten der Immunantwort. Die humorale Immunreaktion wird durch B-Zellen und Antikörper vermittelt und beinhaltet die Präsentation von Antigenen auf MHC-II-Molekülen der Zelloberfläche. Da ein polyklonales Antiserum aus Kaninchen, das nach Immunisierung mit VP22 gewonnen wurde, funktionell ist, ist von der Bildung von anti-VP22-Antikörpern auszugehen. Im Gegensatz zur humoralen Immunabwehr wird die zytotoxische Immunantwort durch sogenannte Killerzellen (CTLs: cytotoxische T-Lymphocyten) vermittelt. Diese erkennen Epitope, die auf MHC-I-Proteinen präsentiert werden. MHC-I-Moleküle kommen an der Oberfläche aller Körperzellen vor, MHC-II-Moleküle dagegen nur auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) des Immunsystems. Daher wurde im Mausmodell untersucht, ob die VP22-Expression eine CTL-Immunantwort auslöst.

3.6.1 MHC I-Epitop-Vorhersagen

Zunächst wurden durch Datenbank-Vergleich potenzielle Epitope von VP22 ermittelt, die in die Bindungstasche des MHC-I-Moleküls hineinpassen. Dazu wurde die 301 aa lange Sequenz von VP22 mit dem SYFPEITHI-Epitop-Vorhersage-Programm³⁰ ausgewertet. Der Algorithmus ermittelt die Wahrscheinlichkeit der Bindung einer bestimmten Aminosäure-Sequenz zu einem definierten HLA-Typ. Angegeben wird die Wahrscheinlichkeit eines T-Zell-Epitops, an MHC-Klasse-I-Moleküle zu binden. Ein Ergebnis-Wert von 20 entspricht dabei einer 60%-igen Chance, ein Wert von 30 der 90%-igen Wahrscheinlichkeit, als CTL-Epitop präsentiert zu werden (Tabelle 3.4). In die Untersuchung einbezogen wurden 4 MHC-I-Klassen der Maus (H-2³¹: K^b, K^d, D^d, L^d) und eine MHC-Klasse des Menschen (HLA-A*0201³²). Tabelle 3.4 zeigt die erhaltene Liste möglicher Epitope ab einem Wahr-

³⁰ Das SYFPEITHI-Epitop-Vorhersage-Programm ist im Internet über <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/> allgemein zugänglich. Der benutzte Algorithmus ist in dem Buch „MHC Ligands & Peptide Motifs“ von H.G. Rammensee, J. Bachmann und S. Stevanovic beschrieben; Verlag: Landes Bioscience, 810 South Church Street, Georgetown, Texas; Internationale Distribution: Springer Verlag GmbH & Co. KG, Tiergartenstr 17, Heidelberg; ISBN: 3-540-63125-9.

³¹ Die MHC-I-Moleküle der Maus werden als **H-2** klassifiziert, die des Menschen als **HLA**.

³² Nahezu jeder (kaukasische) Europäer besitzt als eines seiner 6 Oberflächen-MHC-I-Moleküle den Typ HLA-A*0201 (Kurzbezeichnung: A2).

scheinlichkeits-Wert von 17. Ordnet man die Vorhersagen den einzelnen Haplotypen zu, ergeben sich 7 bzw. 4 potenzielle CTL-Epitope für H-2^b bzw. H-2^d der Maus, sowie 7 Epitope für HLA-A2 des Menschen. Die Lage dieser potenziellen Antigene in der VP22-Sequenz ist in Abbildung 3.25, oben, graphisch dargestellt. Insgesamt wurde eine relativ geringe Anzahl an Epitopen ohne hohe Wahrscheinlichkeits-Werte ermittelt.

Da die Prozessierung der MHC-I-Liganden innerhalb der Zelle über das Proteasom verläuft, ist es sinnvoll, mögliche antigene Peptide mit potenziellen Schnittstellen des Proteasoms abzugleichen. Basierend auf dem Modellprotein Enolase lassen sich mit dem Programm PProC³³ grobe Vorhersagen über das Prozessierungs-Verhalten des Proteasoms erstellen. Die Korrelation der Proteasomenschnitte mit den vorhergesagten CTL-Epitopen für VP22 ist im unteren Teil der Abbildung 3.25 dargestellt.

Aminosäure-Position	Aminosäure-Sequenz	Wert	MHC-Haplotyp (Kurzbezeichnung)	
193-201	V A G F N K R V F	23	Maus	H-2D ^b (D ^b)
256-264	N E L V N P D V V	22	Maus	H-2D ^b (D ^b)
229-238	D E D L N E L L G I	20	Maus	H-2D ^b (D ^b)
180-189	T A P P N P D A P W	17	Maus	H-2D ^b (D ^b)
193-202	V A G F N K R V F C	17	Maus	H-2D ^b (D ^b)
15-22	P R D E Y E D L	22	Maus	H-2K ^b (K ^b)
174-181	R K L H F S T A	13	Maus	H-2K ^b (K ^b)
59-67	Q Y D E S D Y A L	22	Maus	H-2K ^d (K ^d)
23-31	Y Y T P S S G M A	20	Maus	H-2K ^d (K ^d)
200-208	V F C A A V G R L	18	Maus	H-2K ^d (K ^d)
14-22	V P R D E Y E D L	21	Maus	H-2L ^d (L ^d)
250-258	N L L Q R A N E L	25	Mensch	HLA-A*0201 (A2)
235-243	L L G I T T I R V	24	Mensch	HLA-A*0201 (A2)
210-218	A M H A R M A A V	23	Mensch	HLA-A*0201 (A2)
227-238	R T D E D L N E L	23	Mensch	HLA-A*0201 (A2)
237-245	G I T T I R V T V	22	Mensch	HLA-A*0201 (A2)
251-259	L L Q R A N E L V	22	Mensch	HLA-A*0201 (A2)
258-264	L V N P D V V Q D V	23	Mensch	HLA-A*0201 (A2)

Tabelle 3.4: CTL-Epitop-Vorhersagen für VP22 mit dem Programm SYFPEITHI.

³³ Auch das Programm PProC (Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages, Version 1.0; C. Kuttler, A.K. Nussbaum, T.P. Dick, H.-G. Rammensee, H. Schild, K.P. Haderl, An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages, J. Mol. Biol. 298 (2000), 417-429), das Vorhersagen über Proteasomenschnitte erlaubt, ist im Internet über <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/> allgemein zugänglich.

Vorhersage MHC-Klasse-I Liganden

1 MTSRRSVKSGPREV|PRDEYEDL|YYTPSSGMA|SPDSPPDTSRRGALQTRSR 50
 51 QRGEVRFV|QYDESDYAL|YGGSSSEDEHPEVPRTRRPVSGAVLSGPGPAR 100
 101 APPPPAGSGGAGRTPTTAPRAPRTQORVATKAPAAPAAETTRGRKSAQPES 150
 151 AALPDAPASTAPTRSKTPAQGLA|RK|LHFS|TA|PPNPDPWP|TPR|VAGFNKRV| 200
 201 |FC|AAVGRL|AAMHARMAAVQLWDMSRPRT|DEDLNELLGI|TTIRVTVCEGKN 250
 251 |LL|QRA|NELVNP|DVV|QDVDAATATRGRSAASRP|TERPRAPARSASR|RRRPVE 301

Maus H-2 K^b

Maus H-2 D^b deca

Maus H-2 D^b nona

Maus H-2 K^d

Maus H-2 L^d

Mensch HLA A2

Kombinierte Vorhersage mit Proteasomenschnitten

MTSRRSVKS | GPREV | PRDEYEDL | Y | YTPSS | GM | ASP | DS | P | PDT | S | RRG | ALQT | RSR
 QRGEVR | FV | Q | Y | DES | DYAL | YG | GSSSEDD | EHPEV | PRTRRPVSG | AV | L | S | GPGPAR
 AP | PPPAGS | G | G | A | G | R | TPTTAP | RAPRTQORVATKAPAA | PAAE | TTR | G | R | KSAQPES
 AA | L | PD | APAS | T | A | PTRSKTPAQ | GL | A | RK | LHFS | TAP | PNPDPWP | TP | RV | A | GF | NK |
 RV | FC | AAVGRL | AAMHAR | M | AAV | Q | LWDMS | RP | RTD | EDLNELLGI | TTI | RVT | VCEGKN
 LL | QRA | NELVNP | DVV | Q | D | VD | AATAT | R | G | R | SAAS | RPTERPRAPARSA | SRRRPVE

Zahl der Schnitte : 76

Abbildung 3.25: Lage der potenziellen MHC-I-Epitope von VP22.

oben: vorhergesagte CTL-Epitope aus Tabelle 3.4, geordnet nach Haplotypen

unten: Korrelation der CTL-Epitope mit potenziellen Proteasomenschnitten (senkrechte Striche)

3.6.2 CTL-Antwort

Zur Untersuchung einer CTL-Antwort im Mausmodell wurden zunächst stabile Zelllinien definierter Haplotypen hergestellt. Dabei sind MC-57-Zellen syngen zu C57BL/6-Mäusen, die Haplotyp H-2^b besitzen, und C4-Zellen syngen zu BALB/c-Mäusen mit Haplotyp H-2^d. Nach Transfektion der Plasmide pVP22 und pLeer (vergleiche Abbildung 3.3), welche VP22 als Transgen bzw. kein VP22 bei gleichem Vektor-Rückgrat besitzen, wurden durch G418-Selektion stabile Klone erzeugt, die im Western-Blot auf VP22-Expression getestet wurden (nicht gezeigt). Die Immunisierung der Mäuse erfolgte durch i.p.-Injektion der jeweils syngenen stabilen Zelllinien (s. 2.5.1). Nach 8 Tagen wurde die Milz explantiert und nach Vereinzeln wurden die erhaltenen Milzzellen in Kultur genommen. Zur Kultivierung der CTLs erfolgte eine Stimulation der Milzzellen durch erneute Präsentation des Epitops. Dies kann durch Gabe der stabilen VP22-Zelllinie oder, spezifischer, durch Zugabe der vorhergesagten Peptide erfolgen. Dazu wurden alle potenziellen 18 MHC-I-Liganden chemisch mittels Festphasen-Synthese hergestellt und HPLC-gereinigt. Fünf Tage nach dem Stimulus wurde die Stärke und Spezifität der CTL-Antwort im *Cr-release*-Assay getestet (s. 2.5.2). Dabei werden Ziel-Zellen, die mit ⁵¹Cr vorinkubiert sind, mit stimulierten Milz-Effektor-Zellen gemischt. Wirken die stimulierten Milzzellen cytotoxisch, wird das intrazelluläre radioaktive ⁵¹Cr durch die Lyse der Zellen freigesetzt und kann im β -Zähler quantifiziert werden.

Abbildung 3.26 zeigt exemplarisch das Ergebnis des CTL-Assays nach Immunisierung mit der stabilen Zelllinie MC-57-VP22, die zu C57BL/6-Mäusen syngen ist. Die Stimulierung der rekultivierten Milzzellen erfolgte wahlweise mit derselben stabilen Zelllinie MC-57-VP22 oder mit einem Peptid-Mix, der alle 7 vorhergesagten MHC-I-Liganden des Maus-Haplotyps H-2^b enthält. Bei Verwendung von MC-57-Zellen plus Peptid-Mix als Effektor-Zellen ergab sich nur eine basale Freisetzung von ⁵¹Cr, ähnlich der von MC-57-Kontroll-Zellen ohne Beladung mit Liganden. Dieses Bild ergab sich unabhängig von der Stimulation der Mauszellen mit stabilen VP22-Transfektanden oder Peptid-Mix (Abbildung 3.26, oben). Im ersten Test (oben links) wurden die stabilen VP22-Transfektanden von CTLs erkannt, der Peptid-Mix jedoch nicht. Dies bedeutet, dass es CTLs, die gegen VP22 gerichtet sind, geben könnte, das erkannte Epitop jedoch nicht im getesteten Mix vorhanden ist. Der zweite Test (oben rechts) zeigt, dass die Milzzellen, die mit Peptid-Mix stimuliert wurden, diesen nicht im CTL-Test erkannten. Wenn VP22-Peptid-spezifische CTLs erzeugt

worden wären, hätte es genau hier ein positives Ergebnis geben sollen. Jedoch wurden im Freisetzungstest die stabilen Transfektanten MC-57-VP22 erkannt, obwohl diese nicht zur Stimulation eingesetzt wurden. Für dieses Phänomen fehlt eine schlüssige Erklärung.

Da keine Peptid-stimulierte CTL-Antwort vorlag, wurde die erhöhte Lyse bei Verwendung von MC-57-VP22-Effektor-Zellen als unspezifisch gewertet. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass stabile MC-57-Effektor-Zellen, die nur mit der Vektorkontrolle pLeer transfiziert worden waren, eine ähnliche Verlaufskurve aufwiesen (Abbildung 3.26, unten rechts): nach drei Wochen Restimulation mit der stabilen Zelllinie MC-57-VP22 wurden MC-57-VP22 und MC-57-Leer gleich gut in einer erneuten Messung der ^{51}Cr -Freisetzung erkannt. Dies bedeutet, dass die vorhandenen CTLs nicht VP22-spezifisch waren.

Die Möglichkeit, dass die gemessenen Killerzellen gegen die Neomycin-Phosphotransferase gerichtet sind, wurde mit einem weiteren Kontrollexperiment ausgeschlossen. Die Zelllinie EG-7 ist ebenfalls zu C57BL/6-Mäusen syngene und exprimiert stabil das Neomycin-Resistenz-Gen. Damit ist EG-7 den MC-57-Leer-Zellen vergleichbar, die bei Abwesenheit des VP22-Transgens die Neomycin-Resistenz als verbleibende kodierende Sequenz des stabil transfizierten Vektors besitzen. Nach Re-Stimulation der reaktivierten Milzzellen wurden diese im ^{51}Cr -release-Assay nicht erkannt und zeigten nur eine basale Lyse (Abbildung 3.26, unten rechts). Somit wurden im Maus-Haplotyp H-2^b keine Killerzellen gegen die auf beiden Plasmiden (pVP22, pLeer) vorhandene Neomycin-Phosphotransferase induziert. Die Schlussfolgerung aus diesen Messungen ist, dass zwar CTLs generiert wurden, diese jedoch eine unbekannt Spezifität haben. VP22-spezifische Killerzellen wurden nicht induziert. Als Positiv-Kontrolle der Funktionalität der CTL-Kulturbedingungen werden zu C57BL/6-Mäusen allogene Zellen der BALB/c-Maus (Haplotyp H-2^d) verwendet („Allo-Kontrolle“). Diese zeigten bei steigender Menge an Effektor-Zellen erwartungsgemäß eine zunehmende CTL-Antwort der stimulierten Milzzellen (Abbildung 3.26, unten: links).

Analoge Ergebnisse wurden mit stabilen VP22-exprimierenden Zellen des Maus-Haplotyps H-2^d erzielt. C4-VP22-Zellen zeigten nach Immunisierung von BALB/c-Mäusen im CTL-Assay keine erhöhte Zell-Lyse (nicht gezeigt). Insgesamt wurde somit im Mausmodell keine spezifische CTL-Immunantwort gegen VP22 detektiert. Zur endgültigen Abklärung der T-Zell-Antwort gegen VP22-Epitope werden derzeit stabile VP22-Zellen des humanen Haplotyps A2 untersucht.

Ergebnisse

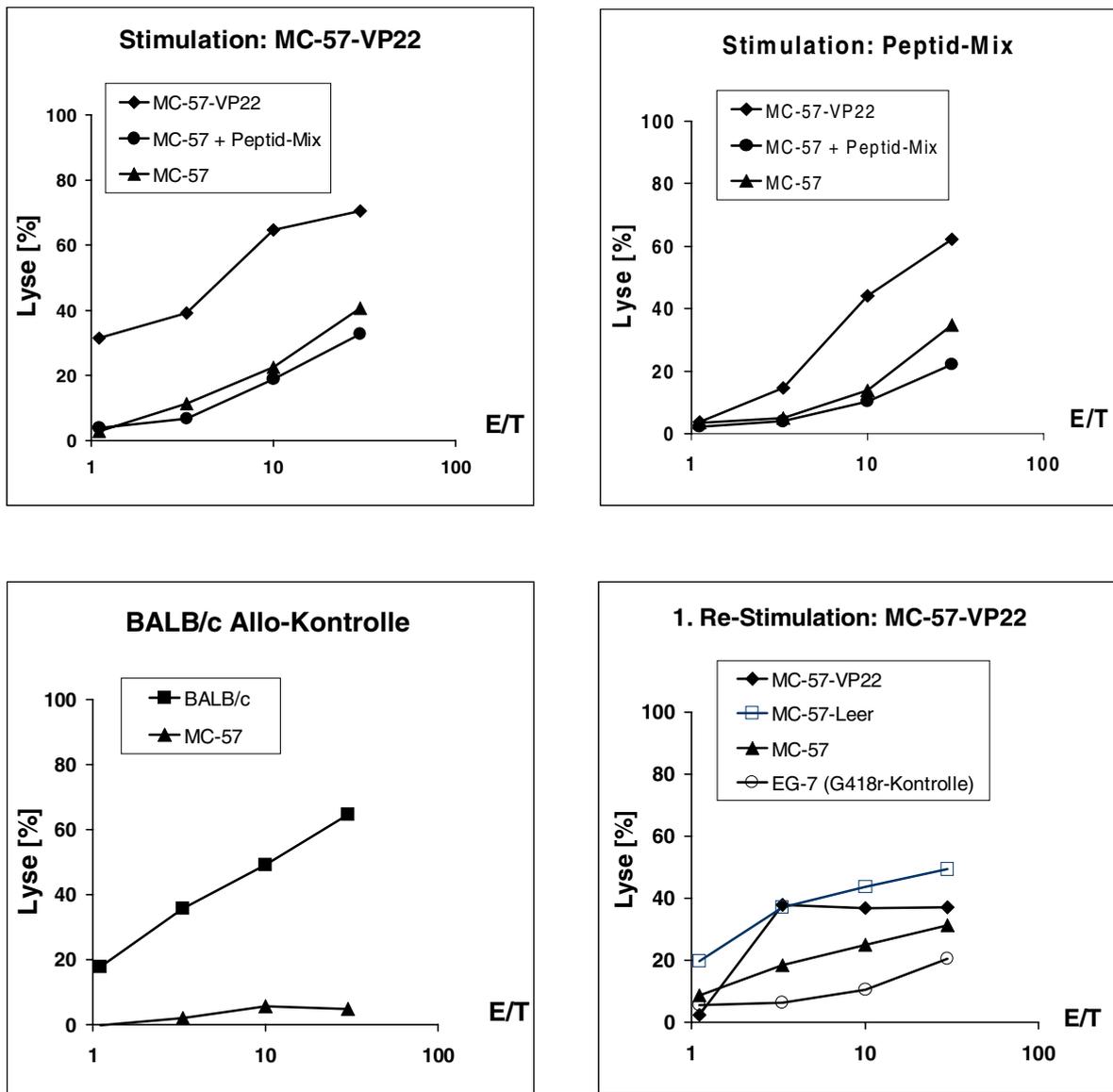


Abbildung 3.26: ^{51}Cr -release-Assay nach Immunisierung von C57BL/6-Mäusen.

oben: Stimulation mit MC-57-VP22 (links) bzw. Peptid-Mix vorhergesagter MHC-I-Liganden des H-2-b-Haplotyps (rechts)

unten: Allo-Kontrolle (links), Re-Stimulation mit MC-57-VP22 sowie zusätzliche Kontrollen als Effektor-Zellen (rechts)

4 Diskussion

Beim klinischen Einsatz der gegenwärtig verfügbaren Gentherapie-Vektoren sind die erreichten Effizienzen des Gentransfers zu gering, um eine wirksame Expression der übertragenen therapeutischen Gene zu erzielen. In der Suizidgen-Behandlung von Krebserkrankungen bewirkt der *bystander effect* zwar eine größere Verbreitung der toxifizierten Substanzen, jedoch reicht der bisher erzielbare Effekt nicht aus, um solide Tumoren zu eliminieren.

Das Protein VP22 aus Herpes simplex-Virus Typ-I ist auf Grund seiner Fähigkeit, Proteine aus einer Produzentenzelle in zahlreiche umgebende Nachbarzellen zu transportieren, potenziell in der Lage, die Zahl der Zellen, welche eine systemische verabreichte *pro-drug* metabolisieren können, entscheidend zu vergrößern. Bei Verwendung von Fusionsproteinen, bestehend aus VP22 und dem zu übertragenden Enzym, erreicht man durch VP22-vermittelten interzellulären Transport auch die Nachbarzellen der ursprünglich transduzierten Zellen. In Zellkulturstudien konnten dabei die angrenzenden 12 Zellschichten, d.h. bis zu 500 benachbarte Zellen erreicht werden.

Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war es, den unzureichenden Gen-Transfer bei soliden Tumoren durch zusätzlichen interzellulären Protein-Transfer zu kompensieren. Dabei sollte untersucht werden, ob der VP22-vermittelte interzelluläre Proteintransport die Suizidgen-Wirkung der Proteine *E. coli* CD und HSV-1 TK verbessern kann. Ein solches Ergebnis wäre von entscheidender Bedeutung für zukünftige Ansätze zur Suizidgentherapie von Tumoren.

4.1 VP22-vermittelter *spread* als allgemeines biologisches Phänomen

Der interzelluläre Transport von VP22 und davon abgeleiteten Fusionsproteinen war bislang nur für wenige Zelllinien nachgewiesen worden. Daher wurde zunächst geprüft, ob diese Eigenschaft auch bei anderen Zellen verschiedener Gewebe und Organe beobachtet werden kann. In diesem Zusammenhang ist ein kürzlich veröffentlichter Bericht von Inter-

esse, dass VP22-Transport in den Säuger-Zelllinien H1299, A549, COS-1 und COS-7 nicht nachgewiesen werden konnte (Fang *et al.* 1998). Als Test-Verfahren kamen hierbei direkte Detektion von GFP mittels Fluoreszenz-Mikroskopie, Verwendung eines monoklonalen anti-GFP Antikörpers in der Immunfluoreszenz-Färbung sowie FACS-Analyse und die Quantifizierung des intertypischen *spreads* zum Einsatz. Die Autoren dieser Arbeit folgerten, dass VP22 nur begrenzte Verwendung als Protein-Transporter in der Gentherapie haben werde.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde VP22-vermittelter *spread* erstmals systematisch an 15 häufig verwendeten Säuger-Zelllinien untersucht. Als Modellprotein wurde VP22-GFP gewählt, da damit die GFP-Fluoreszenz direkt in lebenden Zellen detektiert werden kann, so dass diese für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Insbesondere wurde mit der FACS-Analyse eine Alternative zum arbeitsaufwändigen Nachweis des VP22-Transports durch histochemische Immunfluoreszenz-Detektion etabliert. Nach Transfektion von Plasmiden, welche ein VP22-GFP-Fusionsprotein exprimierten, wurde in allen untersuchten Zelllinien ein VP22-vermittelter Transport des Fusionsproteins detektiert (siehe Tabelle 3.1). Dieser Nachweis gelang sowohl Fluoreszenz-mikroskopisch als auch durch direkte Quantifizierung der GFP-Expression im FACS-Gerät. Somit ist *spread* von VP22-Fusionsproteinen mittlerweile für insgesamt 21 Säuger-Zelllinien dokumentiert (siehe Tabelle 3.3) und scheint weder auf bestimmte Zelltypen noch Spezies beschränkt zu sein. Möglicherweise haben unterschiedliche experimentelle Bedingungen wie eingesetzte Zellzahl, Transfektions-Reagenz oder der zur *spread*-Detektion gewählte Zeitpunkt dazu geführt, dass Fang *et al.* in ihren Untersuchungen keinen VP22-Transport nachweisen konnten.

Bei der Analyse mittels FACS wurden unfixierte, lebende Zellen verwendet und die direkte GFP-Fluoreszenz quantifiziert. Alle Zelllinien zeigten einen prozentualen Anstieg an GFP-positiven Zellen beim Vergleich von GFP zu VP22-GFP. Unter den ermittelten optimalen Transfektions-Bedingungen konnte maximal ein 8,7-fach höherer Anteil an fluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden. Demgegenüber stehen frühere Studien, die viel größere Unterschiede nach VP22-Transport berichten (Elliott & O'Hare 1997). So wurden nach Mikroinjektion von Expressionsplasmiden bis zu 200 Nachbarzellen mit nucleärer VP22-GFP-Anfärbung gefunden, die eine einzelne VP22-Produzentenzelle mit cytoplasmatischem VP22-GFP umgaben. Es konnte gezeigt werden, dass Fixierung und Benutzung von Antikörpern die Sensitivität der Detektion von VP22-GFP-positiven Zellen entschei-

dend erhöht (Elliott & O'Hare 1999a). Folglich stellt das hier nachgewiesene niedrigere Verhältnis von VP22-GFP- zu GFP-positiven Zellen primär die niedrigere Sensitivität der GFP-Detektion in lebenden Zellen dar, die das Fusionsprotein nach interzellulärem Transport aufgenommen haben. Trotz dieser niedrigeren Sensitivität ist die FACS-Analyse der GFP-Fluoreszenz in lebenden Zellen dazu geeignet, VP22-vermittelten *spread* zu quantifizieren. Von entscheidender Bedeutung war dabei die Zelllinien-spezifische Optimierung der Transfektions-Bedingungen. Der interzelluläre Protein-Transport stellt also eine generelle Eigenschaft des VP22-Proteins dar, die zur entscheidenden Verbesserung des therapeutischen Gentransfers verwendet werden kann.

4.2 Herstellung viraler VP22-Suizidgen-Vektoren

Um einen möglichst effizienten Gentransfer zu erzielen, wurden rekombinante virale Vektorsysteme gewählt. Mit rekombinanten Adenoviren lassen sich sehr hohe Virustiter erzielen, während retrovirale Vektoren eine dauerhafte Expression des übertragenen Transgens ermöglichen, da eine Integration ins Wirtsgenom stattfindet. Zunächst wurden daher retrovirale und adenovirale Gentransfer-Vektoren, die Expressionskassetten für chimäre Suizidgen-VP22-Konstrukte enthielten, hergestellt (Kapitel 3.1).

Die Herstellung rekombinanter Adenoviren erfolgte durch homologe Rekombination in *E. coli*. Diese Methode weist gegenüber der ursprünglich beschriebenen Rekombination in 293-Zellen eine verbesserte Effizienz sowie eine verminderte Gefahr der Verunreinigung durch Wildtyp-Viren auf (Chartier *et al.* 1996). Retrovirale Vektoren auf Basis des murinen MoMLV-Virus wurden auf herkömmliche Weise mit Hilfe von Verpackungszelllinien erzeugt.

Bei der Expressionskontrolle der adenoviralen Konstrukte im Western-Blot ergab sich, dass C- und N-terminale Fusionen der Suizidgene CD bzw. TK mit VP22 in den erwarteten Größen detektiert werden konnten (Abbildungen 3.4 bis 3.7). Die Expression bei Verwendung des CMV-Promotors war in der Zellkultur deutlich stärker als bei Verwendung des RSV-Promotors, so dass auf die Untersuchung der Fusionskonstrukte unter RSV-Kontrolle in den VP22-Protein-Transport-Studien verzichtet wurde. Dreifach-Fusionen, die neben VP22 beide therapeutischen Gene CD und TK enthielten, zeigten im Western-Nachweis in hohem Maße Abbau-Produkte. Offensichtlich war die gewählte Art der Verknüpfung der drei Polypeptidketten nicht optimal, so dass auch vorzeitig terminierte Frag-

mente gebildet wurden. Insgesamt wurden deutlich größere Proteinmengen der Dreifach-Fusion mit direkter CD-TK-Verknüpfung (CD- Δ TK-VP22) als des Vergleichskonstruktes CD-TK-VP22 gebildet. Letzteres enthielt neben den vollständigen kodierenden Sequenzen der drei Gene einen flexiblen Linker, bestehend aus 8 Glycin-Resten, der eigentlich eine unbeeinflusste Faltung der Protein-Untereinheiten ermöglichen soll. Die tatsächliche dreidimensionale Faltung chimärer Proteine lässt sich jedoch im Einzelfall nicht vorhersagen, so dass wie im vorliegenden Fall erst die funktionelle Untersuchung der Konstrukte Klarheit verschafft. Das vollständige CD-TK-VP22-Protein (in beiden Versionen) konnte dabei nur von den Antikörpern anti-CD, anti-VP22 und anti-CMV-ep, nicht aber von TK-Antikörpern zufriedenstellend detektiert werden. Insgesamt standen 3 monoklonale TK-Antikörper, die gegen verschiedene Epitope gerichtet waren, sowie ein polyklonales Antiserum zur Verfügung. Zusätzlich konnte auch durch Immunfluoreszenz kein VP22-vermittelter Transport mittels TK-Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.14), während dieser Nachweis mit den anderen Antikörpern gelang. Daher muss vermutet werden, dass die verfügbaren TK-Antikörper bestimmte Epitope der HSV-1 Thymidin-Kinase im Fusionskonstrukt nicht ausreichend erkennen.

Im Gegensatz zur Expression mittels rekombinanter Adenoviren war die Menge an hergestelltem Protein bei Verwendung retroviraler Vektoren nicht ausreichend für einen vergleichenden Nachweis im Western-Blot.

4.3 Immunfluoreszenz-Detektion des VP22-vermittelten Transports

Der klassische Nachweis des interzellulären Transports von VP22-Fusionsproteinen ist die indirekte Immunfluoreszenz. Da im Idealfall alle Zellen des auszuwertenden Gesichtsfeldes VP22-positiv sind, wird die Potenz der VP22-Methodik – besonders beim Vergleich mit unfusionierten Kontrollen mit herkömmlicher Transfektions-Effizienz – deutlich vor Augen geführt. Die Auswertung der Immunhistochemie ergab nach Transfektion adenoviraler Plasmide und Transduktion mit rekombinanten Adenoviren analoge Ergebnisse: das Suidgen HSV-1 TK zeigt sowohl bei N- als auch C-terminaler Verknüpfung mit VP22 effektiven Protein-Transport, ausgehend von der primär VP22-exprimierenden Zelle (Abbildungen 3.13 und 3.20). Da Adenoviren in der Zellkultur im Regelfall alle Zielzellen transduzieren, wurde der interzelluläre Transport durch Mischung transduzierter Produzenten-

zellen mit unbehandelten, nicht-transduzierten, Zellen einer anderen Zelllinie, der sogenannten Co-Plattierung, und anschließender Doppelfärbung mit Antikörpern nachgewiesen. Die zeitliche Abstimmung von Mischung der Zellen nach Transduktion und Detektion durch Immunfluoreszenz erwies sich als technisch schwierig und gelang dabei nicht in jedem Fall, so dass in Einzelfällen mit Hilfe von Co-Plattierungen kein VP22-*spread* detektiert wurde.

Im Gegensatz zu TK war bei Verwendung von *E. coli* CD als Transgen die Fusion CD-VP22 im Plasmidkonstrukt wie auch im adenoviralen Vektor dem Konstrukt mit umgekehrter Reihenfolge (VP22-CD) deutlich überlegen. Während CD-VP22 eine deutliche Steigerung der Transfer-Effizienz bewirkte, wurde mit VP22-CD als Fusionskonstrukt kein Transport detektiert (Abbildungen 3.15 und 3.19). In der Literatur wurden bisher Fusionen von VP22 mit GFP (Elliott & O'Hare 1997, Brewis *et al.* 2000), p53 (Phelan *et al.* 1998) und HSV-1 TK (Dilber *et al.* 1999) beschrieben, die alle nach transienter Transfektion der Plasmidkonstrukte getestet worden waren. Dabei wurde kein Effizienz-Unterschied zwischen amino- oder carboxy-terminaler Fusion des Transport-Proteins festgestellt. Andererseits ist es – beispielsweise beim Vergleich der Vielzahl der bisher beschriebenen Fusionen mit GFP – nicht verwunderlich, dass N- oder C-terminale Verknüpfungen von Protein-Domänen, die sich jeweils chemisch unterschiedlich verhalten, die Faltung des Gesamtpeptids deutlich beeinträchtigen können. Im Regelfall muss empirisch getestet werden, bei welcher Fusion die Funktionalität der eingesetzten Proteine erhalten bleibt. Dies ist auch für die hier untersuchten VP22-Fusionen gültig.

Die zur Verfügung stehenden vier Antikörper, die gegen HSV-1 TK gerichtet waren, erwiesen sich in keinem Fall in der Lage, VP22-vermittelten *spread* zu detektieren. In einer Doppelfärbung mit anti-VP22 konnte nachgewiesen werden, dass die Spezifität dieser Antikörper nur zum Nachweis der primär transfizierten Zelle ausreicht, nicht aber zur Anfärbung der ebenfalls TK-VP22-positiven Nachbarzellen (Abbildung 3.14). Der Mechanismus dieser selektiven Epitop-Erkennung der eingesetzten Antikörper bleibt unklar. Vermutlich werden bei der Faltung des chimären Proteins die von den Antikörpern erkannten Epitope maskiert. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass das (nicht Epitop-spezifische) polyklonale TK-Antiserum ebenfalls keinen VP22-Transport detektieren kann.

Bei der Untersuchung der Dreifach-Fusionen der Suizidgene mit VP22 gelang der Nachweis des Protein-Transports nicht in jedem Fall. Nach Transfektion adenoviraler Plasmide konnte mit Hilfe des polyklonalen CD-Antiserums kein oder nur schwacher

VP22-*spread* nachgewiesen werden, während anti-VP22 und anti-CMV-ep stark positive Nachweise liefern (Abbildung 3.16). Da CD am amino-terminalen Ende der Dreifach-Fusion liegt, kann spekuliert werden, ob eine Deletion des chimären Proteins vorliegt. Andererseits ist jedoch anzunehmen, dass bei positiver Anfärbung des C-terminalen CMV-Epitops die Synthese der Polypeptidkette in voller Länge stattgefunden hat (Phelan *et al.* 1998). Die verkürzte Fusion der Suizidgene CD- Δ TK-VP22, bei der 8 aa deletiert wurden, scheint nach Plasmid-Transfektion wie auch adenoviraler Transduktion besser transportiert zu werden als die Alternativ-Version mit Glycin-Linker CD-TK-VP22 (siehe Abbildungen 3.16 und 3.21). In der Literatur werden flexible und chemisch inerte Linker zur optimalen Verknüpfung chimärer Proteine empfohlen (Curtis *et al.* 1991; Rogulski *et al.* 1997), so dass dieses Ergebnis zunächst überraschend scheint. Da generelle Voraussagen nicht gemacht werden können und dies der erste Vergleich der beiden CD-TK-Verknüpfungen ist, wird gefolgert, dass auf die funktionelle Untersuchung chimärer Proteine nicht verzichtet werden kann. Wie schon bei den Doppel-Fusionen gestaltete sich auch hier die technische Ausführung der Co-Plattierungen zum Nachweis des VP22-*spread* als schwierig. Insgesamt erwies sich der interzelluläre Transport der Suizidgene in Dreifach-Fusionen als schwächer ausgeprägt und weniger oft detektierbar als bei Einfach- oder Doppel-Konstrukten. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Quantifizierung des Einflusses von VP22 bei Dreifach-Fusionen im cytotoxischen SRB-Assay verzichtet.

Im Gegensatz zu adenoviralen Plasmiden und rekombinanten Adenoviren konnte bei Verwendung retroviraler Vektoren kein VP22-vermittelter Transport nachgewiesen werden (Abbildung 3.17). Eine mögliche Erklärung dafür ist die unterschiedliche Stärke des CMV-Promotors (durchgehend bei den adenoviralen Konstrukten zur Expression eingesetzt) verglichen mit schwächeren retroviralen LTR-Promotoren. Die Konstrukte in der vorliegenden Arbeit beruhen auf dem Basisvektor pLXSN (Miller & Rosman 1989), bei dem eine Expression unter LTR-Kontrolle erfolgt. Andere retrovirale Konstrukte erlauben dagegen auch eine Expression des Transgens mit Hilfe alternativer Promotoren. Dies wurde jedoch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Darüber hinaus sind die erreichten retroviralen Titer nach transienter Transfektion der Verpackungszelllinie zum einen stark schwankend, zum anderen einige Log-Stufen niedriger als bei Verwendung rekombinanter Adenoviren. Als Folge kann die Transduktion der Zielzellen nur mit gerin-

gerer Viruszahl pro Zielzelle (MOI: *multiplicity of infection*) untersucht werden. Während adenovirale Vektoren ohne Mühe bis zu einer MOI von 1000 eingesetzt werden können, erreicht man auf Grund der deutlich niedriger liegenden Ausgangskonzentrationen der retroviralen Überstände nur in Ausnahmefällen eine MOI von 10. Derzeit werden stabile retrovirale Produzenten-Zelllinien hergestellt, die ständig rekombinante Viruspartikel ins Kulturmedium sezernieren. Durch Selektion hochtitriger Klone soll gewährleistet werden, dass in weiteren Untersuchungen auch das VP22-Transportverhalten rekombinanter Retroviren bei höherer MOI untersucht werden kann.

4.4 Quantifizierung des Suizidgen-Effektes

Nach eingehender Charakterisierung und dem immunhistochemischen Nachweis, dass die VP22-Transport-Eigenschaft auch bei Verwendung von viralen Vektoren erhalten bleibt, wurde der eigentliche Nachweis einer potenziell verbesserten Wirksamkeit der Suizidgene in Zelltod-Assays erbracht. Die Quantifizierung des Effektes erfolgte durch den Proteinfarbstoff Sulforhodamin B (SRB). Dabei war die Menge der abgetöteten Tumorzellen nach Transduktion mit Ad-CD-VP22 im Vergleich zu Ad-CD signifikant erhöht (siehe Abbildung 3.23). Die notwendige Wirkkonzentration der *prodrug* 5-FC zur Eliminierung von 50% der Zellen (IC_{50}) konnte dabei um fast eine Log-Stufe auf 0,45 mM erniedrigt werden. Dies ist im Hinblick auf einen *in vivo*-Einsatz von großer Bedeutung, da hohe Konzentrationen an 5-FC durch die Bakterien der Darmflora in 5-FU umgewandelt werden und so prinzipiell eine systemische Toxizität bewirken können (Diasio *et al.* 1978). Während bei der höchsten verwendeten Konzentration der *prodrug* nach 6 Tagen Inkubation ähnliche Überlebensraten erreicht wurden, zeigt sich die verbesserte Wirkung der VP22-Fusion deutlich beim Einsatz suboptimaler Wirkkonzentrationen: die CD-VP22-Chimäre wirkt schneller (4 vs. 6 Tage) und bei niedrigeren *prodrug*-Spiegeln als herkömmliches CD ohne Fusionspartner. Im Gegensatz zu Ad-CD-VP22 wurde in den Vorversuchen mit Ad-VP22-CD kein VP22-vermittelter Protein-Transport nachgewiesen und folglich auch im Cytotoxizitäts-Test keine Verbesserung der Suizidgenwirkung gemessen.

Anders verhält es sich beim Einsatz von Fusionsproteinen, bestehend aus TK und VP22, bei Verwendung adenoviraler Vektoren. Sowohl bei amino- als auch carboxy-terminaler Verknüpfung wurde ein *spread* des chimären Proteins durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Im SRB-Assay zeigte sich jedoch keine Veränderung der Suizidgen-

Wirkung verglichen mit Ad-TK (siehe Abbildung 3.23). Dieses überraschende Ergebnis lässt sich wie folgt diskutieren: (1) entweder gelang der Nachweis verbesserter Wirksamkeit aus methodischen Schwierigkeiten nicht oder (2) die TK-Wirkung selbst kann durch diese Methode nicht verbessert werden, d.h. Fusionen aus VP22 und TK sind prinzipiell nicht wirksamer als TK alleine. Mögliche methodische Unwägbarkeiten sind zum einen die Verwendung adenoviraler Vektoren, zum anderen die Tatsache, dass der Nachweis des VP22-Transports in der Co-Plattierung nicht in jedem Fall gelingt. Möglicherweise findet VP22-vermittelter Protein-Transport nach Expression mittels rekombinanter Adenoviren nur unter bestimmten Transduktionsbedingungen statt. Gegen diese Vermutung spricht, dass Adenoviren mit CD-VP22 als Transgen unter gleichen Bedingungen die positiven Ergebnisse der Immunfluoreszenz im Zelltod-Assay bestätigten. Da ein Transport auch mit chimären TK-Fusionen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen wurde, wird grundsätzlich von der Funktionalität des VP22-Transports wie auch der adenoviralen Vektoren selbst ausgegangen. Andererseits kann die Kinase-Aktivität der TK durch Ausbildung der Fusionen beeinträchtigt worden sein. Das würde bedeuten, dass ein Transport zwar stattfindet, die Phosphorylierung der *prodrug* GCV jedoch gestört ist. Zwei Gründe sprechen gegen diese Annahme. Einerseits geht die Suizidgen-Wirkung der TK-VP22-Fusionen nicht auf Null zurück, sondern verbleibt auf dem Niveau der nicht fusionierten Version. Das aktive Zentrum der TK scheint also nicht komplett inhibiert zu sein. Zweitens wurde bereits in früheren Studien durch ³H-Thymidin-Konversions-Tests demonstriert, dass die Kinase-Funktion des Enzyms TK nach Fusion mit VP22 unbeeinflusst bleibt (Dilber *et al.* 1999). Möglicherweise resultieren die unterschiedlichen Methoden zum Nachweis des Zelltodes jedoch in verschiedenen Ergebnissen, da jeweils andere Parameter gemessen werden: während Enzym-Tests nur die Aktivität der Kinase-Funktion detektieren, quantifizieren Zelltod-Assays wie SRB- oder MTT-Tests die tatsächliche Suizid-Wirkung auf Zielzellen. Zudem wurde in bisherigen Veröffentlichungen der VP22-Transport nur auf Plasmidebene untersucht, während hier erstmals virale Vektoren zur Expression der Fusionen verwendet wurden.

Ein weiterer Grund für das Ausbleiben einer erhöhten Zelltod-Wirkung der VP22-Fusionen mit HSV-1 TK kann in der intrazellulären Lokalisation des Enzyms liegen. Nach VP22-vermitteltem Transport liegt TK in den Nachbarzellen der primär transduzierten Zelle ausschließlich in nukleärer Form vor. Bisher ist nicht abschließend geklärt, ob TK im Kern oder im Cytoplasma vorliegen muss, um seine Enzym-Wirkung zu entfalten. In der

vorliegenden Arbeit findet sich unfusioniertes TK nach Transfektion und Transduktion in beiden Haupt-Kompartimenten der Zelle, wobei die Anfärbung des Kerns intensiver ausfällt (siehe Abbildungen 3.13, 3.14 und 3.20). Andere Studien gehen von einer ausschließlichen nukleären Lokalisation der HSV-1 TK aus, wobei allerdings nur die direkte Fluoreszenz von TK-GFP-Fusionen detektiert wurde (Degreve *et al.* 1998). Die Autoren betonen jedoch, dass es keine Anzeichen für eine Aufteilung der dNTPs in Kern und Cytoplasma gibt, die cytostatische Aktivität von TK folglich vom Zell-Kompartiment unabhängig sein sollte.

Da nach VP22-Transport in die Nachbarzellen nukleäres TK in der Immunfluoreszenz deutlich schwächer als in der primär VP22-exprimierenden Zelle angefärbt wird, stellt sich schließlich die Frage, in welchem Ausmaß die Menge der transportierten TK mit der Anzahl der TK-Moleküle in der transduzierten Zelle korreliert. Nach einer Co-Plattierung könnten beispielsweise die zur Visualisierung des TK-Austransports gemischten Zellpopulationen wieder durch FACS-Sortierung getrennt werden, so dass die TK-Aktivität einzeln erfasst wird. Sollte die Menge des durch *spread* verbreiteten Enzyms deutlich unter den Erwartungen liegen, kann dies ein Grund für das Ausbleiben einer additiven Zelltod-Wirkung der VP22-Fusionen sein. Im Vergleich mit dem Ad-CD-VP22-System scheint diese Erklärung wiederum fraglich zu sein. Insgesamt konnte bislang kein Erklärungsversuch für die fehlende Potenzierung der Suizidgen-Wirkung durch chimäre Proteine aus VP22 und TK bewiesen werden.

4.5 Immunreaktion auf VP22

Hauptnachteil bei Verwendung adenoviraler Vektoren der ersten Generation *in vivo* ist das Auftreten der zellulären Immunantwort, die gegen die auf niedrigem Niveau exprimierten adenoviralen Genprodukte in den infizierten Zellen gerichtet ist, und zur Elimination dieser Zellen führt. In der Suizidgentherapie wird dieser Nachteil prinzipiell zum Vorteil, da zusätzlich zum Suizidgen-Effekt eine Immunsystem-vermittelte Zerstörung der Tumorzellen erreicht wird. Bislang überwiegt jedoch die toxische Wirkung der rekombinanten Adenoviren, insbesondere nach Transduktion der Leber als Zielorgan, so dass die therapeutischen Gene keine relevanten Wirkspiegel erzielen (Brand *et al.* 1997). Darüber hinaus wird auch eine Reaktion der cytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) gegen die heterologen Transgene beobachtet: bei Verwendung von Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT), β -Galactosi-

dase (β -Gal) oder Cytosin-Desaminase (CD) aus *E. coli*, GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* oder humanem Factor IX (hFIX) sowie Thrombopoetin (hTPO), wurde nach intravenöser Gabe in immun-kompetente Mäuse eine CTL-Antwort beschrieben (Song *et al.* 1997; Michou *et al.* 1997). Im Falle des interzellulären Transportproteins VP22 konnte dagegen im hier durchgeführten ^{51}Cr -release-Assay keine erhöhte CTL-Aktivität gefunden werden. Nach i.p.-Gabe VP22-exprimierender Zellen in C57BL/6- oder BALB/c-Mäuse, Ernte der Milzzellen nach 8 Tagen und Re-Stimulation mit VP22-Epitopen (auch mittels Datenbank-Analyse ausgewählte synthetische Kandidaten-Peptide), wurden keine MHC-I-Ligand-stimulierten Killerzellen detektiert (s. 3.6.2). Somit scheint VP22 keine spezifische zelluläre Immunantwort auszulösen. Dieses Ergebnis ist für den klinischen Einsatz von VP22-Fusionen in der Gentherapie von großer Bedeutung.

4.6 Vergleich von VP22 mit anderen Protein-Transportern

Neben VP22 aus Herpes simplex-Virus Typ-1 wurden in der Literatur auch andere (Poly)-Peptide beschrieben, die als Protein-Transporter fungieren können. Im Folgenden werden dabei die unterschiedlichen Mechanismen und Einsatzgebiete genauer diskutiert. Die Transport-Funktion von Membran-Translokations-Proteinen wie HIV-1 Tat-PTD, *Drosophila* pAntp (Penetratin), synthetischem Transportan und HBV-TLM lässt sich jeweils auf definierte Peptid-Abschnitte, die nur 11 bis 27 aa groß sind, einschränken. Für das Strukturprotein VP22 wurde bislang kein entsprechendes spezifisches Motiv nachgewiesen. Die Deletion der C-terminalen 134 aa bewirkt eine Aufhebung der Transport-Fähigkeit, ein funktioneller Transport chimärer Proteine ist bisher nur unter Verwendung der vollständigen Polypeptidkette möglich.

Die kürzeren Motive der zellpermeablen Peptide bilden hydrophobe oder amphiphile α -Helices, die kurzlebige Poren in der Plasmamembran bilden können. Prinzipiell können diese Oligo-Peptide auch verknüpfte Proteine durch die Membranen translozieren. Für das HBV-TLM wurde beispielsweise ein umfassender Transport von Peptiden, Proteinen, Partikeln und Nukleinsäuren postuliert (Saher & Hildt 1999). Dabei wurde hauptsächlich mit Wildtyp-PreS2-Protein-GFP-Fusionen gearbeitet, der Transport mit der verkürzten Peptidform ist nur für Einzelfälle beschrieben (Oess & Hildt 2000). Ebenso wurde der Nachweis, dass Transport im Tiermodell von Maus, Ratte und Kaninchen über mehrere

Zellschichten hinweg möglich ist, nur mit unfusioniertem Wildtyp-PreS2-Protein erbracht (Saher & Hildt 1999).

Die in der Literatur beschriebenen Studien des Protein-Transports mit Hilfe von zellpermeablen Peptiden benutzen dabei ausschließlich bakteriell exprimierte, aufgereinigte und chemisch verknüpfte Peptid-Protein-Komplexe (Schwarze *et al.* 1999; Hildt & Oess 1999; Pooga *et al.* 1998; Schutze *et al.* 1996). Damit gelingt – auch *in vivo* – sehr effektiv die Transduktion der Zellmembran. In keiner dieser Veröffentlichungen wurde bisher jedoch eine Untersuchung mit Hilfe von Expressions-Plasmiden oder viralen Vektoren, wie hier in der vorliegenden Arbeit für VP22 detailliert belegt, beschrieben. Obwohl bei Verwendung rekombinanter Viren als Genfähren die Barriere der Zellmembran durch Transduktion zusätzlich überwunden werden muss, können die genetisch zu korrigierenden Zellen zielgenauer erreicht werden. Durch Rezeptor-Targeting und transkriptionelle Kontrolle kann sogar eine Feinregulation der Expression erfolgen. Der Austransport von VP22-Fusionsproteinen ist als Gradienten-Effekt lokal begrenzt. Die Gabe aufgereinigter chimärer Protein-Konstrukte mit Peptid-Transport-Funktion ist dagegen prinzipiell nur durch lokale Applikation steuerbar. So wurde eine PTD- β -Gal-Fusion nach intraperitonealer Injektion in allen Geweben behandelter Mäuse (dabei u.a. auch im Gehirn) nachgewiesen (Schwarze *et al.* 1999).

Neben der grundsätzlichen Verfügbarkeit von VP22-Fusionen in Vektorsystemen ist zum zweiten eine nachfolgende aktive Sekretion nur für VP22 nachgewiesen. Demgegenüber wurden zellpermeable Peptide bislang hauptsächlich zum Eintransport von hydrophilen Makromolekülen wie Peptide und Oligonukletide beschrieben. So konnten in der Antisense-Strategie verwendete PNAs (*peptide nucleic acids*), bei denen das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA durch das stabilere neutrale Peptid-Gerüst ersetzt ist, mittels Disulfidbrücken-Verknüpfung durch Einsatz des Transportan-Shuttles bereits erfolgreich *in vivo* therapeutisch eingesetzt werden (Pooga *et al.* 1998).

Untersuchungen zum Mechanismus des Zelleintransports durch Peptide mit amphipatischen dimerisierenden Helices (Transportan, Penetratin, TLM) oder kationischen Untereinheiten (Tat: 6 Arginin-, 2 Lysin-, 1 Glutamin-Rest) erhielten vor kurzem eine neue Facette: Wender und Kollegen konnten nachweisen, dass ein **Oligo-Arginin-Tag**, bestehend aus 9 Arginin-, nicht aber aus Ornithin-, Leucin- oder Glutamat-Resten hocheffizient für die Zelllinien-unabhängige Internalisierung von Cyclosporin und Taxol sorgt (Service 2000). Da nur Arginin – im Gegensatz zu den anderen getesteten Aminosäuren – in der Lage

ist, Wasserstoffbrücken zu bilden, wird spekuliert, dass hierin die Erklärung des gefundenen raschen Membrantransports liegt.

Insgesamt ist die Wirkungsweise von VP22 vielfältiger und nicht auf den Eintransport von hydrophilen Makromolekülen beschränkt. Neben dieser Verwendung als Peptid-Vektor kann mit Hilfe von VP22-Fusions-Proteinen die niedrige Transduktionsrate gentherapeutischer Vektoren *in vivo* potenziell entscheidend verbessert werden, indem das therapeutische Protein mittels VP22 in die per Transduktion direkt nicht erreichten Nachbarzellen transportiert werden kann. Für den therapeutischen Effekt ist es nicht entscheidend, dass alle Zellen eines zu behandelnden Organs genetisch korrigiert werden, sondern das therapeutische Protein als Genprodukt möglichst viele Zielzellen erreicht.

4.7 Mechanismus des VP22-Protein-Transports

Der genaue Mechanismus des VP22 *spreads* ist noch weitgehend unklar. Im Gegensatz zu den in 4.6 diskutierten Membran-Translokations-Proteinen sind bislang für VP22 keine spezifischen Transport-Motive nachgewiesen. Lediglich Einzelaspekte konnten bislang geklärt werden. So wurden die unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen einer VP22-exprimierenden Zelle mittels *time lapse*-Fluoreszenz-Mikroskopie³⁴ im Detail untersucht (Elliott & O'Hare 2000). Bei Beobachtung von lebenden Zellen reicht die Fluoreszenzintensität von GFP nicht aus, um Zellen darzustellen, die VP22 durch interzellulären *spread* aufgenommen haben (vergleiche auch Kapitel 3.3). Die Detektion dieser Zellen wird nur durch Antikörper-Verstärkung möglich. Folglich kann die *Live*-Betrachtung lebender Zellen im Kulturmedium nur die initial VP22-exprimierenden Produzentenzellen, nicht aber die benachbarten Zellen analysieren. Nach Transfektion eines GFP-VP22-Fusionskonstruktes, wurden die klassischen cytoplasmatischen und nukleären Färbemuster gefunden. Dabei stellten die Autoren überraschenderweise fest, dass die Bindung von VP22 an Mikrotubuli, die sich als bekannte cytoplasmatisch-filamentöse Anfärbung manifestiert, eine nachfolgende Zellteilung verhindert. Dieses Phänomen der Mitose-Inhibition durch verstärkte Mikrotubuli-Bindung ist auch von anderen Mikrotubuli-bindenden Proteinen bekannt (Lee & Brandt 1992).

³⁴ Animationen aller *time lapse*-Aufnahmen sind als Quicktime-Video im Internet unter <http://www.mcrl.ac.uk/VirusAssembly/timelapse.html> einsehbar.

Zellen, die eine Mitose durchlaufen, zeigen dagegen ca. 16 h nach der Transfektion zunächst eine diffuse cytoplasmatische Lokalisierung von GFP-VP22. Im Anschluss erfolgt eine Bindung an die kondensierten Chromosomen, so dass die einzelnen Stufen der Zellteilung *live* mitverfolgt werden können. Als Resultat erscheinen zwei Tochterzellen mit ausschließlich nukleärer Anfärbung (siehe Abbildung 4.1). Eine weitere Umverteilung findet nicht statt. Die Translokation des „löslichen“ VP22 vom Cytoplasma in den Nukleus während der Mitose ist somit Zellzyklus-gesteuert und erscheint als neuer, ungewöhnlicher Weg des gerichteten Kerneintransports eines Proteins. Zugleich ergibt sich eine Analogie der Zellzyklus-abhängigen Lokalisation in den verschiedenen Kompartimenten mit dem zelleigenen Protein Cyclin B1 (Pines & Hunter 1991). Während Elliott und O'Hare das Vorhandensein eines klassischen Kernlokalisierungssignals ausschließen und die Zellzyklus-regulierte Translokation postulieren, sehen andere in der großen Anzahl basischer Aminosäuren (Fang *et al.* 1998) oder Motiven an Position 82 und 295 von VP22, welche durch PROSITE II- oder MotifFinder-Datenbanksuche³⁵ detektiert wurden (Harms *et al.* 2000), sehr wohl klassische Kerneintransport-Signale vorhanden.

Zusätzlich zeigen Elliott und O'Hare in derselben Studie (Elliott & O'Hare 2000), dass interzellulärer *spread* von VP22 nicht nur nach transienter Transfektion, sondern auch während der Infektion mit Herpes simplex-Viren stattfindet. Diese Beobachtung ist stark von der verwendeten Viruszahl pro Zelle (MOI) abhängig, was frühere Publikationen mit abweichenden Ergebnissen teilweise zu erklären vermag (Pomeranz & Blaho 1999; Elliott & O'Hare 1999a; Morrison *et al.* 1998). Die Mitose-induzierte Translokation von VP22 in den Zellkern kann nur bei Verwendung von niedrigen MOIs (unter 0,01) detektiert werden, während Infektionen mit hoher Viruszahl dazu führen, dass der vollständige Zyklus der Virusreplikation bereits vor dem Eintritt in die Zellteilung beendet ist. Das Resultat ist die üblicherweise beobachtete cytoplasmatische Lokalisation von GFP-VP22 während des Lebenszyklus von HSV-1 (Elliott & O'Hare 1999b). Aus den durch die *Live*-Betrachtung gewonnenen subzellulären Färbemustern der VP22-exprimierenden Zellen schließen Elliott und O'Hare auf verschiedene Wege des Proteintransports nach Infektion und Transfektion (Abbildung 4.1). Zusätzlich ist festzustellen, dass auch nach Transduktion mit rekombinanten Adenoviren die oben beschriebenen distinkten Färbemuster des VP22-Transports resul-

³⁵Mit Hilfe der Datenbanken PROSITE II und MotifFinder (zugänglich über die WWW-Server PSORT, Programm PSORT II: <http://psort.nibb.ac.jp:8800/> bzw. GenomeNet, Programm MOTIF: <http://www.genome.ad.jp/>) können Konsensus-Sequenzen des subzellulären zielgerichteten Proteintransports ermittelt werden.

tieren (Abbildungen 3.18 bis 3.21). Schlüssige Erklärungen dafür existieren bislang nicht. Nach Infektion mit HSV werden mindestens 4 zusätzliche Phasen der VP22-Anfärbung unterschieden (Elliott & O'Hare 1999b). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Färbemuster nach Transfektion von VP22-GFP (Abbildung 3.12) werden somit hauptsächlich als Darstellung der Einzel-Phasen der Mitose interpretiert. Weiterführende Erklärungen für davon abweichende Muster wären spekulativ.

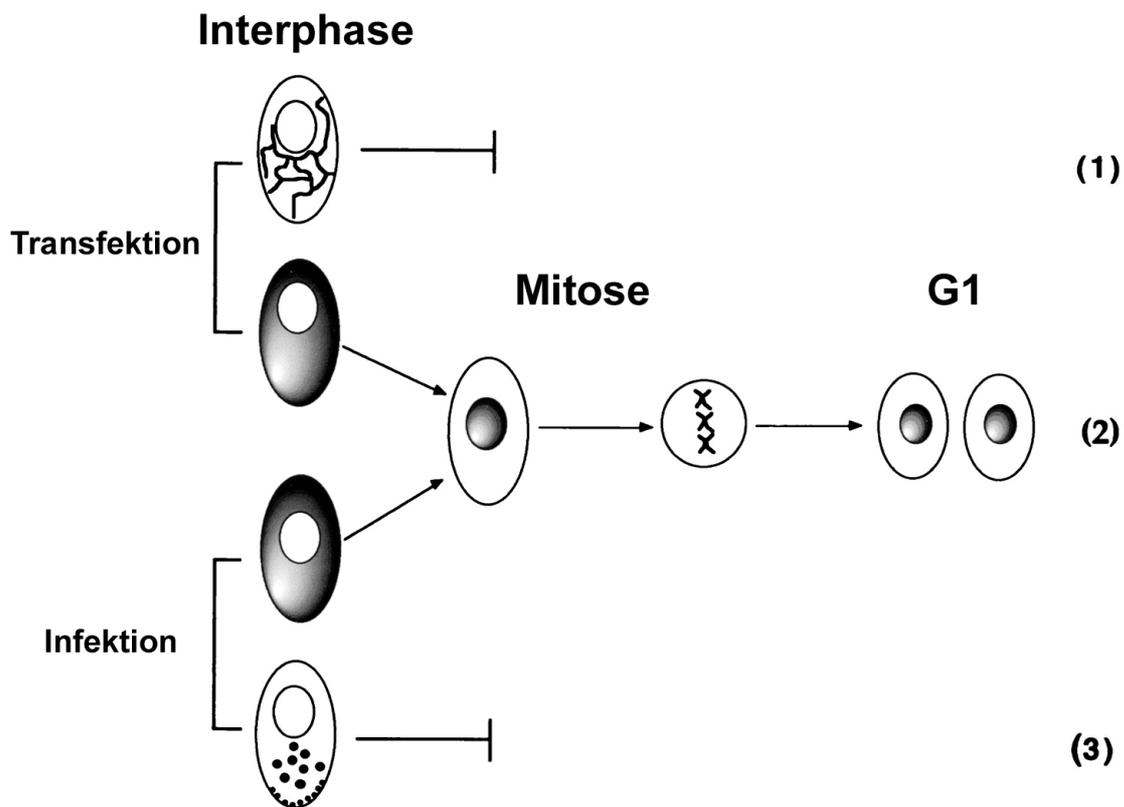


Abbildung 4.1: VP22-Färbemuster nach Transfektion und HSV-Infektion.

Erläuterung siehe Text; aus: Elliott & O'Hare, 1999b

Zwischenzeitlich wurde VP22-vermittelter interzellulärer Proteintransport auch beim Analogon des bovinen Herpes-Virus Typ-1 gefunden (Harms *et al.* 2000). Während ein YFP-VP22-Fusionskonstrukt im Wesentlichen ähnliche subzelluläre Färbemuster ergab, scheint die Effizienz des Austransports in die Nachbarzellen noch ausgeprägter als bei HSV-1 VP22 zu sein. Die Autoren folgern, dass bovines VP22 als Transportvehikel für die Suizid-gentherapie ebenfalls geeignet sein könnte. Die nur geringe Sequenz-Homologie auf Ami-

nosäurebasis von 28,7% der beiden VP22-Analoga (258 vs. 301 aa Gesamtlänge) weist darauf hin, dass gemeinsame Charakteristika, wie die Zellzyklus-abhängige Bindung an Mikrotubuli oder Chromatin, sowie die Fähigkeit des nicht-klassischen interzellulären Protein-Transports, eher in der dreidimensionalen Struktur von VP22-Proteinen begründet liegt. Erste Studien der räumlichen Struktur von VP22 ergaben jedoch noch kein klares Bild der vorliegenden Konformation (Kueltzo *et al.* 2000).

Während in der vorliegenden Arbeit die Verbesserung der Suizidgenwirkung der *E. coli* CD quantifiziert und als signifikant nachgewiesen wurde, wird die Transport-Leistung von VP22 in einzelnen Studien negiert und als Artefakt bezeichnet. Es wurde unter anderem postuliert, dass VP22 nach einer Fixierung durch Methanol aus den infizierten Zellen durch die Zerstörung der Zellmembran austrete und in die Nuclei der Nachbarzellen aufgenommen werde, während dieser Effekt nach einer Paraformaldehyd-Fixierung nicht auftrete (Pomeranz & Blaho 1999). Es wird gefolgert, dass nach Methanol-Fixierung Artefakte auftreten, die einen VP22-vermittelten Proteintransport vortäuschen (Harms *et al.* 2000), was von den Entdeckern des VP22-Transportphänomens mit einer eigenen Studie bestritten wird (Brewis *et al.* 2000). Insbesondere besteht Uneinigkeit darüber, ob in Nachbarzellen eintransportiertes VP22 durch einfache GFP-Fluoreszenz in unfixierten Zellen (ohne Verstärkung durch Verwendung von Antikörpern) überhaupt detektiert werden kann. Während Fang und Kollegen das interzelluläre Transportphänomen selbst bei Verwendung eines GFP-Antikörpers generell in Frage stellen (Fang *et al.* 1998), wird dies in mehreren nachfolgenden Arbeiten – wie auch in der hier vorliegenden Dissertation – explizit widerlegt. Doch wird festgestellt, dass eine Beobachtung der *foci* des VP22-Transports in lebenden Zellen im Kulturmedium (!) nicht möglich ist (Elliott & O'Hare 2000; Aints *et al.* 1999; Elliott & O'Hare 1999b). Dagegen wird in der Vergleichsstudie von bovinem und HSV-1 VP22-Protein mit *yellow fluorescent protein* (YFP) eine Mutante von GFP verwendet, die als sensitiver beschrieben wird und so erstmals eine Detektion des VP22-Transports im Medium erlaube (Harms *et al.* 2000).

4.8 Weiterführende Suizidgen-Strategien

4.8.1 Verbesserte Versionen der HSV-1 TK

Obwohl GCV als *prodrug* bereits in klinischen Studien mit HSV-1 Thymidin-Kinase als Suizidgen eingesetzt wird, sind bei den zur Anti-Tumor-Wirkung verwendeten Dosierungen von GCV immun-supprimierende Nebenwirkungen zu verzeichnen. Bei Verwendung mutierter Versionen der TK mit erhöhter Spezifität für GCV kann theoretisch durch Verminderung der Dosierung diese *prodrug*-vermittelte Toxizität vermieden werden. Black *et al.* (1996) selektierten aus einer PCR-generierten Bibliothek neue TK-Mutanten, die eine verbesserte Cytotoxizität bei niedrigen GCV-Konzentrationen aufweisen. Durch Substitution von 6 Aminosäuren in der Region der Nucleosid-Bindungstasche konnten IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich erzielt werden, so dass jetzt zur Abtötung von 50% der Zellen bereits eine 2 Log-Stufen niedrigere Konzentrationen der *prodrug* ausreicht (Wildtyp-TK: 30 μ M; TK-mut 30: 0,025 μ M). Auch im *in vivo*-Modell des Glioblastoms war es in Nacktmaus-Versuchen möglich, eine 10-fach geringere Dosis zur Verhinderung des Tumorwachstums einzusetzen (Kokoris *et al.* 1999). Nach Transduktion von humanen Tumor-Zelllinien mit retroviralen Vektoren wurde bei TK-mut 30 sowohl eine bis zu 500-fach bessere Effizienz des GCV-vermittelten Zelltodes gegenüber Wildtyp-TK, als auch ein potenziertes *bystander effect* gefunden (Qiao *et al.* 2000). Die TK-Mutante 75, welche nach Transfektion in TK-Zellen eine deutlich höhere GCV-Sensitivität als Wildtyp-TK aufwies (Black *et al.* 1996; Dilber *et al.* 1999), zeigte dagegen keine generelle Wirkungsverstärkung. Zusätzlich fand sich bei einem Vergleich von Thymidin-Kinasen verschiedener Herpes-Viren eine bis 12-fach bessere Suizidgen-Wirkung der TK aus equinem Herpes-Virus Typ-4 gegenüber Herpes simplex Virus Typ-1 (Loubiere *et al.* 1999).

Deletierte Versionen der HSV-1 TK scheinen dagegen toxische Wirkungen abzumildern. Durch Injektion adenoviraler Vektoren der ersten Generation wurden bekanntermaßen schwere Gewebeschädigungen wie Lebertoxizität und eine starke Verringerung der Überlebenszeit beobachtet (Brand *et al.* 1997). Bei der Behandlung von Gehirntumoren in Lewis-Ratten führte eine einzelne Dosis von Ad-TK zu einer chronischen inflammatorischen Reaktion, Nekrose und Demyelinisierung der nicht-tumoralen Zellen, die länger als 3 Monate andauerte (Dewey *et al.* 1999). Neben der Immunreaktion gegen den Adenovirus-Vektor wurde die auftretende Neurotoxizität auch auf das TK-Transgen zurückgeführt.

Verwendet man eine trunkeerte Version der Thymidin-Kinase, bei der nach Deletion der N-terminalen 45 aa die Transkription am zweiten ATG-Startcodon beginnt (Salomon *et al.* 1995), können die degenerativen Effekte vermieden werden, wobei Δ TK gleichzeitig das Tumorstwachstum *in vivo* genauso effizient wie Wildtyp-TK zu hemmen vermag (Dewey *et al.* 1999, Cowsill *et al.* 2000).

4.8.2 Wirkungsverstärkung der CD-Suizidgen-Strategie

Trotz der prinzipiell großen Potenz des CD/5-FC-Systems *in vitro*, zeigten die bisherigen Tierstudien eine enttäuschend geringe Effizienz (Trinh *et al.* 1995; Huber *et al.* 1993). Dies wird zum einen auf eine mangelnde Umwandlung der *prodrug*, zum anderen auf das Vorhandensein eines intakten Immunsystems zurückgeführt (Consalvo *et al.* 1995; Mullen *et al.* 1994). Andererseits konnte im Vergleich von immun-kompetenten BALB/c-Mäusen mit Nacktmäusen nachgewiesen werden, dass nur bei vorhandener Immunabwehr ein signifikanter Rückgang der subcutanen Hepatome stattfand (Kuriyama *et al.* 1999; Uckert *et al.* 1998). Es wird gefolgert, dass die Suizidgen-Wirkung der Cytosin-Desaminase und der *bystander effect* alleine bei den meisten *in vivo*-Tumormodellen nicht wirksam sind. Beides muss durch den zusätzlichen Mechanismus der Steigerung der Immunogenität von malignen Zellen und Ausbildung einer protektiven Immunität ergänzt werden. Dies kann auch durch zusätzliche Gabe von (genetisch kodierten) Wachstumsfaktoren und Chemokinen wie GM-CSF (Cao *et al.* 1998), Lymphotactin, welches T- und NK-Zellen stimuliert (Ju *et al.* 2000), oder Interferon (IFN- α 1, IFN- γ) (Nanni *et al.* 1998) sowie co-stimulatorischen Molekülen wie B7 und ICAM (Ramesh *et al.* 1996) erreicht werden.

Wie schon bei den herkömmlichen Behandlungen maligner Tumoren zeigt γ -Bestrahlung auch in Kombination mit der CD-Suizidgen-Strategie additive Effekte (Stackhouse *et al.* 2000; Rogulski *et al.* 1997).

Das Uracil-Phosphoribosyl-Transferase-Gen (UPRT) aus *E. coli*, welches in Säugertieren nicht vorkommt, katalysiert als Pyrimidin-*salvage pathway*-Enzym die Umwandlung von Uracil und 5'-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat (PRPP) zu UMP. Wird UPRT in Kombination mit CD benutzt, kann nach der Umwandlung von 5-FC in 5-FU auch der anschließende Schritt zu 5-Fluor-UMP begünstigt werden. In einem Rattenmodell des Gliosarcom-

Hirntumors konnte durch Co-Injektion adenoviraler Vektoren mit diesen Suizidgenen eine Verlängerung der Überlebensdauer erreicht werden (Adachi *et al.* 2000).

Bei Verwendung der Cytosin-Desaminase aus Bäcker-Hefe, *Saccharomyces cerevisiae* (yeast-CD, YCD), kann darüber hinaus die *prodrug* 5-FC 10- bis 30-fach besser toxifiziert werden, so dass sich in C3H-Mäusen eine deutlich verbesserte Tumorreduktion verglichen mit bakterieller CD ergab (Adachi *et al.* 2000; Hamstra *et al.* 1999). YCD zeigt bei einer Länge von nur 158 aa (vs. 427 aa für *E. coli*-CD) im Vergleich mit Cytosin-Desaminase aus *E. coli* nahezu keine Sequenz-Homologie auf Protein- und Nukleotid-Ebene. Verknüpft man Cytosin-Desaminase aus Hefe mit dem im Stoffwechselweg nachfolgenden Enzym UPRT als Fusionsprotein (FCY-1, FUR-1), wird die Toxifizierung von 5-FC über 5-FU zu 5-Fluor-UMP deutlich beschleunigt (Erbs *et al.* 2000).

4.8.3 CD-TK Doppel-Strategie

Zahlreiche Tiermodelle mit TK/GCV oder CD/5-FC als Anti-Tumor-Agenzien erzielten keinen Rückgang der Tumormasse oder zeigten eine Wiederaufnahme des Tumorwachstums nach Beendigung der *prodrug*-Therapie (TK: Zhang *et al.* 1997; Cool *et al.* 1996; Golumbek *et al.* 1992; CD: Hirschowitz *et al.* 1995; Richards *et al.* 1995; Mullen *et al.* 1994; Huber *et al.* 1993). Zudem scheinen einzelne maligne Zelllinien bevorzugt auf eine dieser beiden Suizidgen-Toxifizierungen anzusprechen. So wurde *in vitro* eine deutlich bessere Wirkung von CD/5-FC bei Lungen- und Colorectal-Carcinomzellen beobachtet (Hoganson *et al.* 1996; Trinh *et al.* 1995), was sich in Tiermodellen dieser Tumoren (Rogers *et al.* 1996; Trinh *et al.* 1995), nicht aber beim Mamma-Carcinom (Uckert *et al.* 1998), bestätigte. Werden darüberhinaus hohe *prodrug*-Konzentrationen appliziert, ist eine beträchtliche unspezifische Toxizität für nicht-transfizierte Zellen zu verzeichnen (Zhang *et al.* 1997; Beck *et al.* 1995).

Deshalb wurde versucht, beide Suizidgen-Systeme mit distinkten Inhibitions-Mechanismen der RNA- und DNA-Synthese zu kombinieren. Erste Ansätze zeigten eine synergistische Verstärkung der lokalen Antitumor-Wirkung gegenüber der Monotherapie (Uckert *et al.* 1998; Aghi *et al.* 1998; Rogulski *et al.* 1997). Erstaunlicherweise erwiesen sich hier Gliosarcomzellen bei Verwendung einer CD-TK-Fusion als 1000-fach sensitiver gegenüber GCV als zu 5-FC (Rogulski *et al.* 1997). Werden Brustkrebszellen, die retroviral mit CD und TK transduziert wurden, in syngene Mäuse implantiert, führte die Kombinationstherapie mit 5-FC und GCV bei intaktem Immun-System zu einem vollständigen

Ausbleiben einer Tumorentwicklung (Uckert *et al.* 1998). Bei immun-defizienten Mäusen jedoch ergab selbst die Verwendung eines adenoviralen Vektors, welcher für eine CD-TK-Fusion kodierte, in humanen Cervixcarcinom- oder Hep3B-Hepatom-Modellen keine befriedigende Anti-Tumor-Aktivität (Rogulski *et al.* 2000). Im Gegensatz dazu wurde ein vollständiger Rückgang von Tumoren in einem Nacktmausmodell erzielt, wenn zusätzlich zur CD-TK-Doppel-Therapie ein Replikations-kompetenter Adenovirus auf Basis des ONYX-015-Vektors und Bestrahlung als Vierfach-Therapie eingesetzt wird (Rogulski *et al.* 2000). Es wird postuliert, dass Wildtyp-Adenovirus-Vektoren mit Deletion der p53-Bindedomäne im E1B-Gen – bei minimaler Toxizität für normale Zellen – bevorzugt Tumorzellen zerstören, wobei durch die Replikationsfähigkeit der Viren die Expression der Suizidgene bis um das 2000-fache gesteigert wird (Freitag *et al.* 1998). Die Anti-Tumor-Effizienz des replikationskompetenten Adenovirus allein entspricht dabei der einer CD-TK-Doppel-Therapie in replikations-defizienten Viren.

4.8.4 Ausblick

Die kombinierte Verwendung von im Mechanismus unterschiedlichen, aber synergistisch wirkenden Anti-Tumor-Strategien, deutet an, dass zukünftig im klinischen Versuch vermehrt Kombinations-Therapien zur Anwendung kommen sollten. Vieles weist darauf hin, dass ein Kombinations-Ansatz, der Wirkungs-optimierte Suizidgene, Immun-Stimulantien, Bestrahlung, Replikations-kompetente, aber Tumorzellen-spezifische virale Vektoren, Anti-Angiogenese-Wirkung sowie Verbesserung der *in vivo* Transduktionseffizienz durch interzelluläre Transport-Potenzierung beinhaltet, eine schlagkräftige gentherapeutische Behandlung von Krebs darstellen wird, durch die auch residuale Mikrometastasen im Körper effektiv eliminiert werden.

Für die Krebstherapie mit Suizidgenen scheinen fortentwickelte adenovirale Vektoren geeignet zu sein, deren Lebertoxizität und Immunogenität durch selektive Deletion einzelner Gene entscheidend attenuiert worden ist (Christ *et al.* 2000; Lusky *et al.* 1999 & 1998). Da bei der Tumorthherapie das Hauptanliegen in der selektiven Eliminierung und nicht in der genetischen Korrektur der malignen Zellen besteht, erscheint der Einsatz von integrativen Vektoren wie Retroviren des murinen oder Lenti-Typs nicht sinnvoll. Deren Verwendung war ursprünglich erwogen worden, um selektiv die sich teilenden Tumorzellen, nicht aber das umliegende, ruhende Gewebe zu transduzieren. Wie inzwischen jedoch nachgewiesen wurde, zeigen humane Tumore wesentlich langsamere Teilungsraten als die

Zelllinien, an den dieses Wirkprinzip ausgetestet wurde (Vile *et al.* 2000). Der Einsatz von Retroviren ergibt somit nicht die erwünschte Transduktions-Selektivität.

Derzeit finden in der Arbeitsgruppe Somatische Lebergentherapie des Universitätsklinikums Tübingen erste Tierversuche statt, die die Eigenschaft von VP22, den interzellulären Transport zu potenzieren, in der Suizidgen-Therapie *in vivo* evaluieren. Eingesetzt wird hierbei der rekombinante adenovirale Vektor Ad-CD-VP22, der sich gegenüber der unfusionierten Version Ad-CD innerhalb der vorliegenden Arbeit im *in vitro*-Test als deutlich überlegen erwiesen hat. Grundlage ist das Lebertumor-Modell der ACI-Ratte, bei der syngene Morris Hepatom (MH)-Zellen orthotop in die Leber implantiert werden und dort zu Hepatozellulären Carcinomen (HCC) heranwachsen (Trubenbach *et al.* 2000). Das Ansprechen der Lebertumore auf die zu untersuchende Behandlungsart kann so wirklichkeitsnah simuliert werden. Darüber hinaus soll erstmals durch Antikörper-Färbung ausgetestet werden, ob sich der VP22-vermittelte *spread in vivo* als dreidimensionaler Gradient des Proteins-Transports nachweisen lässt. Sollte sich auch im Tiermodell eine Überlegenheit der VP22-vermittelten Tumorthherapie erweisen, ist eine rasche Umsetzung dieses neuartigen Wirkprinzips in Patientenstudien geboten.

5 Zusammenfassung

Die Suizidgen-Therapie von Krebserkrankungen versucht Tumorzellen, in die zuvor ein Selbstmordgen eingebracht wurde, spezifisch abzutöten, ohne das gesunde Gewebe in der Nachbarschaft in Mitleidenschaft zu ziehen. Dabei erwiesen sich die Cytosin-Desaminase (CD) aus *E. coli* und die Thymidin-Kinase (TK) aus Herpes simplex-Virus Typ-1 (HSV-1) als besonders geeignet. In verschiedenen Zellkulturstudien und Tiermodellen ließen sich Suizidgen-behandelte Tumorzellen effizient eliminieren. Beim Einsatz der gegenwärtig verfügbaren Gentherapie-Vektoren in klinischen Studien sind die erreichten Effizienzen des therapeutischen Gentransfers *in vivo* jedoch zu gering, um wirksame Mengen der übertragenen Selbstmord-Proteine zu erreichen. Zwar bewirkt der sog. *bystander effect* eine größere Verbreitung der toxifizierten Substanzen, doch reicht die bisher erzielte Wirkung nicht aus, um solide Tumore in effizienter Weise zu eliminieren.

Das Protein VP22 aus Herpes simplex-Virus Typ-1 ist auf Grund seiner Fähigkeit, Proteine aus einer Produzentenzelle in zahlreiche umgebende Nachbarzellen zu transportieren, prinzipiell in der Lage, die Zahl der Zellen, welche eine systemisch verabreichte *pro-drug* metabolisieren können, entscheidend zu vergrößern. Fusionsproteine, bestehend aus VP22 und dem zu übertragenden Enzym, können ebenfalls durch VP22-vermittelten *interzellulären* Transport sehr effizient in untransduzierte Nachbarzellen gelangen.

In den umfangreichen Zellkulturstudien der hier vorliegenden Arbeit gelang es, die an Produzentenzellen angrenzenden 12 Zellschichten bzw. bis zu 500 Nachbarzellen zu erreichen.

Ziel dieser Dissertation war es, die unzureichende Effizienz des Suizidgen-Transfers bei soliden Tumoren durch zusätzlichen interzellulären Protein-Transfer zu verbessern. Dabei sollte untersucht werden, ob der VP22-vermittelte interzelluläre Proteintransport auch eine Verbesserung der Suizidgen-Wirkung bewerkstelligen kann.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass es sich beim VP22-vermittelten interzellulären Proteintransport (*spread*) um ein allgemeingültiges biologisches Phänomen handelt, das für völlig unterschiedliche Gewebetypen und Spezies gültig ist (Wybranietz *et al.*

1999). Dazu wurde in 15 häufig verwendeten Säugerzelllinien der *spread* eines VP22-GFP-Fusionsproteins durch FACS-Analyse quantifiziert. Dieses entscheidende Ausgangsergebnis stellt die Grundlage für einen Einsatz therapeutisch wirksamer VP22-Fusionsproteine bei der Bekämpfung von Tumoren unterschiedlicher Gewebespezifität dar.

Darauf aufbauend wurde die Wirksamkeit der Potenzierung der Suizidgen-Wirkung durch VP22-Fusionsproteine überprüft. Dazu wurden zunächst amino- und carboxy-terminale Fusionen der Suizidgene CD und TK mit VP22 hergestellt und in virale Vektoren kloniert. Retrovirale Partikel wurden mit Hilfe von Verpackungszelllinien erzeugt, rekombinante Adenoviren durch homologe Rekombination in *E. coli*-Bakterien. Bereits bei der Transfektion von Expressionsplasmiden ergab sich, dass Fusionskonstrukte der Thymidin-Kinase mit VP22 in beiden Verknüpfungen exzellenten Proteintransport aufwiesen, während Cytosin-Desaminase sich nur als N-terminale Fusion interzellulär transportieren ließ. Durch Immunfluoreszenznachweis am konfokalen Laser-Mikroskop wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass VP22-vermittelter interzellulärer Proteintransport auch bei Verwendung adenoviraler Vektoren stattfindet. Da rekombinante Adenoviren bereits häufig in klinischen Versuchen zum Einsatz kamen, stellt dieses Ergebnis eine generelle Verwendung des VP22-Proteintransports in der Gentherapie in Aussicht.

Darüber hinaus konnte nicht nur der VP22-vermittelte Transport der VP22-Suizidenzym-Fusionsproteine visualisiert werden, sondern auch eine Wirkungssteigerung des Suizidgen-Effektes *in vitro* nachgewiesen werden. Dazu wurde nach Transduktion von MH3924a-Hepatoma-Zellen mit rekombinanten Adenoviren das Ausmaß des VP22-vermittelten Effektes in Cytotoxizitäts-Tests quantifiziert. Die für eine 50%-ige Abtötung von Tumorzellen notwendige Konzentration der *prodrug* 5-FC (IC_{50}) konnte bei Verwendung der CD-VP22-Fusion gegenüber der herkömmlichen CD von 2,5 mM um fast eine Log-Stufe auf 0,45 mM reduziert werden. Somit kann beim Einsatz von VP22-Fusionskonstrukten in der Suizidgentherapie die Dosis der *prodrug* 5-FC entscheidend verringert, und damit auch mögliche Nebenwirkungen stark vermindert werden.

Bei der Verwendung von HSV-1 TK als Suizidgen wurde zwar ein *spread* der VP22-Fusionsproteine nach adenoviraler Transduktion detektiert, jedoch konnte bislang keine Steigerung des cytotoxischen Effektes erreicht werden. Nach transienter Erzeugung rekombinanter Retroviren reichte insbesondere die erzielte Viruskonzentration nicht aus, um eine effiziente Genexpression in Zielzellen zu erreichen. Sollen VP22-Transportphänomene detektiert werden, müssen folglich stabile retrovirale Produzentenzellen

selektioniert werden, mit deren Hilfe höhere Virus-Titer und damit eine effizientere Transduktion erzielt werden können.

Essenziell für einen Einsatz von VP22-Fusionsproteinen in klinischen Studien ist das Ausbleiben einer Immunreaktion gegen das Transport-Protein. Durch Datenbank-Analyse und Chrom-Freisetzung-Tests wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass keine VP22-spezifische CTL-Antwort ausgelöst wird und somit keine nachteiligen inflammatorischen Effekte durch VP22 zu erwarten sind.

Basierend auf den in dieser Dissertation dargelegten Versuchsergebnissen wurden erste präklinische Studien zur *in vivo*-Effizienz der VP22-potenzierten Suizidgenwirkung initiiert. Diese Untersuchungen werden am Tiermodell der ACI-Ratte vorgenommen. Dabei können syngene MH3924a-Hepatomzellen nach orthotoper Implantation in der Leber der ACI-Ratten zu Hepatozellulären Carcinomen (HCC) auswachsen. Therapeutisches Ziel ist es, nach Transduktion der Tumorzellen mittels adenoviraler Vektoren und nachfolgender systemischer Applikation der *prodrug* 5-FC eine effiziente Eliminierung der Hepatomzellen zu bewirken. Mit diesem neuartigen Ansatz soll insbesondere die bei den bisherigen Suizidgentherapie-Versuchen unzureichende primäre Transduktionsrate der Tumore kompensiert werden.

Insgesamt konnte ein effizienter VP22-vermittelter Transport von Proteinen mit Hilfe viraler Vektoren beschrieben werden, wobei mögliche Begrenzungen hinsichtlich der Gewebespezifität oder Immunantwort ausgeschlossen wurden. Es ist anzunehmen, dass sich der Einsatz von VP22-Fusionskonstrukten nicht nur auf Anwendungen in der Suizidgentherapie beschränken wird.

Literatur

- Achacoso, P. L.; Chanda, S.; Rigg, R.; Jaeger, G. & Nolan, G. P. (1996) Phoenix: Human based amphotropic, ecotropic and pseudotypable retroviral packaging cell lines with direct cell monitoring of the moloney gag, pol and envelope proteins. URL: <http://www.stanford.edu/group/nolan/NL-phoenix.html>.
- Adachi, Y., Tamiya, T., Ichikawa, T., Terada, K., Ono, Y., Matsumoto, K., Furuta, T., Hamada, H. & Ohmoto, T. (2000) Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum. Gene Ther.* **11**, 77-89.
- Aghi, M., Kramm, C.M., Chou, T.C., Breakefield, X.O. & Chiocca, E.A. (1998) Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *J.Natl.Cancer Inst.* **90**, 370-380.
- Aiello, L., Guilfoyle, R., Huebner, K. & Weinmann, R. (1979) Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology* **94**, 460-469.
- Aints, A., Dilber, M.S. & Smith, C.I. (1999) Intercellular spread of GFP-VP22. *J.Gene Med.* **1**, 275-279.
- Andersen, L., Kilstrup, M. & Neuhard, J. (1989) Pyrimidine, purine and nitrogen control of cytosine deaminase synthesis in Escherichia coli K 12. Involvement of the glnLG and purR genes in the regulation of codA expression. *Arch.Microbiol.* **152**, 115-118.
- Anderson, W.F. (1984) Prospects for human gene therapy. *Science* **226**, 401-409.
- Anderson, W.F. (1992) Human gene therapy. *Science* **256**, 808-813.
- Anderson, W.F. (1998) Human gene therapy. *Nature* **392**, 25-30.
- Aslanidis, C. & de Jong, P. (1991) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucl.Acids Res.* **18**, 6069-6074.
- Ausubel, F.M. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.
- Barnes, W.M. (1992) The fidelity of *Taq* polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* **112**, 29-35.
- Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **91**, 2216-2220.
- Beck, C., Cayeux, S., Lupton, S.D., Dorken, B. & Blankenstein, T. (1995) The thymidine kinase/ganciclovir-mediated "suicide" effect is variable in different tumor cells. *Hum.Gene Ther.* **6**, 1525-1530.
- Bennett, J. (1994) Antifungal agents. In: Gilman, A.G., Rall, T., Nies, A.S. & Taylor, P., (Eds.) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed., pp. 1165-1181. New York: Pergamon Press.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt, J.E., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. & Finberg, R.W. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323.

Literatur

- Berkner, K.L. & Sharp, P.A. (1983) Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic.Acids.Res* **11**, 6003-6020.
- Berkner, K.L. & Sharp, P.A. (1984) Expression of dihydrofolate reductase, and of the adjacent EIb region, in an Ad5-dihydrofolate reductase recombinant virus. *Nucleic.Acids.Res* **12**, 1925-1941.
- Berkner, K.L. (1988) Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *BioTechniques* **6**, 616-629.
- Berko, F.Y., Karby, S., Hassin, D. & Lavi, S. (1990) Carcinogen-induced DNA amplification in vitro: overreplication of the simian virus 40 origin region in extracts from carcinogen-treated CO60 cells. *Mol.Cell Biol.* **10**, 75-83.
- Bett, A.J., Haddara, W., Prevec, L. & Graham, F.L. (1994) An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 8802-8806.
- Bi, W.L., Parysek, L.M., Warnick, R. & Stambrook, P.J. (1993) In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum.Gene Ther.* **4**, 725-731.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson, J.A., Fattaey, A. & McCormick, F. (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274**, 373-376.
- Black, M.E., Newcomb, T.G., Wilson, H.M. & Loeb, L.A. (1996) Creation of drug-specific herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants for gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 3525-3529.
- Boussif, O., Lezoualch, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **92**, 7297-7301.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brand, K., Arnold, W., Bartels, T., Lieber, A., Kay, M.A., Strauss, M. & Dorken, B. (1997) Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV approach and adenoviral vectors. *Cancer Gene Ther.* **4**, 9-16.
- Brewis, N., Phelan, A., Webb, J., Drew, J., Elliott, G. & O'Hare, P. (2000) Evaluation of VP22 spread in tissue culture. *J.Virol.* **74**, 1051-1056.
- Brown, D.G., Visse, R., Sandhu, G., Davies, A., Rizkallah, P.J., Melitz, C., Summers, W.C. & Sanderson, M.R. (1995) Crystal structures of the thymidine kinase from herpes simplex virus type-1 in complex with deoxythymidine and ganciclovir. *Nat.Struct.Biol.* **2**, 876-881.
- Burnette, W. N. (1981) „Western blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal.Biochem.* **112**, 195-203.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.K. (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells . *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **90**, 8033-8037.
- Cao, X., Ju, D.W., Tao, Q., Wang, J., Wan, T., Wang, B.M., Zhang, W. & Hamada, H. (1998) Adenovirus-mediated GM-CSF gene and cytosine deaminase gene transfer followed by 5-fluorocytosine administration elicit more potent antitumor response in tumor-bearing mice. *Gene Ther.* **5**, 1130-1136.
- Cao, Y.H. & Pettersson, R.F. (1990) Human acidic fibroblast growth factor overexpressed in insect cells is not secreted into the medium. *Growth Factors.* **3**, 1-13.

- Cao, Y., Ekstrom, M. & Pettersson, R.F. (1993) Characterization of the nuclear translocation of acidic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* **104**, 77-87.
- Cavazzana, C.M., Hacein, B.S., de-Saint-Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L. & Fischer, A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-672.
- Champness, J.N., Bennett, M.S., Wien, F., Visse, R., Summers, W.C., Herdewijn, P., de Clercq, E., Ostrowski, T., Jarvest, R.L. & Sanderson, M.R. (1998) Exploring the active site of herpes simplex virus type-1 thymidine kinase by X-ray crystallography of complexes with aciclovir and other ligands. *Proteins* **32**, 350-361.
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A. & Mehtali, M. (1996) Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J.Virol.* **70**, 4805-4810.
- Chattopadhyay, S. K.; Oliff, A. I.; Linemeyer, D. L.; Lander, M. R. & Lowy, D. R. (1981) Genomes of murine leukemia viruses isolated from wild mice. *J.Virol.* **39**, 777-791.
- Christ, M., Louis, B., Stoeckel, F., Dieterle, A., Grave, L., Dreyer, D., Kintz, J., Ali, H.D., Lusky, M. & Mehtali, M. (2000) Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Hum.Gene Ther.* **11**, 415-427.
- Consalvo, M., Mullen, C.A., Modesti, A., Musiani, P., Allione, A., Cavallo, F., Giovarelli, M. & Forni, G. (1995) 5-Fluorocytosine-induced eradication of murine adenocarcinomas engineered to express the cytosine deaminase suicide gene requires host immune competence and leaves an efficient memory. *J.Immunol.* **154**, 5302-5312.
- Cool, V., Pirotte, B., Gerard, C., Dargent, J.L., Baudson, N., Levivier, M., Goldman, S., Hildebrand, J., Brotchi, J. & Velu, T. (1996) Curative potential of herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer in rats with 9L gliosarcoma. *Hum.Gene Ther.* **7**, 627-635.
- Cotten, M. & Wagner, E. (1993) Non-viral approaches to gene therapy. *Curr.Opin.Biotechnol.* **4**, 705-710.
- Cowsill, C., Southgate, T.D., Morrissey, G., Dewey, R.A., Morelli, A.E., Maleniak, T.C., Forrest, Z., Klatzmann, D., Wilkinson, G.W., Lowenstein, P.R. & Castro, M.G. (2000) Central nervous system toxicity of two adenoviral vectors encoding variants of the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: reduced cytotoxicity of a truncated HSV1-TK. *Gene Ther.* **7**, 679-685.
- Crowe, J.S.; Cooper, H.S.; Smith, M.S.; Parker, D. & Gewert, D. (1991) Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion. *Nucl.Acids Res.* **19**, 184.
- Curiel, D.T. (1994) High-efficiency gene transfer employing adenovirus-polylysine-DNA complexes. *Nat.Immun.* **13**, 141-164.
- Curtis, B.M., Williams, D.E., Broxmeyer, H.E., Dunn, J., Farrah, T., Jeffery, E., Clevenger, W., deRoos, P., Martin, U., Friend, D. & *et al.* (1991) Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **88**, 5809-5813.
- Danos, O. & Mulligan, R.C. (1988) Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **85**, 6460-6464.
- Davis, B.R., Yannariello, B.J., Prokopishyn, N.L., Luo, Z., Smith, M.R., Wang, J., Carsrud, N.D. & Brown, D.B. (2000) Glass needle-mediated microinjection of macromolecules and transgenes into primary human blood stem/progenitor cells. *Blood* **95**, 437-444.
- Degreve, B., Johansson, M., De Clercq, E., Karlsson, A. & Balzarini, J. (1998) Differential intracellular compartmentalization of herpetic thymidine kinases (TKs) in TK gene-transfected tumor cells: molecular characterization of the nuclear localization signal of herpes simplex virus type 1 TK. *J.Virol.* **72**, 9535-9543.

- DeMatteo, R.P., Raper, S.E., Ahn, M., Fisher, K.J., Burke, C., Radu, A., Widera, G., Claytor, B.R., Barker, C.F. & Markmann, J.F. (1995) Gene transfer to the thymus. A means of abrogating the immune response to recombinant adenovirus. *Ann.Surg.* **222**, 229-239.
- Deonarain, M.P. & Epenetos, A.A. (1994) Targeting enzymes for cancer therapy: old enzymes in new roles. *Br.J Cancer* **70**, 786-794.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol.Chem.* **269**, 10444-10450.
- Derossi, D., Chassaing, G. & Prochiantz, A. (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends.Cell Biol.* **8**, 84-87.
- Dewey, R.A., Morrissey, G., Cowsill, C.M., Stone, D., Bolognani, F., Dodd, N.J., Southgate, T.D., Klatzmann, D., Lassmann, H., Castro, M.G. & Lowenstein, P.R. (1999) Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat.Med.* **5**, 1256-1263.
- Diasio, R.B., Lakings, D.E. & Bennett, J.E. (1978) Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in humans: possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity. *Antimicrob.Agents Chemother.* **14**, 903-908.
- Dilber, M.S., Abedi, M.R., Christensson, B., Bjorkstrand, B., Kidder, G.M., Naus, C.C., Gahrton, G. & Smith, C.I. (1997) Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res.* **57**, 1523-1528.
- Dilber, M.S., Phelan, A., Aints, A., Mohamed, A.J., Elliott, G., Edvard, S.C. & O'Hare, P. (1999) Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22. *Gene Ther.* **6**, 12-21.
- Domin, B.A., Mahony, W.B. & Zimmerman, T.P. (1993) Transport of 5-fluorouracil and uracil into human erythrocytes. *Biochem Pharmacol.* **46**, 503-510.
- Dong, Y., Wen, P., Manome, Y., Parr, M., Hirshowitz, A., Chen, L., Hirschowitz, E.A., Crystal, R., Weichselbaum, R., Kufe, D.W. & Fine, H.A. (1996) In vivo replication-deficient adenovirus vector-mediated transduction of the cytosine deaminase gene sensitizes glioma cells to 5-fluorocytosine. *Hum.Gene Ther.* **7**, 713-720.
- Edelman, G.M., Meech, R., Owens, G.C. & Jones, F.S. (2000) Synthetic promoter elements obtained by nucleotide sequence variation and selection for activity. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **97**, 3038-3043.
- Elliott, G.D. & Meredith, D.M. (1992) The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49. *J.Gen.Virol.* **73**, 723-726.
- Elliott, G., Mouzakis, G. & O'Hare, P. (1995) VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells. *J.Virol.* **69**, 7932-7941.
- Elliott, G., O'Reilly, D. & O'Hare, P. (1996) Phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22. *Virology* **226**, 140-145.
- Elliott, G. & O'Hare, P. (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**, 223-233.
- Elliott, G. & O'Hare, P. (1998) Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 induces the stabilization and hyperacetylation of microtubules. *J.Virol.* **72**, 6448-6455.
- Elliott, G. & O'Hare, P. (1999a) Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther.* **6**, 149-151.
- Elliott, G. & O'Hare, P. (1999b) Live-cell analysis of a green fluorescent protein-tagged herpes simplex virus infection. *J.Virol.* **73**, 4110-4119.

- Elliott, G. & O'Hare, P. (2000) Cytoplasm-to-nucleus translocation of a herpesvirus tegument protein during cell division. *J.Virol.* **74**, 2131-2141.
- Engelhardt, J.F., Ye, X., Doranz, B. & Wilson, J.M. (1994) Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 6196-6200.
- Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G., Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R.A., Wingfield, P. & Gallo, R.C. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J.Virol.* **67**, 277-287.
- Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., van-Ormondt, H., Hoeben, R.C. & van-der-Eb, A.J. (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum.Gene Ther.* **7**, 215-222.
- Fallaux, F.J., Bout, A., van, d.V., I, van-den-Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van-Ormondt, H., van-der-Eb, A.J., Valerio, D. & Hoeben, R.C. (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum.Gene Ther.* **9**, 1909-1917.
- Fang, B., Xu, B., Koch, P. & Roth, J.A. (1998) Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins is not observed in cultured mammalian cells. *Gene Ther.* **5**, 1420-1424.
- Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M. & Felgner, P.L. (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol.Chem.* **269**, 2550-2561.
- Fisher, K.J., Choi, H., Burda, J., Chen, S.J. & Wilson, J.M. (1996) Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* **217**, 11-22.
- Freeman, S.M., Abboud, C.N., Whartenby, K.A., Packman, C.H., Koeplin, D.S., Moolten, F.L. & Abraham, G.N. (1993) The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* **53**, 5274-5283.
- Freytag, S.O., Rogulski, K.R., Paielli, D.L., Gilbert, J.D. & Kim, J.H. (1998) A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Hum.Gene Ther.* **9**, 1323-1333.
- Fuhrer, C.; Geffen, I.; Huggel, K. & Spiess, M. (1993) The two subunits of the asialoglycoprotein receptor contain different sorting information. *J.Biol.Chem.* **269**; 3277-3282.
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F. & Trono, D. (1995) HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* **83**, 569-576.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D. & Trono, D. (1997) HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **94**, 9825-9830.
- Gaush, C. R.; Hard, W. L. & Smith, T. F. (1966) Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc.Soc.Exp.Biol. Med.* **122**, 931-935.
- Ge, K., Xu, L., Zheng, Z., Xu, D., Sun, L. & Liu, X. (1997) Transduction of cytosine deaminase gene makes rat glioma cells highly sensitive to 5-fluorocytosine. *Int.J.Cancer* **71** , 675-679.
- Ghosh, C.G., Haj, A.Y., Brinkley, P., Rudy, J. & Graham, F.L. (1986) Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. *Gene* **50**, 161-171.
- Glasel, J.A. (1995) Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* **18**, 62-63.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.

- Golumbek, P.T., Hamzeh, F.M., Jaffee, E.M., Levitsky, H., Lietman, P.S. & Pardoll, D.M. (1992) Herpes simplex-1 virus thymidine kinase gene is unable to completely eliminate live, nonimmunogenic tumor cell vaccines. *J.Immunother.* **12**, 224-230.
- Graham, F.L. (1984) Covalently closed circles of human adenovirus DNA are infectious. *EMBO J.* **3**, 2917-2922.
- Graham, F. & Van der Eb, A. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus. *Virology* **52**, 456-467.
- Graham, F.L., Abrahams, P.J., Mulder, C., Heijneker, H.L., Warnaar, S.O., De Vries, F.A., Fiers, W. & van der Eb, A.J. (1974) Studies on in vitro transformation by DNA and DNA fragments of human adenoviruses and simian virus 40. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **39 Pt 1**, 637-650.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* **36**, 59-74.
- Graham, F.L. & Prevec, L. (1995) Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol.Biotechnol.* **3**, 207-220.
- Griffon, G., Merlin, J.L. & Marchal, C. (1995) Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for in vitro radiosensitivity testing in human ovarian cell lines. *Anticancer Drugs* **6**, 115-123.
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G.P. & Pelicci, P.G. (1998) High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* **58**, 14-19.
- Groß, C.D. (2000) Herstellung rekombinanter Adenoviren zum Transfer des Suizidgens Cytosin-Desaminase in hepatozelluläre Karzinome. *Dissertation*, Universität Hohenheim, Fachbereich Biologie.
- Grossman, M., Raper, S.E., Kozarsky, K., Stein, E.A., Engelhardt, J.F., Muller, D., Lupien, P.J. & Wilson, J.M. (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat.Genet.* **6**, 335-341.
- Haj, A.Y. & Graham, F.L. (1986) Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *J.Virol.* **57**, 267-274.
- Hall, A.R., Dix, B.R., O'Carroll, S.J. & Braithwaite, A.W. (1998) p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat.Med* **4**, 1068-1072.
- Hamstra, D.A., Rice, D.J., Fahmy, S., Ross, B.D. & Rehemtulla, A. (1999) Enzyme/prodrug therapy for head and neck cancer using a catalytically superior cytosine deaminase. *Hum.Gene Ther.* **10**, 1993-2003.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Harada, J.N. & Berk, A.J. (1999) p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J.Virol.* **73**, 5333-5344.
- Harding, T.C., Geddes, B.J., Murphy, D., Knight, D. & Uney, J.B. (1998) Switching transgene expression in the brain using an adenoviral tetracycline-regulatable system *Nat.Biotechnol.* **16**, 553-555.
- Harms, J.S., Ren, X., Oliveira, S.C. & Splitter, G.A. (2000) Distinctions between bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus type 1 VP22 tegument protein subcellular associations. *J.Virol.* **74**, 3301-3312.
- Hay, J.G., Shapiro, N., Sauthoff, H., Heitner, S., Phupakdi, W. & Rom, W.N. (1999) Targeting the replication of adenoviral gene therapy vectors to lung cancer cells: the importance of the adenoviral E1b-55kD gene. *Hum.Gene Ther.* **10**, 579-590.
- He, T.C., Zhou, S., da-Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **95**, 2509-2514.

- Heise, C., Sampson, J.A., Williams, A., McCormick, F., Von-Hoff, D.D. & Kirn, D.H. (1997) ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat.Med.* **3**, 639-645.
- Helland, D.E., Welles, J.L., Caputo, A. & Haseltine, W.A. (1991) Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 tat protein. *J.Virol.* **65**, 4547-4549.
- Heller, L., Jaroszeski, M.J., Coppola, D., Pottinger, C., Gilbert, R. & Heller, R. (2000) Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo. *Gene Ther.* **7**, 826-829.
- Hildt, E. & Oess, S. (1999) Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor I. *J.Exp.Med.* **189**, 1707-1714.
- Hinnisdaels, S.; Del-Favero, J. & Vauterin, M. (1996) Direct cloning of PCR products amplified with *Pwo* DNA polymerase. *BioTechniques* **20**, 186-188.
- Hirschowitz, E.A., Ohwada, A., Pascal, W.R., Russi, T.J. & Crystal, R.G. (1995) In vivo adenovirus-mediated gene transfer of the Escherichia coli cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-fluorocytosine. *Hum.Gene Ther.* **6**, 1055-1063.
- Hitt, M.; Bett, A.; Addison, C.; Prevec, L. & Graham, F. (1995) Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. *Method.Mol. Genet.* **7**, 13-30.
- Hofmann, C., Loser, P., Cichon, G., Arnold, W., Both, G.W. & Strauss, M. (1999) Ovine adenovirus vectors overcome preexisting humoral immunity against human adenoviruses in vivo. *J.Virol.* **73**, 6930-6936.
- Hoganson, D.K., Batra, R.K., Olsen, J.C. & Boucher, R.C. (1996) Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* **56**, 1315-1323.
- Huard, J., Lochmuller, H., Acsadi, G., Jani, A., Massie, B. & Karpati, G. (1995) The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther.* **2**, 107-115.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Good, S.S., Knick, V.C., Tibbels, S. & Richards, C.A. (1993) In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res.* **53**, 4619-4626.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Richards, C.A., Davis, S.T. & Good, S.S. (1994) Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 8302-8306.
- Human Gene Therapy Editor (2000) Human Gene Marker/Therapy Clinical Protocols (Complete Updated Listings). *Hum.Gene Ther.* **11**, 1745-1811.
- Ilan, Y., Sauter, B., Chowdhury, N.R., Reddy, B.V., Thummala, N.R., Droguett, G., Davidson, A., Ott, M., Horwitz, M.S. & Chowdhury, J.R. (1998) Oral tolerization to adenoviral proteins permits repeated adenovirus-mediated gene therapy in rats with pre-existing immunity to adenoviruses. *Hepatology* **27**, 1368-1376.
- Izquierdo, M., Martin, V., de Felipe, P., Izquierdo, J.M., Perez, H.A., Cortes, M.L., Paz, J.F., Isla, A. & Blazquez, M.G. (1996) Human malignant brain tumor response to herpes simplex thymidine kinase (HSVtk)/ganciclovir gene therapy. *Gene Ther.* **3**, 491-495.
- Jackson, A., Friedman, S., Zhan, X., Engleka, K.A., Forough, R. & Maciag, T. (1992) Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **89**, 10691-10695.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. & Todaro, G.J. (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J.Virol.* **4**, 549-553.

- Jensen, F. C.; Girardi, A. J.; Gilden, R. V. & Koprowski, H. (1964) Infection of human and simian tissue cultures with Rous sarcoma virus. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **52**, 53-59.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini, B.H. & Prochiantz, A. (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **88**, 1864-1868.
- Jones, N. & Shenk, T. (1979) Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* **17**, 683-689.
- Ju, D.W., Tao, Q., Cheng, D.S., Zhang, W., Zhang, M., Hamada, H. & Cao, X. (2000) Adenovirus-mediated lymphotactin gene transfer improves therapeutic efficacy of cytosine deaminase suicide gene therapy in established murine colon carcinoma. *Gene Ther.* **7**, 329-338.
- Kanai, F., Lan, K.H., Shiratori, Y., Tanaka, T., Ohashi, M., Okudaira, T., Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Nakabayashi, H., Tamaoki, T. & Omata, M. (1997) In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer Res.* **57**, 461-465.
- Kass, E.A., Leinwand, L., Gall, J., Bloom, B. & Falck, P.E. (1996) Circumventing the immune response to adenovirus-mediated gene therapy. *Gene Ther.* **3**, 154-162.
- Kay, M.A., Landen, C.N., Rothenberg, S.R., Taylor, L.A., Leland, F., Wiehle, S., Fang, B., Bellinger, D., Finegold, M., Thompson, A.R. & *et al.* (1994) In vivo hepatic gene therapy: complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 2353-2357.
- Kay, M.A., Meuse, L., Gown, A.M., Linsley, P., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Ochs, H.D. & Wilson, C.B. (1997) Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody and CTLA4Ig enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 4686-4691.
- Kay, M.A., Manno, C.S., Ragni, M.V., Larson, P.J., Couto, L.B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A.J., Tai, S.J., Herzog, R.W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A.W. & High, K.A. (2000) Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat.Genet.* **24**, 257-261.
- Keepers, Y.P., Pizao, P.E., Peters, G.J., van-Ark-Otte, J., Winograd, B. & Pinedo, H.M. (1991) Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur.J.Cancer* **27**, 897-900.
- Kirn, D.H. (2000) A phase II trial of intratumoral injection with a selectively replicating adenovirus (ONYX-015) in patients with recurrent, refractory squamous cell carcinoma of the head and neck. *Gene Ther. Cancer Methods Protocols.* **35**, 559-574.
- Klatzmann, D., Valery, C.A., Bensimon, G., Marro, B., Boyer, O., Mokhtari, K., Diquet, B., Salzmann, J.L. & Philippon, J. (1998) A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum.Gene Ther.* **9**, 2595-2604.
- Kmiec, E.B. (1999) Targeted gene repair. *Gene Ther.* **6**, 1-3.
- Knowles, B. B.; Howe, C. C. & Aden, D. P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**, 497-498.
- Knowles, M.R., Hohneker, K.W., Zhou, Z., Olsen, J.C., Noah, T.L., Hu, P.C., Leigh, M.W., Engelhardt, J.F., Edwards, L.J., Jones, K.R. & *et al.* (1995) A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N.Engl.J.Med.* **333**, 823-831.
- Kochanek, S., Clemens, P.R., Mitani, K., Chen, H.H., Chan, S. & Caskey, C.T. (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 5731-5736.

- Kokoris, M.S., Sabo, P., Adman, E.T. & Black, M.E. (1999) Enhancement of tumor ablation by a selected HSV-1 thymidine kinase mutant. *Gene Ther.* **6**, 1415-1426.
- Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- Kren, B.T., Bandyopadhyay, P. & Steer, C.J. (1998) In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat.Med.* **4**, 285-290.
- Kren, B.T., Metz, R., Kumar, R. & Steer, C.J. (1999) Gene repair using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Semin.Liver Dis.* **19**, 93-104.
- Kren, B.T., Parashar, B., Bandyopadhyay, P., Chowdhury, N.R., Chowdhury, J.R. & Steer, C.J. (1999) Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the gunn rat model of crigler-najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **96**, 10349-10354.
- Kuchler, K. & Thorner, J. (1990) Membrane translocation of proteins without hydrophobic signal peptides. *Curr.Opin.Cell Biol.* **2**, 617-624.
- Kueltzo, L. A., O'Hare, P., & Mohamed, A. J. Conformational lability of herpes virus protein VP22 (2000) *J.Biol.Chem.* epub ahead of print, 25-7-2000.
- Kuriyama, S., Kikukawa, M., Masui, K., Okuda, H., Nakatani, T., Sakamoto, T., Yoshiji, H., Fukui, H., Ikenaka, K., Mullen, C.A. & Tsujii, T. (1999) Cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy can induce efficient anti-tumor effects and protective immunity in immunocompetent mice but not in athymic nude mice. *Int.J.Cancer* **81**, 592-597.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lal, I., Lauer, U.M., Niethammer, I., Beck, J.F. & Schlegel, P.G. (2000) Suicide genes: past, present and future perspectives. *Immunol.Today* **21**, 48-54.
- Lauer, U., Spiegel, M., Bitzer, M., Wybranietz, W.A., Gross, C.D., Prinz, F., Graham, F.L., Neubert, W.J. & Gregor, M. (1998) New strategies for the genetic therapy of primary liver carcinoma. *Min.Invas.Ther.Allied Technol.* **7**, 567-571.
- Lawrence, T.S., Rehemtulla, A., Ng, E.Y., Wilson, M., Trosko, J.E. & Stetson, P.L. (1998) Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-fluorocytosine. *Cancer Res.* **58**, 2588-2593.
- Lee, G. & Brandt, R. Microtubule-bundling studies revisited: is there a role for MAPs. (1992) *Trends Cell Biol.* **2**, 286-289..
- Leslie, J., Rixon, F.J. & McLauchlan, J. (1996) Overexpression of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 increases its incorporation into virus particles. *Virology* **220**, 60-68.
- Li, X., Eastman, E.M., Schwartz, R.J. & Draghia, A.R. (1999) Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat.Biotechnol.* **17**, 241-245.
- Loubiere, L., Tiraby, M., Cazaux, C., Brisson, E., Grisoni, M., Zhao, E.J., Tiraby, G. & Klatzmann, D. (1999) The equine herpes virus 4 thymidine kinase is a better suicide gene than the human herpes virus 1 thymidine kinase. *Gene Ther.* **6**, 1638-1642.
- Louis, N., Eveleigh, C. & Graham, F.L. (1997) Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* **233**, 423-429.
- Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mourot, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A. & Mehtali, M. (1998) In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J.Virol.* **72**, 2022-2032.

Literatur

- Lusky, M., Grave, L., Dieterle, A., Dreyer, D., Christ, M., Ziller, C., Furstenberger, P., Kintz, J., Hadji, D.A., Pavirani, A. & Mehtali, M. (1999) Regulation of adenovirus-mediated transgene expression by the viral E4 gene products: requirement for E4 ORF3. *J.Virol.* **73**, 8308-8319.
- Mann, D.A. & Frankel, A.D. (1991) Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.* **10**, 1733-1739.
- Marshall, E. (2000) Gene Therapy on Trial. *Science* **288**, 951-957.
- McGrory, W.J., Bautista, D.S. & Graham, F.L. (1988) A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* **163**, 614-617.
- McKnight, S.L. (1980) The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Nucleic Acids Res.* **8**, 5949-5964.
- Michou, A.I., Santoro, L., Christ, M., Julliard, V., Pavirani, A. & Mehtali, M. (1997) Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther.* **4**, 473-482.
- Miller, A. D. & Buttimore, C. (1986) Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol.Cell.Biol.* **6**, 2895-2902.
- Miller, A.D. & Rosman, G.J. (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* **7**, 980-6,989.
- Miller, A. D.; Miller, D. G.; Garcia, J. V. & Lynch, C. L. (1993) Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.* **217**, 581-599.
- Mitani, K., Graham, F.L., Caskey, C.T. & Kochanek, S. (1995) Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 3854-3858.
- Mizuguchi, H. & Kay, M.A. (1998) Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum.Gene Ther.* **9**, 2577-2583.
- Molinier, F., V. Gahery, S.H., Mehtali, M., Le-Boulaire, C., Ribault, S., Boulanger, P., Tursz, T., Guillet, J.G. & Farace, F. (2000) Immune response to recombinant adenovirus in humans: capsid components from viral input are targets for vector-specific cytotoxic T lymphocytes. *J.Virol.* **74**, 7678-7682.
- Moolten, F.L. (1994) Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* **1**, 279-287.
- Morgenstern, J.P. & Land, H. (1990) Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids.Res* **18**, 3587-3596.
- Morrall, N., O'Neal, W., Rice, K., Leland, M., Kaplan, J., Piedra, P.A., Zhou, H., Parks, R.J., Velji, R., Aguilar, C.E., Wadsworth, S., Graham, F.L., Kochanek, S., Carey, K.D. & Beaudet, A.L. (1999) Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **96**, 12816-12821.
- Morris, H. (1963) Some growth, morphological, and biochemical characteristics of hepatoma 5123 and other new transplantable hepatomas. *Prog.Exp.Tumor Res.* **3**, 370-411.
- Morrison, E.E., Stevenson, A.J., Wang, Y.F. & Meredith, D.M. (1998) Differences in the intracellular localization and fate of herpes simplex virus tegument proteins early in the infection of Vero cells. *J.Gen.Virol.* **79**, 2517-2528.
- Muesch, A., Hartmann, E., Rohde, K., Rubartelli, A., Sitia, R. & Rapoport, T.A. (1990) A novel pathway for secretory proteins? *Trends Biochem.Sci.* **15**, 86-88.

- Mullen, C.A., Kilstrup, M. & Blaese, R.M. (1992) Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A* **89**, 33-37.
- Mullen, C.A., Coale, M.M., Lowe, R. & Blaese, R.M. (1994) Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor. *Cancer Res.* **54**, 1503-1506.
- Mullen, C.A., Anderson, L., Woods, K., Nishino, M. & Petropoulos, D. (1998) Ganciclovir chemoablation of herpes thymidine kinase suicide gene-modified tumors produces tumor necrosis and induces systemic immune responses. *Hum.Gene Ther.* **9**, 2019-2030.
- Mulligan, R.C. (1993) The basic science of gene therapy. *Science* **260**, 926-932.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. & Trono, D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-267.
- Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T. & Sato, J. (1982) Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**, 3858-3863.
- Nanni, P., De Giovanni, C., Nicoletti, G., Landuzzi, L., Rossi, I., Frabetti, F., Giovarelli, M., Forni, G., Cavallo, F., Di Carlo, E., Musiani, P. & Lollini, P.L. (1998) The immune response elicited by mammary adenocarcinoma cells transduced with interferon-gamma and cytosine deaminase genes cures lung metastases by parental cells. *Hum.Gene Ther.* **9**, 217-224.
- Oess, S. & Hildt, E. (2000) Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther.* **7**, 750-758.
- Ohwada, A., Hirschowitz, E.A. & Crystal, R.G. (1996) Regional delivery of an adenovirus vector containing the Escherichia coli cytosine deaminase gene to provide local activation of 5-fluorocytosine to suppress the growth of colon carcinoma metastatic to liver. *Hum.Gene Ther.* **7**, 1567-1576.
- Parks, R.J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M.A. & Graham, F.L. (1996) A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A* **93**, 13565-13570.
- Perez, R.P., Godwin, A.K., Handel, L.M. & Hamilton, T.C. (1993) A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur.J.Cancer* **29A**, 395-399.
- Phelan, A., Elliott, G. & O'Hare, P. (1998) Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat.Biotechnol.* **16**, 440-443.
- Phillips, S.C. (1995) Receptor-mediated DNA delivery approaches to human gene therapy. *Biologicals.* **23**, 13-16.
- Pines, J. & Hunter, T. (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J.Cell Biol.* **115**, 1-17.
- Pomeranz, L.E. & Blaho, J.A. (1999) Modified VP22 localizes to the cell nucleus during synchronized herpes simplex virus type 1 infection. *J.Virol.* **73**, 6769-6781.
- Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M. & Langel, U. (1998) Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **12**, 67-77.
- Pooga, M., Soomets, U., Hallbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J.X., Xu, X.J., Wiesenfeld, H.Z., Hokfelt, T., Bartfai, T. & Langel, U. (1998) Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat.Biotechnol.* **16**, 857-861.

Literatur

- Qiao, J., Black, M.E. & Caruso, M. (2000) Enhanced ganciclovir killing and bystander effect of human tumor cells transduced with a retroviral vector carrying a herpes simplex virus thymidine kinase gene mutant. *Hum.Gene Ther.* **11**, 1569-1576.
- Ram, Z., Culver, K.W., Oshiro, E.M., Viola, J.J., DeVroom, H.L., Otto, E., Long, Z., Chiang, Y., McGarrity, G.J., Muul, L.M., Katz, D., Blaese, R.M. & Oldfield, E.H. (1997) Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat.Med.* **3**, 1354-1361.
- Ramesh, R., Munshi, A., Abboud, C.N., Marrogi, A.J. & Freeman, S.M. (1996) Expression of costimulatory molecules: B7 and ICAM up-regulation after treatment with a suicide gene. *Cancer Gene Ther.* **3**, 373-384.
- Richards, C.A., Austin, E.A. & Huber, B.E. (1995) Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen: identification and use with cytosine deaminase for tumor-specific gene therapy. *Hum.Gene Ther.* **6**, 881-893.
- Rogers, R.P., Ge, J.Q., Holley, G.E., Hoganson, D.K., Comstock, K.E., Olsen, J.C. & Kenney, S. (1996) Killing Epstein-Barr virus-positive B lymphocytes by gene therapy: comparing the efficacy of cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase. *Hum.Gene Ther.* **7**, 2235-2245.
- Rogulski, K.R., Kim, J.H., Kim, S.H. & Freytag, S.O. (1997) Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum.Gene Ther.* **8**, 73-85.
- Rogulski, K.R., Wing, M.S., Paielli, D.L., Gilbert, J.D., Kim, J.H. & Freytag, S.O. (2000) Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization. *Hum.Gene Ther.* **11**, 67-76.
- Rojas, M., Donahue, J.P., Tan, Z. & Lin, Y.Z. (1998) Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability. *Nat.Biotechnol.* **16**, 370-375.
- Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D.A., Monks, A. & Boyd, M.R. (1990) Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J.Natl.Cancer Inst.* **82**, 1113-1118.
- Saher, G. & Hildt, E. (1999) Activation of c-Raf-1 kinase signal transduction pathway in alpha(7) integrin-deficient mice. *J.Biol.Chem.* **274**, 27651-27657.
- Salomon, B., Maury, S., Loubiere, L., Caruso, M., Onclercq, R. & Klatzmann, D. (1995) A truncated herpes simplex virus thymidine kinase phosphorylates thymidine and nucleoside analogs and does not cause sterility in transgenic mice. *Mol.Cell Biol.* **15**, 5322-5328.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sandig, V., Youil, R., Bett, A.J., Franlin, L.L., Oshima, M., Maione, D., Wang, F., Metzker, M.L., Savino, R. & Caskey, C.T. (2000) Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **97**, 1002-1007.
- Sanger, F. & Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J.Mol.Biol.* **94**, 441-448.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **74**, 5463-5467.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S.C., Langston, C., Graham, F.L., Beaudet, A.L. & Kochanek, S. (1998) Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat.Genet.* **18**, 180-183.
- Schutze, R.M., Gournier, H., Garcia, P.F., Moussa, M., Joliot, A.H., Volovitch, M., Prochiantz, A. & Lemonnier, F.A. (1996) Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and

- presentation pathway by *Drosophila antennapedia* homeodomain primes cytotoxic T cells in vivo. *J.Immunol.* **157**, 650-655.
- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero, A.A. & Dowdy, S.F. (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**, 1569-1572.
- Service, R. F. (2000) Chemical tags speeds delivery into cells. *Science* **288**, 28-29.
- Shand, N., Weber, F., Mariani, L., Bernstein, M., Gianella, B.A., Long, Z., Sorensen, A.G. & Barbier, N. (1999) A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Hum.Gene Ther.* **10**, 2325-2335.
- Shuldiner, A.R.; Scott, L.A. & Roth, J. (1990) PCR-induced (ligase-free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1920.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. & Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J.Natl.Cancer Inst.* **82**, 1107-1112.
- Song, W., Kong, H.L., Traktman, P. & Crystal, R.G. (1997) Cytotoxic T lymphocyte responses to proteins encoded by heterologous transgenes transferred in vivo by adenoviral vectors. *Hum.Gene Ther.* **8**, 1207-1217.
- Spiegel, M., Bitzer, M., Schenk, A., Rossmann, H., Neubert, W.J., Seidler, U., Gregor, M. & Lauer, U. (1998) Pseudotype formation of Moloney murine leukemia virus with Sendai virus glycoprotein F. *J.Virol.* **72**, 5296-5302.
- Spiegel, M. (2000) Etablierung und Charakterisierung eines pseudotypisierten retroviralen Gentransfer-Systems mit Selektivität für den Hepatocyten-spezifisch exprimierten Asialoglycoprotein-Rezeptor. *Dissertation*, Universität Tübingen, Fachbereich Chemie und Pharmazie.
- Stackhouse, M.A., Pederson, L.C., Grizzle, W.E., Curiel, D.T., Gebert, J., Haack, K., Vickers, S.M., Mayo, M.S. & Buchsbaum, D.J. (2000) Fractionated radiation therapy in combination with adenoviral delivery of the cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine enhances cytotoxic and antitumor effects in human colorectal and cholangiocarcinoma models. *Gene Ther.* **7**, 1019-1026.
- Sterman, D.H., Treat, J., Litzky, L.A., Amin, K.M., Coonrod, L., Molnar, K.K., Recio, A., Knox, L., Wilson, J.M., Albelda, S.M. & Kaiser, L.R. (1998) Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum.Gene Ther.* **9**, 1083-1092.
- Takamiya, Y., Short, M.P., Moolten, F.L., Fleet, C., Mineta, T., Breakefield, X.O. & Martuza, R.L. (1993) An experimental model of retrovirus gene therapy for malignant brain tumors. *J.Neurosurg.* **79**, 104-110.
- Tang, M.X., Redemann, C.T. & Szoka-FC, J. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug.Chem.* **7**, 703-714.
- Topf, N., Worgall, S., Hackett, N.R. & Crystal, R.G. (1998) Regional 'pro-drug' gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther.* **5**, 507-513.
- Towbin, H. & Gordon, J. (1984) Immunoblotting and dot immunoblotting. *J.Immunol. Methods* **72**,: 313-340.
- Trapnell, B. (1993) Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv.Drug Deliver.Rev.* **12**, 185-199.
- Trinh, Q.T., Austin, E.A., Murray, D.M., Knick, V.C. & Huber, B.E. (1995) Enzyme/prodrug gene therapy: comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosine versus thymidine kinase/ganciclovir enzyme/prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Res.* **55**, 4808-4812.

- Trubenbach, J., Graepler, F., Pereira, P.L., Ruck, P., Lauer, U., Gregor, M., Claussen, C.D. & Huppert, P.E. (2000) Growth characteristics and imaging properties of the morris hepatoma 3924A in ACI rats: a suitable model for transarterial chemoembolization. *Cardiovasc.Intervent.Radiol.* **23**, 211-217.
- Uckert, W., Kammertons, T., Haack, K., Qin, Z., Gebert, J., Schendel, D.J. & Blankenstein, T. (1998) Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells in vivo. *Hum.Gene Ther.* **9**, 855-865.
- Verma, I.M. & Somia, N. (1997) Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239-242.
- Vile, R.G., Russell, S.J. & Lemoine, N.R. (2000) Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther.* **7**, 2-8.
- Vives, E., Brodin, P. & Lebleu, B. (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J.Biol.Chem.* **272**, 16010-16017.
- Wagner, M.J., Sharp, J.A. & Summers, W.C. (1981) Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **78**, 1441-1445.
- Warburg, O. & Christian, W. (1942) Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* **310**, 384-421.
- Wigler, M.; Pellicer, A.; Silverstein, S.; Axel, R.; Urlaub, G. & Chasin, L. (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc.Natl.Acad. Sci. U S A* **76**: 1373-1376.
- Wybraniec, W.A. (1996) RAMTB-Selektions-Assay zur Generierung leberspezifischer Expressionskassetten für die humane *in vivo* Genterapie. Diplomarbeit, Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- Wybraniec, W.A. & Lauer, U. (1998) Distinct combination of purification methods dramatically improves cohesive-end subcloning of PCR products. *BioTechniques* **24**, 578-580.
- Wybraniec, W.A., Prinz, F., Spiegel, M., Schenk, A., Bitzer, M., Gregor, M. & Lauer, U.M. (1999) Quantification of VP22-GFP spread by direct fluorescence in 15 commonly used cell lines. *J.Gene Med.* **1**, 265-274.
- Yang, N.S. & Sun, W.H. (1995) Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nat.Med.* **1**, 481-483.
- Yang, S., Delgado, R., King, S.R., Woffendin, C., Barker, C.S., Yang, Z.Y., Xu, L., Nolan, G.P. & Nabel, G.J. (1999) Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection. *Hum.Gene Ther.* **10**, 123-132.
- Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E. & Wilson, J.M. (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 4407-4411.
- Yang, Y., Greenough, K. & Wilson, J.M. (1996) Transient immune blockade prevents formation of neutralizing antibody to recombinant adenovirus and allows repeated gene transfer to mouse liver. *Gene Ther.* **3**, 412-420.
- Zeng, M. & Lapeyre, J.N. (1996) PCR-TIES (third irrelevant enzyme site)-mediated gene fusion method. *BioTechniques* **20**, 56-8,60.
- Zhang, L., Wikenheiser, K.A. & Whitsett, J.A. (1997) Limitations of retrovirus-mediated HSV-tk gene transfer to pulmonary adenocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Hum.Gene Ther.* **8**, 563-574.
- Zhang, W.W., Koch, P.E. & Roth, J.A. (1995) Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *BioTechniques* **18**, 444-447.

Anhang

Liste der verwendeten Abkürzungen

aa	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Ad	Adenovirus
ADA	Adenosindesaminase-Defizienz
Amp	Ampicillin
Amp^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumper(oxodi)sulfat
ASGP-R	Asialoglycoprotein-Rezeptor
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
β-Gal	β-Galactosidase
BGL	β-Globin
BGH	Rinderwachstumshormon (<i>bovine growth hormone</i>)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder-Serum-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	Cytosin-Desaminase
cfu	<i>colony forming units</i>
CI	Chloroform/Isoamylalkohol
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)
CMV	Cytomegalie-Virus
CMV-ep	Epitop aus (humanem) Cytomegalie-Virus
CPE	Cytopathischer Effekt
CTL	Cytotoxischer T-Lymphocyt
CTLs	Cytotoxische T-Lymphocyten
DEAE	Diethylaminoethyl
DKFZ	Deutsches Krebs-Forschungs-Zentrum (in Heidelberg)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP(s)	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat(e)
ds	<i>double-stranded</i>
DTT	Dithiothreitol
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
ECACC	<i>European Collection of Animal Cell Cultures</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure (ethylene dinitrilo tetraacetic acid)

Anhang

EGTA	Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i> (in Heidelberg)
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
GCV	Gancyclovir
5-FC	5-Fluor-Cytosin
5-FU	5-Fluor-Uracil
FH	familiäre Hypercholesterinämie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
F-Protein	Fusionsprotein des SeV
G418	Geneticin (ein Neomycin-Analagon)
GCV	Gancyclovir
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
hAAT	humanes α 1-Antitrypsin
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (<i>HEPES buffered saline</i>)
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Carzinom (<i>hepatocellular carcinoma</i>)
hCMV	humaner Cytomegalie Virus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HNF	leberspezifischer Transkriptionsfaktor (<i>hepatocyte nuclear factor</i>)
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSV	Herpes simplex-Virus
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resource
IgG	Immunglobulin G
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
Kana	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
K-MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Kaliumsalz
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M199	Medium 199
MCRI	<i>Marie Curie Research Institute</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MH	Morris Hepatom (-Zellen)
MHBs	mittleres Hüllprotein des Hepatitis B-Virus
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MoMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MoMSV	<i>Moloney Murine Sarcoma Virus</i>
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid)
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acids</i>)
NGF	<i>nerve growth factor</i>

nls	<i>nuclear localisation signal</i>
Neo^(r)	Neomycin(-Resistenz)
OD	optische Dichte
ORI	Replikations-Ursprung (<i>origin of replication</i>)
OTC	Ornithin-Transcarbamoylase
PA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
P/C-Extraktion	Phenol/Chloroform-Extraktion
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase -Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pfu	<i>plaque forming units</i>
PNA	<i>peptide nucleic acids</i>
PRPP	5-Phospho-ribosyl-1-pyrophosphat
PTD	<i>protein transduction domain</i>
RAMTB	<i>Randomly coupled Multimeric Transcription factor binding site</i>
RCA	<i>replication competent adenovirus</i>
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RSV	Rous Sarkom-Virus
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAP	alkalische Phosphatase aus Tiefsee-Garnelen (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SRB	Sulforhodamin B
ss	<i>single-stranded</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA (... <i>acetic acid</i> ...)
TBE	Tris/Borsäure/EDTA (... <i>boric acid</i> ...)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TCA	Trichloressigsäure (trichloro acetic acid)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle
TK	Thymidin-Kinase
TLM	<i>translocation motif</i>
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i>
ÜNK	Übernachtskultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPRT	Uracil-Phospho-ribosyl-Transferase
vs	<i>versus</i>
Vol.	Volumeneinheit(en)
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
wt	Wildtyp (<i>wildtype</i>)
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl β -D galactose (eigentlich: - galactopyranosid)

Firmenverzeichnis

Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Air Liquide-D.M.C.	Marne-la-Vallée, Frankreich
Bachofer Laboratoriumsgeräte	Reutlingen, Deutschland
Beckman Instrumente GmbH	München, Deutschland
Becton Dickinson and Company	Oxnard CA, USA
Bio 101 Inc.	Carlsbad CA, USA
Biochrom KG	Berlin, Deutschland
Biomol Feinchemikalien GmbH	Hamburg, Deutschland
BioRad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Biozym Diagnostic GmbH	Hess. Oldendorf, Deutschland
B. Braun AG	Melsungen, Deutschland
Capricorn Products Inc.	Scarborough ME, USA
Clean Air	Woerden, Niederlande
Clontech Laboratories GmbH	Heidelberg, Deutschland
Costar GmbH	Bodenheim, Deutschland
DuPont GmbH	Dreieich, Deutschland
Dynatech Deutschland GmbH	Denkendorf, Deutschland
Eurogentec GmbH	Seraing, Belgien
Epicentre Technologies	Madison WI, USA
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH	Hamburg, Deutschland
Fedegari Autoclavi SPA	Albuzzano PV, Italien
Fluka Feinchemikalien GmbH	Neu-Ulm, Deutschland
FMC BioProducts	Rockland ME, USA
Forma Scientific, Division of Mallinckrodt Inc.	Marietta OH, USA
Fresenius AG	Bad Homburg, Deutschland
GENTERprise GmbH	Mainz, Deutschland
Greiner Labortechnik GmbH	Nürtingen, Deutschland
Genetic Therapy Inc. (GTI)	Boston MA, USA
Heraeus GmbH	Hanau, Deutschland
Invitrogen	Groningen, Niederlande
Kodak GmbH	Stuttgart, Deutschland
Life Technologies GmbH	Eggenstein, Deutschland
E. Merck	Darmstadt, Deutschland
Millipore GmbH	Eschborn, Deutschland
Molecular Probes	Eugene OR, USA
Nalge Nunc-International GmbH & Co. KG	Wiesbaden, Deutschland
New Brunswick Scientific	Edison NJ, USA
New England Biolabs	Schwalbach/Taunus, Deutschland
Olympus Optical Co. (Europa) GmbH	Hamburg, Deutschland
Owl Scientific Inc.	Woburn MA, USA
Perkin-ElmerApplied Biosystems GmbH	Weiterstadt, Deutschland
Pharmacia Biotech Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
Polaroid Corporation	Cambridge MA, USA
Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
Replicon GmbH	Berlin, Deutschland
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
(Carl) Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Heidelberg, Deutschland
Schleicher & Schüll GmbH	Dassel, Deutschland
SeqLab GmbH	Göttingen, Deutschland
Serva Feinbiochemica	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deisenhofen, Deutschland
Stratagene GmbH	Heidelberg, Deutschland
Vector Laboratories Inc.	Burlingame CA, USA

Verwendete Primer

- „VP22-for-Eco“: (27-mer)

```
GGGAATTCAGCCCAAGCTCAAAAGATC
1 -----+-----+----- 27
```

- „49ep-rev-Bcl“: (28-mer)

```
GGGTGATCAATCTCTAGCCGCCGGTGAC
1 -----+-----+----- 28
```

- „Bam-CD-for2“: (29-mer)

```
GGGATCCCATGTTCGAATAACGCTTTACAA
1 -----+-----+----- 29
```

- „TK-5end-rev“: (20-mer)

```
ACTTCCGTGGCTTCTTGCTG
1 -----+-----+ 20
```

- „49ep-rev-Xba“: (28-mer)

```
GGGTCTAGAATCTCTAGCCGCCGGTGAC
1 -----+-----+----- 28
```

- „CMV-for2“: (20-mer)

```
GTAGGCGTGACGGTGGGAG
1 -----+-----+ 20
```

- „22-Not-rev“: (32-mer)

```
CCGCGGCCGCTTCACTCGACGGGCCGTCTGGG
1 -----+-----+-----+--- 32
```

- „E1A-1“: (20-mer)

```
ATTACCGAAGAAATGGCCGC
1 -----+-----+ 20
```

- „E1A-2“: (20-mer)

```
CCCATTTAACACGCCATGCA
1 -----+-----+ 20
```

- „E2B-1“: (20-mer)

```
TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG
1 -----+-----+ 20
```

- „E2B-2“: (20-mer)

```
CATCTGAACTCAAAGCGTGG
1 -----+-----+ 20
```

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren und Dozenten:

Anatomie:	Reutter
Anorganische Biochemie:	Hartmann, Weser
Anorganische Chemie:	Lindner, Strähle
Biochemie:	Bohley, Eisele, Hamprecht, Mecke, Probst, Weser, Wiesinger
Botanik:	Metzner, Wegmann
Cytologie:	Gray (San Francisco), Pelling
Entwicklungsbiologie:	Goldman (San Francisco)
Enzymologie:	Bisswanger, Büsen, Fröhlich, Gebhardt
Immunologie:	Kuby (San Francisco), Rammensee
Mathematik:	Mathieu, Pommer
Molekularbiologie:	Collins (Berkeley), Davis (San Francisco), Stubbs (San Francisco)
Mikrobiologie:	Bayliss (San Francisco), Braun, Götz, Poralla
Organische Chemie:	Bayer, Hagenmaier, Hanack, Jung, Stegmann
Pharmakologie und Toxikologie:	Bock, Breyer-Pfaff, Pfaff, Schwarz, Werringloer
Physik:	Nakel, Staudt
Physikalische Biochemie:	Atta-ur-Rahman (Karachi), Shekani (Karachi), Voelter
Physikalische Chemie:	Hoffmann, Gauglitz, Oberhammer, Oelkrug
Virologie:	Ramirez (San Francisco)
Zoologie:	Günzl, Pfeiffer

ohne Ortsangabe: alle Tübingen

Lebenslauf

- Persönliche Daten:** Wolfgang Alexander Wybranietz
geboren am 22.02.1971 in Neu-Ulm, Bayern
- Familienstand:** ledig
- Schulausbildung:**
- September 1977 - Juli 1981 Grundschole Gerlenhofen
September 1981 - Juni 1990 Gymnasium Neu-Ulm (heute: „Lessing-Gymnasium“)
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Juli 1990 Bayerisches Hochbegabtenstipendium (Förderdauer: 10 Semester)
- Studium:**
- Oktober 1990 - Juli 1993 Studium der **Biochemie** an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
August 1993 - September 1994 Austauschjahr an der San Francisco State University (SFSU) in San Francisco, USA
Oktober 1994 - Oktober 1995 Fortsetzung des Studiums in Tübingen
Juni 1995 - Oktober 1995 mündliche Diplomprüfungen in den Fächern Organische Chemie, Biochemie und Pharmakologie/Toxikologie;
Abschluss: Diplom-Biochemiker
November 1995 - Oktober 1996 **Diplomarbeit** in der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen, in der Arbeitsgruppe von Dr. Ulrich Lauer;
Thema: „**RAMTB-Selektions-Assay zur Generierung leberspezifischer Expressionskassetten für die humane *in vivo* Gentherapie**“; Betreuung: Dr. Rolf Gebhardt, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen.
- Praktika:**
- Mai 1993 - Juni 1993 Praktikumsaufenthalt am H.E.J. Research Institute of Chemistry in Karachi, Pakistan (DAAD- und IAESTE-Austausch)
Januar 1994 - Juli 1994 Praktikum in der Life Sciences Division (LSD) des Lawrence Berkeley Laboratoriums (LBL) in Berkeley, USA
- Promotion:**
- November 1996 - Oktober 2000 Dissertation an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen, in der Arbeitsgruppe von Dr. Ulrich Lauer;
Thema: „**Potenzierung der Suizidgenwirkung durch VP22-Fusionsproteine**“, Betreuung: Prof. Dr. Rolf Gebhardt, Biochemisches Institut der Universität Leipzig.