

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

**LANGZEIT-EXPRESSION IN DER
ADENOVIRALEN GENTHERAPIE
MIT HILFE EINES
IMMUNMODULATORISCHEN
PROTEINS**

Vorgelegt der III. Medizinischen Klinik
Universitätsklinikum Eppendorf-Hamburg
Stellv. Ärztliche Leiter:
Prof. Dr. med. Friedrich Thaiss

von

Wibke Flürenbrock

Hamburg 2007

1	Zielsetzung	5
2	Einleitung.....	6
2.1	Chronische Erkrankungen	6
2.1.1	Autoimmunhepatitis	6
2.1.2	Hämophilie.....	8
2.2	Gentherapie	11
2.2.1	Physikalische Gentransfermethoden.....	12
2.2.2	Chemische Gentransfermethoden.....	12
2.2.3	Virale Gentransfermethoden	13
2.3	Adenovirale Gentherapie	15
2.3.1	Aufbau und Lebenszyklus von Adenoviren	15
2.3.2	Adenovirale Vektoren in der Gentherapie	19
2.3.3	Grenzen der adenoviralen Gentherapie	21
2.4	Immunologie	24
2.4.1	Chemokine und ihre Rezeptoren.....	24
2.4.2	Immun/Chemokin-Escape Mechanismen der Viren	26
2.5	vMip-II	26
3	Material und Methoden	30
3.1	Materialien	30
3.1.1	Geräte.....	30
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	31
3.1.3	Chemikalien.....	32
3.1.4	Puffer und Lösungen	33
3.1.5	Kulturmedien	36
3.1.6	Reagenzienkits	37
3.1.7	Enzyme.....	38
3.1.8	Molekulargewichtstandards	39
3.1.9	Oligonukleotide.....	39
3.1.10	Antikörper	39

3.1.11	Plasmide.....	40
3.1.12	Bakterien	41
3.1.13	Viren	41
3.1.14	Zellen.....	41
3.2	Methoden.....	42
3.2.1	Allgemeine Arbeitsmethoden.....	42
3.2.2	Klonierungsmethoden.....	44
3.2.3	Klonierung von pAd.CMV-Luc.IRES.vMip-II.Tag4a	49
3.2.4	Zellkulturmethoden	51
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Der klonierte Vektor p.CMV-Luc.IRES.vMip-II.Tag4a	57
4.1.1	Der klonierte Vektor pCMV.vMip-II.Tag4a	57
4.1.2	Der klonierte Vektor pIRES.vMip-II.Tag4a	59
4.1.3	Der klonierte Vektor pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a.....	60
4.1.4	Der klonierte Vektor pAd-CMV.Luc	62
4.1.5	Der klonierte Vektor pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a	63
4.1.6	Der Luziferase-Eskalations-Assay.....	64
4.1.7	Der vMip-II-Eskalations-Assay	65
4.2	Virusgenerierung	65
4.2.1	β -Galactosidase-Assay	65
4.2.2	CPE-Assay	66
4.3	Suppressions-Assay	66
5	Diskussion.....	68
5.1	Bisherige Ansätze zur Langzeit Expression.....	68
5.2	Klonierung von p.Ad-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a	69
5.2.1	Luziferase-Eskalations-Assay	69
5.2.2	vMip-II-Eskalations-Assay	70
5.3	Virusgenerierung	70
5.3.1	Suppressions-Assay.....	71
5.3.2	Alternative Erklärungsmodelle.....	72

6	Zusammenfassung	73
7	Literaturverzeichnis	74
8	Anhang.....	80
8.1	Abkürzungsverzeichnis	80
8.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	82
9	Danksagung	84
10	Lebenslauf	85
11	Erklärung.....	86

1 Zielsetzung

Die Gentherapie ist ein neuer, Erfolg versprechender Ansatz in der Behandlung vieler, bisher noch unheilbarer Erkrankungen. Das Adenovirus ist zu einem beliebten Hilfsmittel der Gen-Therapeuten geworden, da es wegen vieler Vorteile anderen Vektoren überlegen ist. Der Schwachpunkt der adenoviralen Vektoren jedoch ist die Immunreaktion des Wirts auf den Vektor. Dies resultiert in der Eliminierung der infizierten Zellen, und führt somit zu einem raschen Erliegen der Genexpression.

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit ist es, einen zur Langzeit-Genexpression fähigen adenoviralen Vektor zu schaffen, der in der Therapie chronischer Erkrankungen einsetzbar ist. Hierzu soll durch den Einbau der Gensequenz eines immunmodulatorischen Proteins des HHV-8 in die Expressionskassette des Vektors die wirtseigene Immunantwort untergraben werden. Die Immunsuppression bleibt hierbei lokal auf die vom Vektor infizierten Zellen beschränkt. Die Komplikationen einer systemischen Immunsuppression werden so umgangen.

Es ist zunächst ein Shuttle-Plasmid mit der entsprechenden Expressionskassette zu klonieren. Die Funktionalität des Plasmids soll durch das voran geschaltete Reportergen für Luziferase überprüft werden. Anschließend soll durch Co-Transfektion und Rekombination in 293-Zellen der adenovirale Vektor Ad.CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a hergestellt werden.

2 Einleitung

2.1 Chronische Erkrankungen

Chronische Erkrankungen bedürfen einer langen, mitunter lebenslangen, Therapie mit teilweise erheblichen Nebenwirkungen. Dies stellt für die Patienten eine zusätzliche Belastung zur eigentlichen Erkrankung dar. Besonders in dem Bereich der monogenetischen, aber auch der metabolischen Erkrankungen ist die Gentherapie ein großer Hoffnungsträger. Idealerweise würde das defekte Gen durch das Gesunde ersetzt, wie z.B. bei der Hämophilie denkbar. Aber auch das Einschleusen von Gensequenzen therapeutisch wirksamer Proteine ist ein Ansatz, beispielsweise anwendbar bei der Autoimmunhepatitis.

Die Autoimmunhepatitis soll in diesem Kontext unter besonderer Beachtung diskutiert werden, da mit der Einbringung eines immunmodulatorischen Gens aus der Gruppe der Herpesviren nicht nur die Transgen-Expression verlängert wird, sondern die Immunmodulation selbst schon als Therapeutikum gegen die Autoimmunhepatitis eingesetzt werden kann. Besonders aufgrund der schwerwiegenden Nebenwirkungen der systemischen immunsuppressiven Therapie, wie Infektanfälligkeit, Muskelschwund, Osteoporose, Ödeme u.a. wäre der Ersatz durch eine nebenwirkungsärmere Therapie ein großer Fortschritt.

2.1.1 Autoimmunhepatitis

Die Autoimmunhepatitis ist eine entzündliche Erkrankung der Leber. Sie ist durch den Angriff der Leber durch das eigene Immunsystem charakterisiert. Ursächlich für die Autoaggression werden genetische Faktoren, aber auch Umwelteinflüsse, wie z.B. eine vorherige Virus-Infektion oder eine toxische Schädigung der Leber diskutiert. Histopathologisch lassen sich zytotoxische T-Zellen und Plasmazellen im Lebergewebe nachweisen. Sie sind gegen bestimmte Antigene der Leberzellen gerichtet und führen zu ihrer Zerstörung. Ob eine Hemmung der Suppressor-Zellen beteiligt ist, ist noch unklar. Im Blut der Patienten sind verstärkt zirkulierende Antikörper

zu finden. Sie sind gegen verschiedene Strukturen, nicht nur der Leber zugehörig, gerichtet und für die extrahepatischen Manifestationen verantwortlich. Klinisch ähnelt die Erkrankung einer chronischen Virushepatitis. Die Symptome reichen von Müdigkeit und Appetitlosigkeit über die typischen Merkmale einer Leberzirrhose wie Aszites, Koagulopathie und Enzephalopathie bis hin zum hepatozellulären Karzinom. Die begleitenden Autoimmunerkrankungen erstrecken sich u.a. auf rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses, Thyreoiditis, Pleuritis, Perikarditis und Colitis. Eine Ablagerung zirkulierender Immunkomplexe in den Gefäßen der betroffenen Organe wird hierfür verantwortlich gemacht. Es folgt eine Aktivierung des Komplementsystems mit Entzündungsreaktionen und Gewebedestruktionen [16].

Die Erkrankung betrifft in 80% der Fälle junge Frauen. Gehäuftes Vorkommen bestimmter Histokompatibilitätsantigene (HLA-B1, -B8, -DR3 und -DR4) bekräftigen die genetische Disposition. Die Autoimmunhepatitis lässt sich in drei Hauptgruppen unterteilen:

Tabelle 2.1: Einteilung der Autoimmunhepatitis

Autoimmunhepatitis	Antikörper	Patienten	Therapie
Typ I	ANA	junge Frauen	immunsuppressiv
Typ IIa	LKM1-AK	junge Frauen	immunsuppressiv
Typ IIb	Hepatitis C	ältere Männer, Mittelmeerraum	antiviral (Interferon- α + Ribavirin)
Typ III	SLA-AK/LP-AK	junge Frauen	immunsuppressiv

Quelle: modifiziert nach Herold

Günstige Prognosen haben leichte Verläufe mit Mottenfraßnekrosen ohne Brückenbildung im histologischen Bild der Leber. Eine schwere Form der Autoimmunhepatitis hingegen mit histopathologischen Brückennekrosen und multilobulären Kollapsnekrosen kann schnell zu einer Leberzirrhose führen. Die Letalität kann innerhalb von sechs Monaten 40% erreichen. Die Patienten versterben meistens an den Komplikationen der Zirrhose, wie Varizenblutung oder Leberversagen. Als Spätkomplikation kann sich ein hepatozelluläres Karzinom entwickeln.

Therapie

Die derzeitige Therapie der Wahl stellt die systemische Immunsuppression mit Glukokortikoiden und Zytostatika dar. Die initiale Dosierung liegt bei 60 mg Prednison/Tag und pendelt sich bei einer Erhaltungsdosis von 5-20 mg/Tag ein. Alternativ wird bei einer Kombinationstherapie mit Azathioprin (1-2 mg/kg Körpergewicht/Tag) mit einer niedrigen Prednison-Dosis von 30 mg/Tag eingestiegen und ebenfalls über mehrere Monate reduziert. Die Azathioprin-Dosis hingegen bleibt konstant. Das Therapieschema wird für mindestens zwei Jahre beibehalten. Nach Absetzen der Therapie kommt es in 50% der Fälle zu einem Rezidiv und evtl. lebenslangem Therapiebedarf. Bei Versagen der systemischen Immunsuppression ist die Lebertransplantation die ultima ratio [16].

2.1.2 Hämophilie

Hämophilie A

Die Hämophilie A ist eine monogenetische Erbkrankheit, die den Faktor VIII (antihämophiles Globulin) des Gerinnungssystems betrifft. Es handelt sich um ein 265 kD großes einkettiges Protein mit dem Genlokus Xq28. Die Erkrankung folgt einem X-chromosomal-rezessiven Erbgang und ist somit überwiegend auf die männliche Bevölkerung beschränkt. Gelegentlich können auch Spontanmutationen auf dem X-Chromosom vorkommen. Einer von 10.000 Jungen wird mit diesem Gendefekt auf die Welt gebracht. Der Faktor VIII wird in den parenchymalen Leberzellen synthetisiert und bildet zusammen mit dem von-Willebrand-Faktor einen Komplex. Er beschleunigt die proteolytische Aktivierung des Faktors X.

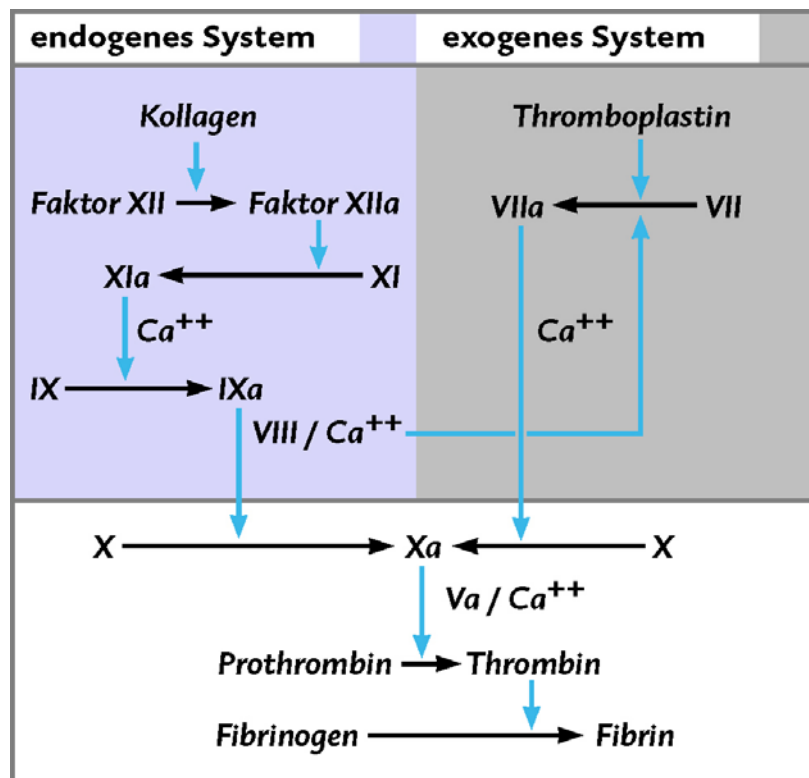


Bild 2.1: Gerinnungskaskade (modifiziert nach Jaenecke, Marlar et al und Wintrobe)

Durch den Mangel an Faktor VIII erfährt die Gerinnungskaskade des endogenen Systems eine Unterbrechung, so dass es bei den Patienten zu einer erhöhten Blutungsneigung kommt. Die Blutungen setzen Stunden bis Tage nach Bagateltraumen wie Stößen, Zahnextraktionen u.ä. ein. Charakteristisch sind Blutungen in Weichteile, Muskeln und Gelenke, die unentdeckt über Tage und Wochen schmerzhafte Raumforderungen entstehen lassen. Dadurch können Druckläsionen auf umgebende Nerven (Neuropathie), Muskeln (Kompartementsyndrom) und Gefäße (venöse Stauung, arterieller Verschluss) entstehen. Gefährlich sind oropharyngeale Blutungen, bei denen Erstickungsgefahr droht, und ZNS-Blutungen, die auch ohne Trauma entstehen können. Der klinische Schweregrad der Erkrankung steht im direkten Zusammenhang mit dem Plasmaspiegel des Faktors VIII.

Tabelle 2.2: Schweregrade der Hämophilie A

Schweregrad	Faktor VIII (%)	Klinik
Schwer	0 - 1	Spontane Blutungen ohne Trauma
Mittelschwer	2 - 5	Blutungen nach leichten Traumen
Leicht	6 - 15	Blutungen nach deutlichem Trauma
Subhämophilie	16 - 35	Blutungsneigung nach schweren Verletzungen/Operationen

Quelle: modifiziert nach Handin

Therapie

Die Therapie der Hämophilie A besteht aus der Substitution des fehlenden Faktors VIII. Durch den weit verbreiteten Einsatz von Plasmaprodukten wurden viele Hämophilie-Patienten mit HIV, HBV oder HCV infiziert. 50% der mehrfach transfundierten Hämophiliepatienten sind HIV positiv. Durch neue Aufreinigungsmethoden wie Erwärmung oder Absorption mit anschließender Elution über Säulen konnten gereinigte und virusinaktivierte Faktor VIII Konzentrate hergestellt werden. Durch den Fortschritt der Gentechnik ist es nun möglich rekombinanten Faktor VIII herzustellen, der das Infektionsrisiko auf null reduziert. Alle Therapieformen jedoch werden durch die mögliche Bildung von Antikörpern gegen den Faktor limitiert. Es kann zu einer Hemmkörperhämophilie kommen, was eine weitere Behandlung mit humanem Faktor VIII wegen der Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion unmöglich machen kann.

Eine leichte Hämophilie kann bei Bedarf mit Faktor VIII-Infusionen behandelt werden. Patienten mit schwerer Hämophilie benötigen eine permanente Aufrechterhaltung des Plasmaspiegels. Seine Halbwertszeit liegt bei 8 - 12 Stunden, was eine kontinuierliche, mindestens aber zweimal tägliche Substitution des Gerinnungsfaktors erforderlich macht. Vor jeder Kariesbehandlung wird eine Infusion benötigt. Zur Zahnextraktion muss ein Hämophilie-Patient in ein Krankenhaus eingewiesen werden [24].

Hämophilie B

Der Hämophilie B liegt ein Gendefekt des Gerinnungsfaktors IX (Christmas-Faktor) des endogenen Systems zugrunde. Das entsprechende Gen liegt auf dem X-Chromosom, Genlokus Xq27.1-27.2. Auch diese Gerinnungsstörung obliegt einem X-chromosomal-rezessiven Erbgang mit hauptsächlich männlichen Patienten. Das 55 kD schwere Proenzym wird in der Leber synthetisiert und ist Vitamin K abhängig. Durch Faktor XIa aktiviert, katalysiert er seinerseits zusammen mit Faktor VIIIa die Umwandlung von Faktor X in seine aktive Form. Ein von 100.000 neugeborener Junge ist Träger dieses Gendefektes. Die Klinik unterscheidet sich nicht von der der Hämophilie A. Eine exakte Diagnose ist dennoch unabdingbar, da sich die Therapieschemata unterscheiden.

Therapie

Verwendet werden fresh frozen plasma oder Plasmaprodukte mit Prothrombin-Komplex-Konzentraten. Neben dem Infektionsrisiko besteht die Gefahr der Thromben-Entstehung durch in Prothrombinkomplex-Konzentraten enthaltene aktivierte Gerinnungsfaktoren mit nachfolgenden Thrombosen oder Embolien. Mittlerweile ist auch rekombinant hergestellter Faktor IX erhältlich [24].

2.2 Gentherapie

Die wachsende Erforschung unserer Gene und ihrer Funktionen eröffnet der medizinischen Wissenschaft mit der Gentherapie ein neues Feld in der Behandlung von Krankheiten. Die Applikation von Fremd-DNA in Zellen des menschlichen Organismus zur Therapie von Erkrankungen wird als Gentherapie bezeichnet. Ziel ist zum einen der Ersatz ausgefallener oder pathologisch veränderter Genfunktionen und zum anderen eine Expression von zusätzlichen Genen zu Therapiezwecken. Die Fremd-DNA wird meist in Form von Plasmid DNA verabreicht.

Die bisher in klinischen Studien noch enttäuschenden Ergebnisse basieren weniger auf der Unwirksamkeit des therapeutischen Gens, als vielmehr auf der noch mangelnden Effizienz der Genexpression. Über ein Zehntel der bisher bekannten Gene des Menschen sind an der Entstehung monogenetischer Erbkrankheiten beteiligt. 1990 wurde die weltweit erste gentherapeutische Behandlung an einem Menschen

angewandt. Ein vierjähriges Mädchen kam mit einem meist tödlich endenden Adenosindesaminase(ADA)-Mangel zur Welt. Ihr wurden autologe T-Lymphozyten mit dem funktionsfähigen ADA-Gen infundiert, was der Patientin heute ein fast normales Leben ermöglicht. 1999 führten Alain Fischer und seine Mitarbeiter eine Gentherapie an fünf an einem schweren Immundefekt erkrankten Kindern durch. Dazu wurden den Patienten hämatopoetische Stammzellen entnommen, *ex vivo* mit Hilfe eines retroviralen Vektors (aus dem *Moloney murine leukemia virus*) transformiert und den Patienten wieder infundiert. Nach vier Monaten konnten in vier der fünf Patienten T-Zellen und NK-Zellen gefunden werden. Zwei ihrer Patienten entwickelten ungefähr drei Jahre nach der Gentherapie eine Leukämie. Eine mögliche Ursache für die Entwicklung der Leukämien könnte eine für retrovirale Vektoren typische Insertionsmutagenese sein. Aber auch ein onkogenetisches Potential des Gens selbst wird diskutiert [23]. Es existieren unterschiedlichste Methoden, um DNA in die Zielzelle einzuschleusen:

2.2.1 Physikalische Gentransfermethoden

Elektroporation: Bei einer Elektroporation wird die Zellmembran durch Spannungspulse für DNA permeabel gemacht[1].

Mikroinjektion: Bei der Mikroinjektion wird die Plasmid DNA direkt in die Zelle injiziert. Die Transfektionseffizienz liegt bei nahezu 100%. Die Methode ist allerdings sehr aufwendig. Jede Zelle muss einzeln behandelt werden [9].

2.2.2 Chemische Gentransfermethoden

Lipofektion: Genetisches Material wird mit Hilfe von Liposomen (Membranvesikel aus einer Lipiddoppelschicht) durch Fusion mit der Zellmembran in die Zielzellen eingeschleust [37].

Kalzium-Phosphat-Präzipitation: Das am häufigsten verwendete Transfektionsverfahren ist die Kalzium-Phosphat-Präzipitation. In einem Gemisch aus Kalziumchlorid

und Natriumphosphat bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Kalziumphosphat. Die ausgefallenen Kristalle werden der Zellkultur zugegeben und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Die "Berieselung" der Zellen mit dem Präzipitat stellt für die Zellen einen schädlichen Stress dar. Der ganze Vorgang ist stark abhängig von einer Vielzahl von Parametern, deren richtige Einstellung zudem von Zellart zu Zellart variiert [22].

2.2.3 Virale Gentransfermethoden

Um genetisches Material auf biologischem Weg in Zellen einzubringen, sind so genannte virale Vektoren besonders geeignet. Diese viralen Vektoren basieren auf rekombinanten Viren unterschiedlichen Typs und werden von allen Systemen bislang mit Abstand am häufigsten zu Gentransferzwecken eingesetzt. Unter den viralen Vektoren sind besonders die retro-, adeno- und adeno-assoziierten viralen Systeme hervorzuheben.

Man bedient sich dabei des natürlichen Lebenszyklus eines Virus. Da den Viren eigene „Wachstums- und Teilungswerkzeuge“ wie diverse Enzyme zur Energiegewinnung, Mitochondrien, Ribosomen und der Protein-Synthese-Apparat fehlen, benutzen sie die entsprechenden Faktoren der Wirtszellen. Dazu schleusen sie sich in Pflanzen-, Tier- oder Menschenzellen ein. In diesen werden nach Anleitung der viralen Gene neue Viren synthetisiert.

Für die Therapie von chronischen Erkrankungen sollte ein viraler Vektor idealerweise folgende Eigenschaften besitzen:

- Herstellung hoher Konzentrationen ($> 10^8$ Partikel/ml)
- Einfache und reproduzierbare Herstellung
- Hohe Effizienz beim Einbringen des therapeutischen Gens in die Zielzellen
- Infektion von sich teilenden und ruhende Zellen
- Eine dauerhafte und starke Genexpression
- Keine Immunantwort gegen den Vektor

Derzeit erfüllt noch kein viraler Vektor alle diese Eigenschaften. Retroviren können durch Integration des genetischen Materials in das Wirts-Genom eine persistierende

Genexpression erreichen. Dies jedoch birgt die Gefahr der Entartung durch Insertionsmutagenese.

Adenoviren besitzen eine Reihe der genannten Eigenschaften und haben mit ca. 26% einen großen Anteil an den derzeitigen Gentransferstudien.

Tabelle 2.3: Hauptgruppen der viralen Vektoren

Viraler Vektor	Charakteristika	Vorteile	Nachteile
Adenovirus	▪ dsDNA-Virus ▪ bis 8 kb Fremd-DNA (bei helferabhängigen Viren bis 30 kb) ▪ DNA liegt in der Wirtszelle episomal vor	▪ Infektion nicht proliferierender Zellen ▪ Herstellung in hohen Titern (10^{12}) möglich ▪ breiter Zelltropismus	▪ kapsid-vermittelte entzündliche Immunantwort → nur transiente Genexpression
Retrovirus	▪ RNA-Virus ▪ bis 8 kb Fremd-DNA ▪ DNA integriert in das Wirtsgenom	▪ persistierender Gentransfer ▪ geringe Immunität	▪ nur Infektion von sich teilenden Zellen ▪ Induktion einer malignen Transformation ist möglich ▪ relativ niedrige Titer (10^6-10^7)
Adeno-assoziierte Viren (AAV)	▪ ssDNA-Virus ▪ < 5 kb Fremd-DNA ▪ 90% liegen in der Wirtszelle als episomale Form vor ▪ 10% integrieren sich ins Genom	▪ keine Immunogenität ▪ nicht pathogen ▪ breiter Zelltropismus	▪ kleine Verpackungskapazität
HSV-1	▪ dsDNA-Virus ▪ bis zu 40 kb Fremd-DNA (bei Amplicon bis zu 150 kb) ▪ Genom liegt in der Wirtszelle episomal vor	▪ große Verpackungs-kapazität ▪ starker neuronaler Tropismus	▪ mangelnde transduktion nicht neuronaler Zellen ▪ große Immunogenität
Lentivirus	▪ RNA-Virus ▪ bis 8 kb Fremd-DNA ▪ breiter Zelltropismus ▪ DNA integriert in	▪ persistierender Gentransfer in den meisten Geweben ▪ geringe Immunogenität	▪ Induktion einer malignen Transformation ist möglich

Viraler Vektor	Charakteristika	Vorteile	Nachteile
	das Wirtsgenom		

Quelle: modifiziert nach Thomas

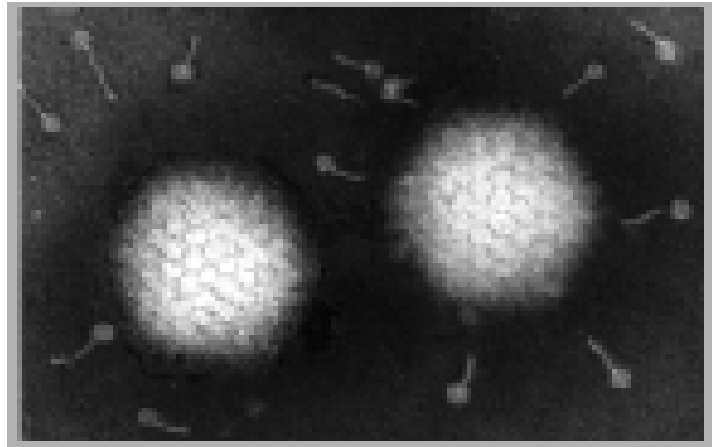
Der Anteil viraler Gentransfermethoden in gentherapeutischen Studien weltweit beträgt momentan etwa 70%. Davon entfallen etwa 37% auf Adenoviren und etwa 34% auf Retroviren. Die Mikroinjektion wird in ca. 17% aller Fälle angewandt und auf die Lipofektion greifen ca. 8% der Studien zurück (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>).

2.3 Adenovirale Gentherapie

2.3.1 Aufbau und Lebenszyklus von Adenoviren

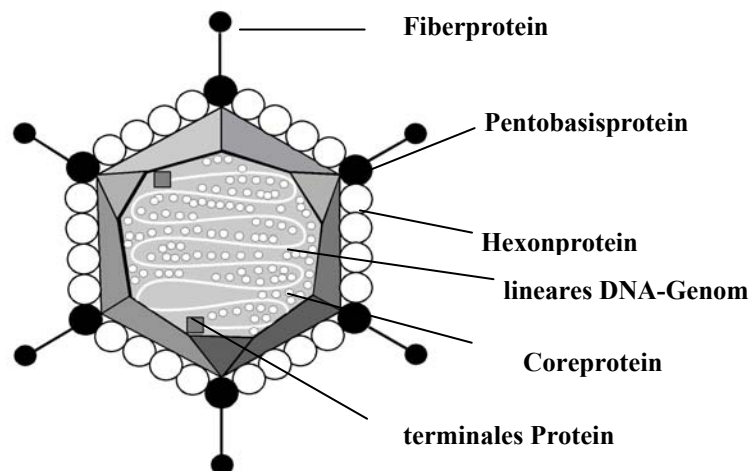
Rowe et al. entdeckten 1953 virale Krankheitserreger in adenoidem Gewebe [43]. Die nach dem Fundort benannten Adenoviren lassen sich in die beiden Gattungen Mastadenoviren, die Säugetiere infizieren können, und die Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten endemisch sind, unterteilen.

Es werden mehr als 100 serologische Formen unterschieden. Adenoviren haben ein sehr breites Wirtsspektrum. Sie können sich teilende, ruhende wie auch bereits ausdifferenzierte Zellen infizieren. Im Allgemeinen befallen Adenoviren vor allem das Epithel der oberen Atemwege. Sie verursachen 5-15% aller Erkältungskrankheiten. Das Virus kann jedoch auch Krankheiten wie Keratokonjunktivitis, Gastroenteritis, Pneumonie, Bronchitis und Hepatitis auslösen.



*Bild 2.2: Adenoviren, elektronenmikroskopische Aufnahme
(Quelle: Linda Stannard, Department of Medical Microbiology,
University of Cape Town)*

Morphologische Charakteristika des 80 nm durchmessenden Adenovirus sind ein ikosaedrisches Kapsid mit 252 Kapsomeren, bestehend aus drei Hauptproteinen: Hexonproteine, Pentobasisproteine und Fiberproteine.



*Bild 2.3: Aufbau eines Adenovirus mit seinen wichtigsten Strukturmerkmalen
(modifiziert nach Stewart und Burnett)*

Das Virusgenom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA von ungefähr 36 kb Länge, die in 100 *map units* (mu) unterteilt wird. Die für die Replikation des

Virusgenoms in Virionen verantwortlichen *inverted terminal repeats* (ITR's) liegen an jedem Genom-Ende. An den 5'-Enden sind zudem kovalent je ein terminales Protein gebunden, welches während der viralen Replikation als Primer fungiert [42].

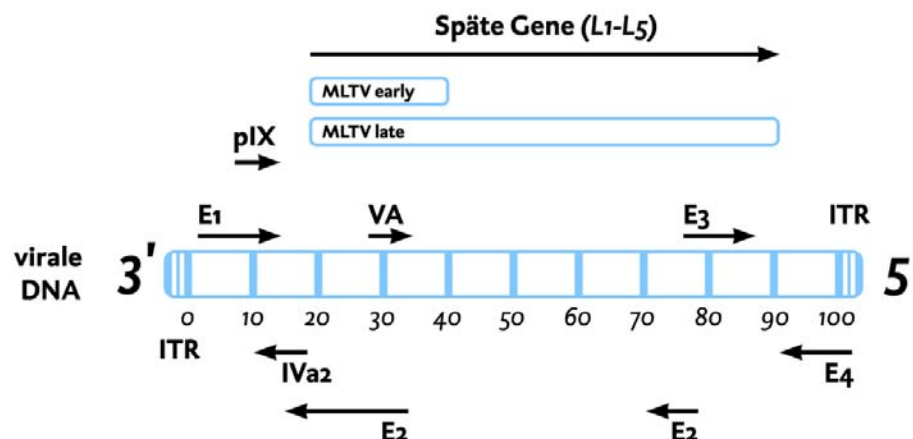


Bild 2.4: Genomorganisation der adenoviralen Wildtypform (Quelle: modifiziert nach Günzburg)

Der adenovirale Replikationszyklus dauert 32-36 Stunden. Dabei bindet sich das Adenovirus mit Hilfe seiner Fiberproteine an den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor [51]. Die Pentonbasisproteine binden sich nun an $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$ -Integrine, was eine clathrin-vermittelte Endocytose auslöst [38]. Das saure Milieu und die virale Protease L3/p23 beginnen das Viruskapsid abzubauen und führen so zum „uncoating“ des Virus-Core im Zytoplasma. Bestimmte Signale („nuclear localization signals“) der Core-Proteine erleichtern den Transport des Core durch die Kernporen in den Zellkern. Hier bleibt die virale DNA als Episom bestehen und die Transkription und Expression der adenoviralen Gene beginnt.

Die adenovirale Genexpression wird in drei Phasen eingeteilt. Die frühe (immediately early), die verzögert frühe (delayed early) und die späte (late) Phase. Gelangt adenovirale DNA in den Zellkern, wird, durch zelluläre Transkriptionsfaktoren vermittelt, das erste adenovirale Gen E1A exprimiert („E“ steht für „early“). Das Gen-Produkt aktiviert die Transkription der weiteren frühen Gene E1B, E2A, E2B, E3 und E4 [40]. Das E1B Protein verhindert die Induktion der Zellapoptose [54]. Der E2 Genabschnitt

kodiert die für die Virus-Replikation erforderlichen Proteine, wie z.B. die DNA-abhängige Polymerase. Das Protein 19k der E3-Region verhindert die Expression und den Transport der MHC I Moleküle an die Zelloberfläche, wodurch das wirtseigene Immunsystem umgangen wird. E4-Genprodukte sind u.a. an der viralen Replikation und der Fertigstellung der Virionen beteiligt. Sie bewirken eine verstärkte Expression viraler mRNA bei gleichzeitiger Unterdrückung der wirtseigenen Transkription. Die Replikation des Genoms beginnt etwa sechs bis acht Stunden nach der Infektion, erreicht ihr Maximum nach etwa 18 bis 20 Stunden und ist nach 24 Stunden beendet. Die späten Gene L1-L5 kodieren fast ausschließlich Strukturproteine, die für den Zusammenbau des Cores und des Capsids nötig sind. Bei der Kapsidverpackung spielt ein Verpackungssignal am linken Ende des adenoviralen Genoms eine wichtige Rolle [26]. Diese Ereignisse führen zur Permeabilitätsänderung der Kernmembran und ermöglichen dem Virus den Übertritt in das Zytoplasma und schließlich durch Lyse der Zellmembran die Freisetzung von ca. 10^4 - 10^5 Viren [50].

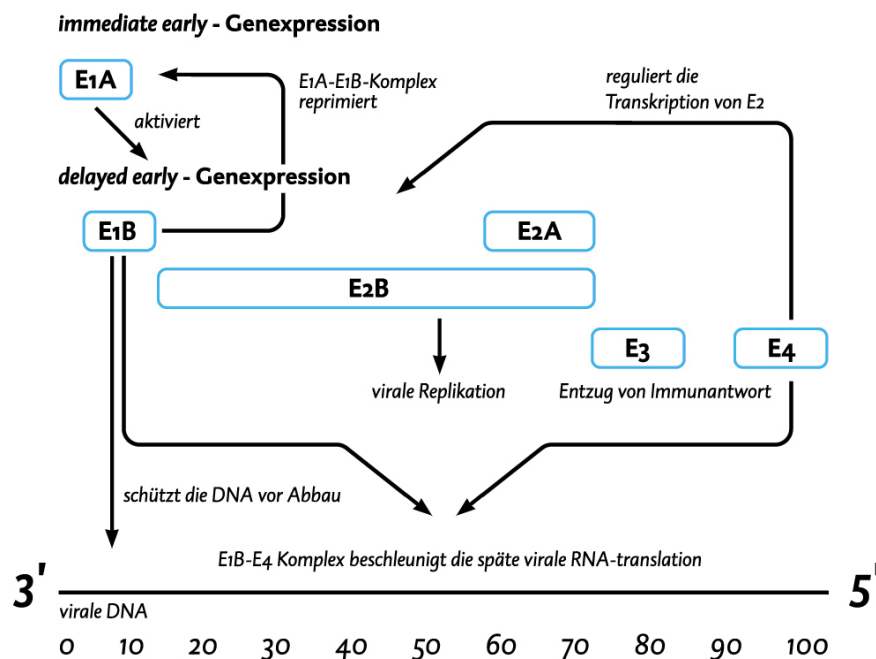


Bild 2.5: Zusammenfassung der wichtigsten Ereignisse der frühen Phase des adenoviralen Lebenszyklusses (Quelle: modifiziert nach Günzburg)

2.3.2 Adenovirale Vektoren in der Gentherapie

Der adenovirale Vektor zeichnet sich vor allem durch seinen breiten Zelltropismus und die hohe Effizienz der Genexpression aus. Anders als das Retrovirus kann er sowohl sich teilende, als auch ruhende Zellen infizieren. Das Genom bleibt dabei episomal in der Zielzelle, so dass die Gefahr der Insertionsmutagenese nicht besteht.

Während des Replikationszyklusses zerstört das Adenovirus die infizierten Zellen, so dass die Genexpression schon nach nur wenigen Stunden zum Erliegen kommt. Nach Entfernen der für die Virusreplikation essentiellen E1-Region entstehen replikationsdefiziente Viren. Die Expressionsfähigkeit der E2- und Strukturproteine bleibt dabei unberührt [35]. Bei dieser Deletion müssen jedoch die ITR's (1-103 bp) sowie das Verpackungssignal (194-358 bp) erhalten bleiben, da sie essentiell für die virale Lebensfähigkeit sind [27]. Zusätzlich muss für die Verpackung des Genoms in die Virione das Protein IX vorhanden sein, das sich mit der kodierenden Sequenz für E1B überschneidet. In einem Wildtyp-Virus ist ein maximaler Einbau von ca. 2 kb Fremd-DNA möglich [3]. Unter Berücksichtigung der essentiellen Bestandteile, ist eine Deletion der E1-Region von 3,2 kb durchführbar, so dass heterologe DNA mit einer Länge von 5,2 kb eingebaut werden kann. Die durch die Produkte der E3-Region vermittelte Suppression der Immunantwort des Wirtes ist bei der Behandlung chronischer Erkrankungen zwar gewünscht, ist jedoch zu schwach, um eine Persistenz des Virus zu erlauben. Dies wird durch das Fehlen schwerer und chronischer Erkrankungen durch Adenoviren beim Menschen unterstrichen. Durch die partielle Deletion dieser nicht essentiellen E3-Region können noch zusätzliche 2,69 kb Platz für den Einbau von Fremd-DNA geschaffen werden. In $\Delta E1\Delta E3$ -Ad5-Vektoren lässt sich auf diese Weise insgesamt Fremd-DNA mit einer Größe von 7,89 kb integrieren [2].

Für die Produktion derartiger Adenoviren sind spezielle Verpackungszelllinien nötig, die die fehlenden Genprodukte für die Virusreplikation zur Verfügung stellen. Eine solche Zelllinie ist bereits 1977 etabliert worden. Es handelt sich um die menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293, die stabil mit den linken 11% des adenoviralen Genoms transfiziert ist und u.a. die, in den Vektoren deletierte, E1-Region in trans zur Verfügung stellt [21]. Auf diese Weise ist eine Virusreplikation nur in dieser

Verpackungszelllinie möglich und nicht in anderen Zellen, die nicht über die E1-Region in ihrem Genom verfügen.

Bett et al. entwickelten 1994 eine Methode zur Herstellung E1/E3-deletierter adenoviraler Vektoren [2]. Dazu konstruierten sie das Plasmid pBHG-10, welches beinahe das komplette Genom des $\Delta E1\Delta E3$ -Ad5 enthält. Ihm fehlen die Initiations- und Verpackungssignale (ψ), die für die Herstellung kompletter Viruskapside essentiell sind. Diese werden durch das Shuttle-Plasmid zur Verfügung gestellt, welches außerdem homologe Ad5-Sequenzen zum pBHG-10 aufweist. In die deletierte E1/E3-Region kann heterologe DNA mit einer Gesamtgröße von 8 kb kloniert werden. Die beiden Plasmide werden über eine Kalzium-Phosphat-Präzipitation in die Verpackungszelllinie 293 integriert. Durch Rekombination an den homologen Sequenzen entsteht ein neues Plasmid, das nun alle erforderlichen Gen-Sequenzen zur Produktion infektiöser aber replikationsdefizienter Adenoviren enthält. Zusätzlich wird die gewünschte und zuvor in das Shuttle-Plasmid klonierte Expressionskassette in das Genom aufgenommen.

Das in dieser Arbeit verwendete Shuttle-Plasmid enthält bereits den heterologen Cytomegalie-Virus (CMV) Promotor, der in einer Vielzahl von Zelllinien eine starke Expression bewirkt [5]. Neben dem verwendeten Promotor spielt für die Stärke der Transgen-Expression ein der Expressionskassette nachgeschaltetes Polyadenylierungssignal eine entscheidende Rolle. Die Verwendung eines SV40-pA⁺-Signals liefert in diesem Zusammenhang zufrieden stellende Expressionsraten und eine homogene mRNA-Population nach einer Infektion mit adenoviralen Vektoren.

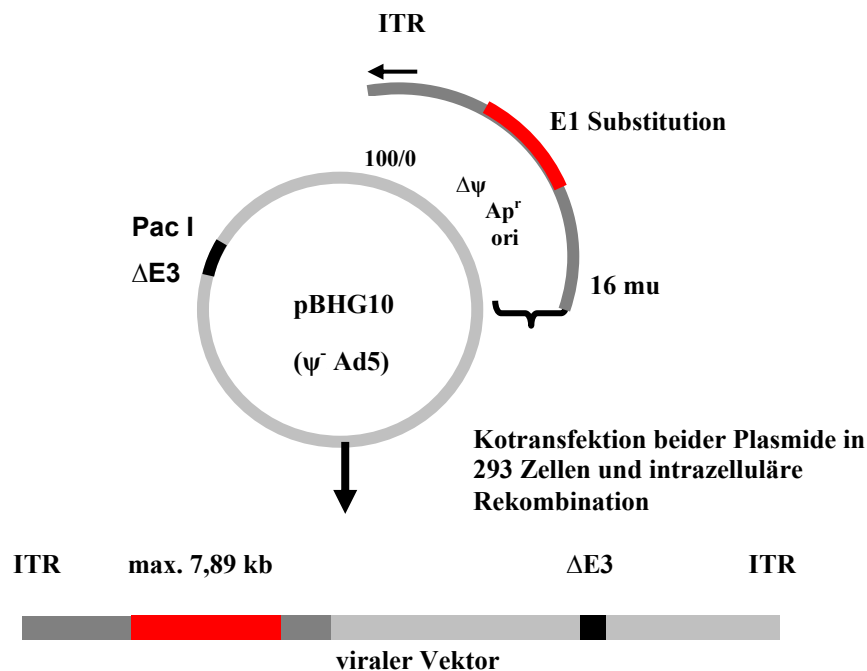


Bild 2.6: Prinzip der Herstellung adenoviraler Vektoren durch homologe Rekombination
Ap^r: Ampicillinresistenz, *ori*: bakterieller Replikationsursprung, *Ad5*: Adenovirus Serotyp 5, *mu*: map units, *ITR*: inverted terminal repeats, *Pac I*: Restriktionsschnittstelle (modifiziert nach Graham)

2.3.3 Grenzen der adenoviralen Gentherapie

Der Nachteil der adenoviralen Vektoren besteht in der hohen Immunogenität des Vektors, mit einer frühen Eliminierung durch das wirtseigene Immunsystem. Es kommt zur Erkennung und Lyse der infizierten Zielzellen, und damit zum frühzeitigen Erliegen der Transgen-Expression. Varda-Bloom et al. haben gezeigt, dass in Balb/c Mäusen die konstitutive, adenoviral-vermittelte Genexpression nach systemischer Applikation nach 5 Tagen ihren Maximalwert in der Leber erreicht, und nach 14 Tagen signifikant abfällt [52]. Somit war bisher nur eine transiente Transgen-Expression via adenoviraler Vektoren der ersten Generation zu erreichen, welche im Bereich der Tumorthherapie sogar erwünscht ist. Für die Therapie chronischer Erkrankungen war das Adenovirus bisher jedoch unbrauchbar, da dort eine lange und stabile Genexpression erforderlich ist. Auch die Wiederholung der therapeutischen Vektorapplikation wird durch die nach der ersten Verabreichung erworbene Immunantwort erschwert.

Es wurden zwei Phasen der adenoviralen Vektor-induzierten Entzündung beobachtet: eine frühe, ca. 6h nach Vektorapplikation, und eine späte Phase, die 5 Tage nach Verabreichung eintritt. Die frühe Phase ist von größerer Bedeutung, da bei dieser bis zu 90% der Vektor-DNA eliminiert werden [55]. Die frühe Entzündungsreaktion wird vom Virus-Kapsid ausgelöst. Dies zeigen Versuche mit UV-Licht inaktivierten Viren oder mit Viren mit leerem Kapsid. Hitzeinaktivierte Viren, bei denen das Kapsid zerstört wurde, die Virusgen-Transkription jedoch noch intakt blieb, führten zu einer späten Entzündungsreaktion [44]. Wenn das Virus die Zielzelle erreicht, verbinden sich die Fiberproteine des Kapsids mit dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor. Nun wird durch Aktivierung verschiedener Kinasen, u.a. p38 und ERK, eine Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, die schließlich zur Transkriptionsinduktion verschiedener Chemokine führt [11]. Nur wenige Stunden nach Vektor-Applikation beginnt die infizierte Zelle Chemokine wie Mip1- α , Mip-1 β , Mip-2, RANTES, IP-10, MCP-1 u.a. zu synthetisieren [8], [28], [59], [46]. Nach einem Tag werden durch die chemotaktische Wirkung Entzündungszellen des angeborenen Immunsystems in das Gewebe gelockt. Makrophagen, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten u.a. wandern in das Gebiet ein und beginnen mit der Lyse der mit Vektor infizierten Zellen. Noch unspezialisierte Th0-Zellen werden durch die Zytokin-Produktion der Makrophagen und NK-Zellen (IL-12, TNF- α) in Th1-Zellen umgewandelt, die nun ihrer zytotoxischen Aufgabe nachgehen [44]. Auch die Chemokine, wie z.B. das CXC-Chemokin IP-10, wirken direkt chemotaktisch auf die CXCR3-Rezeptor tragenden Th1-Zellen [4]. Die Zellen werden lysiert, die Genexpression kommt zum Erliegen.

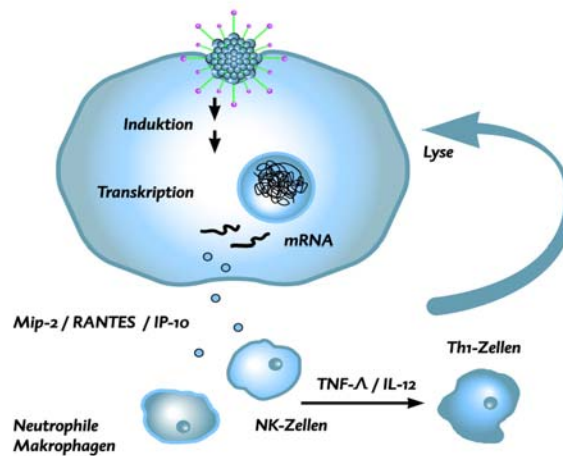


Bild 2.7: Immunreaktion auf eine Adenovirus-Infektion (modifiziert nach Borgland, Bowen, Higgonbotham, Ruzek und Zhang-Xu)

Die Transfektionseffizienz der Leber ist nach systemischer Applikation besonders hoch, so dass es zur Erhöhung der ALT und AST Titer, und bei hohen Dosen zu einem histologisch nekrotischen und apoptotischen Entzündungsbild kommt [56].

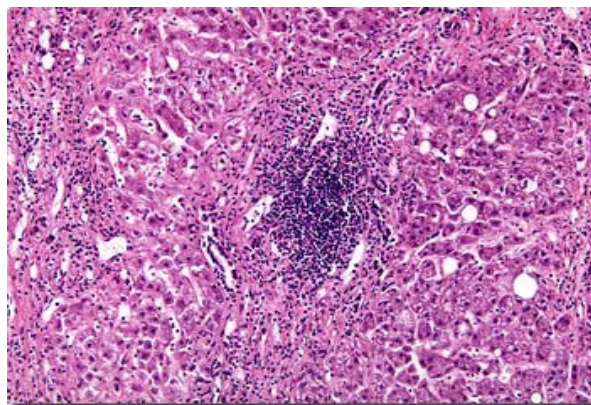


Bild 2.8: Histologisches Bild einer Hepatitis (Quelle: National High Magnetic Field Laboratory, Florida)

Die Bedeutung der immunologischen Reaktionen bei der frühzeitigen Vektor-Eliminierung wird durch verschiedene Arbeiten unterstützt:

Yang et al. zeigten eine verlängerte Genexpression ohne histopathologische Schäden der betroffenen Organe unter systemischer Immunsuppression. Auch das noch

schwach ausgeprägte Immunsystem bei Neugeborenen erlaubt eine längere Genexpression nach Vektor-Applikation [56].

Zhang-Xu et al. untersuchten Mäuse, bei denen die NK-Zellen eliminiert wurden. Sie beobachteten eine Hemmung der IFN- γ Freisetzung, der T-Zell Rekrutierung und der Leber-Entzündung [60].

Muruve et al. und Schnell et al. antagonisierten die Immunantwort durch Antikörper des humanen Chemokin Mip-2. Die ALT/AST Titer waren anschließend reduziert und das histologische Entzündungsbild der Leber abgeschwächt [46], [59].

Die Abschwächung des Immunsystems verspricht ein sinnvoller Ansatz zur Entwicklung einer langen Transgen-Expression zu sein. Die systemische Immunsuppression zieht eine Vielzahl von Nebenwirkungen nach sich. Sinnvoller wäre eine lokale Immunsuppression, die sich auf die vom Vektor infizierten Zellen beschränkt.

2.4 Immunologie

2.4.1 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung von Entzündungszellen, wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten. Chemokine sind eine Population relativ kleiner Proteine (8-17 kDa), die sich höchstwahrscheinlich aus einem ursprünglichen Gen durch Modifikationen entwickelt haben. Sie besitzen hochkonservierte NH₂-terminal lokalisierte Cystein Aminosäurereste. Je nach Arrangement dieser Reste, werden sie in Untergruppen gegliedert (C, C-C, C-X-C, etc.). „C“ gibt Auskunft über die Anzahl der Cystein-Reste, während „X“ die Anzahl der dazwischen liegenden Aminosäuren repräsentiert. Entsprechend ihres Liganden werden auch die Chemokin-Rezeptoren in C-C-, C-X-C-, usw. Rezeptoren eingeteilt. Dabei bleibt ein C-C-Chemokin immer auf ein C-C-Rezeptor spezialisiert, ein C-X-C-Chemokin auf ein C-X-C-Rezeptor, usw. Kreuzreaktionen untereinander sind selten. Die Wirkung eines Chemokins über die Bindung an seinen Rezeptor wird über G-

Protein-gekoppelte heptahelikale Rezeptoren (sog. Serpentinrezeptoren) bewirkt, die mit sieben Domänen die Zellmembran durchziehen.

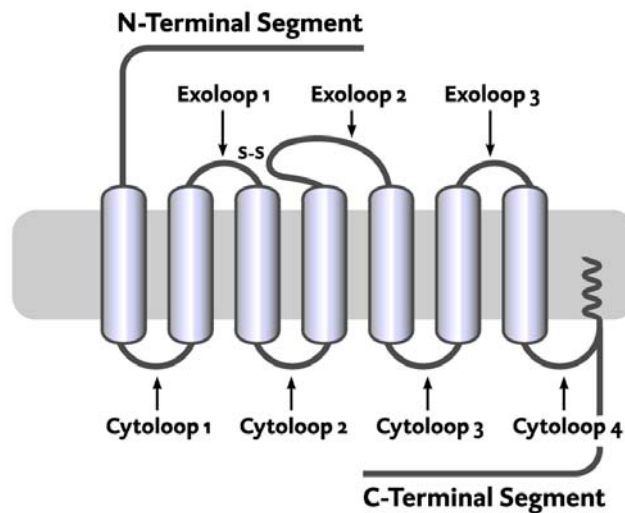


Bild 2.9: Serpentinrezeptor (modifiziert nach Löffler)

Die Bindung eines Chemokins an der extrazellulären Domäne bewirkt eine Phosphorylierungskaskade im Zellinneren [11]. Chemokin-Rezeptoren wurden zuerst auf Leukozyten entdeckt. Abhängig vom Differenzierungsgrad der T-Zelle, exprimiert sie eine spezielle Anzahl von Rezeptoren. Th1-Zellen exprimieren z.B. CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR3. Auf Th2-Zellen hingegen sind vor allem CCR2, CCR3, CCR4 und CCR8 zu finden. Während Th1-Zellen zu einer zellulären Immunantwort führen, und somit intrazelluläre Erreger abtöten können, aktivieren Th2-Zellen die B-Zellen und eosinophile Granulozyten, was der Neutralisierung extrazellulärer Erreger, wie z.B. Helminthen dient. Bei Infektionsversuchen mit Influenza-Viren an Mip1- α Knockout-Mäusen konnte eine abgeschwächte Pneumonie mit verspäteter Clearance des Virus beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse ergaben Paramyxovirus-Infektionen an Mip1- α - bzw. CCR1 Knockout-Mäusen [12], [17]. Eine aktuelle Analyse von Influenza-Virus Infektionen an CCR1 Knockout-Mäusen ergab eine reduzierte Histopathologie mit erhöhten Virus-Titern [13]. Dies verdeutlicht die Rolle der Chemokine und ihrer Rezeptoren bei der Viruseliminierung.

2.4.2 Immun/Chemokin-Escape Mechanismen der Viren

Chemokine spielen bei der Virus-Eliminierung eine entscheidende Rolle. Für das Überleben eines Virus ist es von größter Bedeutung, die Fremdzelle mit ihrem Stoffwechsel für sich nutzen zu können. Manche Viren entwickelten Schutzmechanismen, um der Wirts-Immunantwort zu entweichen.

Die Chemokin Funktion kann durch verschiedene Wege untergraben werden:

- a) Synthese von Chemokin-Imitaten, die als Antagonist wirken
- b) Synthese von Chemokin-Imitaten, die als ungeeignete Agonisten wirken
- c) Synthese von Rezeptor-Imitaten
- d) Synthese von chemokin-neutralisierende Bindungsproteine

2.5 vMip-II

Herpesviren sind bekannt für ihre Fähigkeit mitunter lebenslang im Wirts-Organismus persistieren zu können, ohne dass sie vom Immunsystem des Menschen eliminiert werden.

Das humane Herpesvirus Typ 8 wird in Biopsien von Kaposi-Sarkomen gefunden und führt typischerweise zu latenten Infektionen. Bei der Untersuchung des Genoms ist man auf Genabschnitte gestoßen, die große Ähnlichkeit mit humanen Chemokinen besitzen. Eines davon wurde „macrophage inhibitory protein (vMip)-II“ genannt. Es weist eine 41%ige Sequenzübereinstimmung mit dem humanen Chemokin Mip-1 α auf (ORF K4). Kledal et al. fanden heraus, dass vMip-II ein ungewöhnlich breites Spektrum an Bindungsmöglichkeiten an Rezeptoren besitzt [29]. Es bindet hauptsächlich an auf Entzündungszellen zu findenden Chemokin-Rezeptoren und führt so zu einer Abschwächung der Immunreaktion des Wirtes auf die Infektion von HHV-8. Ganz im Gegensatz zu den humanen Chemokinen, besitzt vMip-II die außergewöhnliche Fähigkeit sowohl an CC-, als auch an CXC-Rezeptorgruppen binden zu können [29]. Diese Fähigkeit ist den humanen Chemokinen versagt, was vMip-II zu einem Molekül mit außergewöhnlichem Bindungspotential macht. Möglicherweise ist vMip-II in der Lage, verschiedene Quartärstrukturen einzugehen, die die Bindung an die unterschiedlichsten Rezeptoren zulässt [19]. Untersuchungen haben ergeben, dass der

N-Terminus für die Bindung an CXCR4, für die Bindung an andere Rezeptoren, wie beispielsweise CCR5, allerdings andere Bereiche verantwortlich sind [34].

Die verwandten HHV-8 Proteine vMip-I und -III wiederum binden nur an einige ausgewählte Rezeptoren (CCR8 und CCR4). vMip-II verdrängt diverse Chemokine von ihren Bindungsstellen und antagonisiert somit deren Wirkung. Kledal et al. konnten zeigen, dass vMip-II durch seine Bindung an CCR1 und CCR5 die durch RANTES ausgelöste Anheftung und Transmigration von Monozyten und Th1-Lymphozyten an aktivierte humane Endothelzellen antagonisiert. Zudem hemmt es die durch RANTES, Mip1- α und Mip-1 β provozierte Chemotaxis auf Monozyten [29]. Viele andere antagonistische Wirkungen durch Verdrängung humaner Chemokine von ihren Rezeptoren sind bewiesen worden [29], [36]. An einem Rezeptor jedoch entfaltet vMip-II eine agonistische Wirkung: dem CCR3, vornehmlich zu finden auf Th2-Zellen [6]. Es führt zur Invasion von eosinophilen Granulozyten und Th2-Lymphozyten [47]. In immunhistochemischen Untersuchungen vMip-II markierter Kaposi-Sarkom Läsionen zeigte sich eine Dominanz Th2 CCR3⁺ Lymphozyten gegenüber Th1 CCR5⁺ Lymphozyten [53]. vMip-II lenkt somit die inflammatorische Zellwanderung von der zytotoxischen Th1 auf eine extrazelluläre Erreger neutralisierende Th2 Zellwanderung um [47]. Auf diese Weise entkommt das HH8-Virus der zytotoxischen Eliminierungsstrategie des Wirts.

Dies scheint einer der Bausteine in dem Netzwerk von Immunabwehrmechanismen zu sein, welches HHV-8 im Laufe der Evolution zum eigenen Schutz entwickelt hat. Die Vermutung liegt nahe, dass HHV-8 die Gensequenzen humaner Chemokine erworben hat und durch diverse Mutationen in der Evolution des Virus potente Chemokin-Antagonisten entstanden sind, die ihm eine Persistenz im Wirtsorganismus erlauben.

Mit dem Ziel eine Immunsuppression zu erzeugen, wurden bereits eine Reihe von in vivo Tierversuchen durchgeführt, die interessante Ergebnisse hervorbrachten:

Chen et al. untersuchten die Wirkung von vMip-II an Wista-Kyoto Ratten mit induzierter Glomerulonephritis. Durch Hemmung der chemotaktischen Wirkungen von Mip-1 β , RANTES und MCP-1 wurde die Leukozyten-Infiltration der Glomeruli reduziert und die Proteinurie erheblich verbessert [10].

De Bruyne et al. gelang es mit Hilfe plasmid-vermittelten Gen-Transfers von vMip-II die Überlebenszeit eines Herztransplantats in Mäusen zu verlängern. Die Infiltration donor-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten in das Transplantat konnte verringert und die Allo-Antikörper-Produktion inhibiert werden [14].

Ghirnika et al. infundierten vMip-II in zuvor geschädigtes Rückenmark von Ratten und beobachteten eine Hemmung der Invasion aktivierter Makrophagen in das geschädigte Gewebe. Der Verlust neuronaler Zellen durch Apoptose konnte so vermindert werden [20].

Linow et al. bestätigten die antagonisierende Wirkung vMip-II's auch in vivo in einem Mausmodell. Die Mäuse wurden mit dem murinen lymphozytischen Choriomeningitis Virus (LCM-Virus) infiziert und die Typ 1 T-Zell vermittelte Entzündungsreaktion mit vMip-II abgeschwächt [32].

vMip-II hat bereits seine hochpotente Wirkung als breiter Chemokin-Rezeptor-Anatagonist unter Beweis gestellt. Die Sequenz von vMip-II kombiniert mit einem therapeutischen Gen der Wahl in die Expressionskassette des Genoms eines Adenovirus der ersten Generation kloniert, verspricht bei gleichzeitiger Expression beider Gene eine deutliche Abschwächung der Immunantwort des Wirtes auf den adenoviralen Vektor und könnte so zu einer Langzeit-Expression des therapeutischen Gens führen. Die Immunsuppression entfaltet sich lediglich lokal, ohne systemische Nebenwirkungen. Der Einsatzbereich des Vektors Adenovirus erster Generation könnte somit auf den Bereich der chronischen Erkrankungen erweitert werden. Hierzu zählen genetische, metabolische, infektiologische und viele andere chronische Leiden.

Das in dieser Arbeit zu klonierende Shuttle Plasmid pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a enthält folgende Expressionskassette: sie besteht aus einem CMV-Promotor, der eine hohe und stabile Genexpression gewährleisten soll. Dem folgend ist das Luziferase-Gen als Reportergen zur Expressionskontrolle nachgeschaltet. Eine internal ribosome entry site (IRES) ermöglicht eine 5'-unabhängige Translation des ihr folgenden Genabschnitts auf mRNA Ebene. Dieser folgende Genabschnitt wird vom immunmodulatorischen viral macrophage inflammatory protein-II (vMip-II) ausgefüllt. Es stammt vom HHV-8 und besitzt entzündungshemmende Eigenschaften. Da bisher

noch kein Antikörper gegen vMip-II vorliegt, wird an das Ende der vMip-II-Sequenz ein sog. Flag-Tag gehängt. Es besteht aus acht Aminosäuren, ist hoch immunogen und kann mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper detektiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Auflichtmikroskop	Hund
Autoklav Sandoclav	Wolf
Biofuge pico	Heraeus
Brutschrank Bakterienkulturen	Heraeus
Brutschränke Zellkultur Hera Cell	Heraeus
Controlled Environment Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
DU 530, Life Science UV/Vis Spectrophometer	Beckmann
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	BioRad
Feinwaage HR-120	AND
Lab-Therm-Shaker	B. Braun
Luminometer Lumat LB 9507	EG&G Berthold
Magnetrührer	Cenco
Mettler PC 4400 Waage	Delta Range
Mikrowelle	Bosch
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik
PCR-Thermozykler PCR Sprint	ThermoHybaid
pH-Meter pH 358	WTW
Power Pac 200 Netzgerät	BIO-RAD
Pulse Controller Plus	BIO-RAD
RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Sorvall
Schüttler 3005	GFL

Name	Hersteller
Semidry Blot Apperatur	Invitrogen
Sepatech Megafuge 1.0R	Heraeus
Sequencer	BECKMANN-Coulter
Shaker Unimax 1010	Heidolph
Spektralphotometer SmartSpec™ 3000	BIO-RAD
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Ultrazentrifuge Typ L7-35	Beckman
UV-Kammer für Gelanalyse und Software Gel Doc 2000	BioRad
Vortexer	Braun
Wasserbad	Braun
Zentrifuge Type 5804R	Eppendorf

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Sterile Labormaterialien für die Kultivierung von Zelllinien und Bakterien wurden von den Firmen Nunc, Falcon, Nalgene und Greiner bezogen.

Materialien	Hersteller
Falcon Tubes (12 ml, 50 ml)	Bd biosciences
Filterpapier	Whatman
Nu Page Bis-Tris Gel	Invitrogen (#NP0342)
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Gilson
PVDF Transfer Membran	Amersham (#RPN303F)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 m	Eppendorf
Sterilfilter, Porenweite 0,22 µm	Schleicher & Schuell

Materialien	Hersteller
Ultrazentrifugenröhrchen ultra clear, 14 x 95 mm	Beckmann
Zellkulturschalen (94 mm, 144 mm)	Nunc

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalog-Nr.
Agarose	Merck	1.01236
Agarose, Sea Plaque	BioZym	840101
Ampicillin	Boehringer	835269
Aqua ad iniectabilia	Braun	25/12211273/1100
Borsäure	Merck	1.12015
Bromphenolblau	Merck	1.11746
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	1.02083
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	1.02950
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck	1.06580
EDTA-Dinatriumsalz-dihydrat	ROTH	8043.1
Ethanol	Merck	1.00983
Ethidiumbromid	Merck	80330704
Ficoll 400	Merck	1.00498
Glucose	Merck	1.08337
Glutaraldehyd 25%	Merck	8.20603
Glycerin	Merck	1.04093
Hefeextrakt	Merck	1.03753
Isopropanol	Merck	1.02950
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	1.05001
Kanamycin Monosulfate	Sigma	70560-51-9
Magermilchpulver	Uelzena	

Chemikalie	Hersteller	Katalog-Nr.
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck	8.14733.0100
Methanol	Merck	10608
N,N-Dimethylformamid	Merck	1.03053
Natriumacetat	Merck	1.01539
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker	2781000
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck	106462
Salzsäure (32%, HCl)	Merck	1.00319 1000
Tris (Hydroxymethylaminomethan)	Gibco	15504-020
Triton X 114	Merck	648468
Trypanblau	Merck	111732
Trypton	Merck	1.10859
Tween 20	Fluka	93773
X Gal (5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galacto-Pyranosid)	Merck	1.24655
Xylenecyanol	Merck	1.10590

3.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Rezept/Hersteller
Ampicillin Stocklösung	Ampicillin 10 mg Ethanol (70%) 1 ml
Blocking Puffer	5% Uelzena Magermilchpulver 0,1% Tween 20 in 1x PBS
Blotting Puffer	Glycin 15 g Tris 3 g Methanol 200 ml mit H_2O auf 1000 aufgefüllt

3 MATERIAL UND METHODEN

Puffer/Lösung	Rezept/Hersteller
Bovine serum albumine (BSA)	Roche (#10711454001)
CaCl ₂ (2,5 M)	CaCl ₂ -Dihydrat 36,75 g H ₂ O 50 ml Unter der Sterilwerkbank steril filtrieren Lagerung bei 4°C in Aliquots
Ethanol (70%)	Ethanol 70 ml H ₂ O 30 ml
Fetales Kälberserum	Gibco (#10084-168)
Glutaraldehyd (0,5%)	In PBS
HeBS	HEPES 5 g NaCl 8 g KCl 0,37 g Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O 0,125 g Glucose 1 g H ₂ O ad 1 l pH Einstellung mit HCl auf pH 7,1 Autoklavieren und bei 4°C lagern
Hefeextrakt (5%)	in H ₂ O
HEPES Puffer (1M)	Gibco (#15630-056)
Kanamycin Stocklösung	Kanamycin 10 mg Ethanol (70%) 1 ml
L-Glutamin (200 mM)	Gibco (#25030-024)
NuPage MOPS SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen (#1147745)
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco (#15140-122)
Pferdeserum	Gibco (#16050-080)
Phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco (#14190-094)

3 MATERIAL UND METHODEN

Puffer/Lösung	Rezept/Hersteller
Probenpuffer (6x)	Bromphenolblau 0,25 ml Xylenecyanol 0,25 ml Ficoll 400 1,5 ml H ₂ O 8,0 ml
SDS Sample Buffer (3X)	SDS 600 mg Glycerol 3 ml DTT (0,5M) 3 ml Bromphenolblau 30 mg Tris/HCl (pH 6,8) (0,5M) 3,75 ml Mit H ₂ O auf 10 ml aufgefüllt
Sequencing Buffer (2,5x)	Applied Biosystems
TBE Puffer (5X)	Tris 60,50 g Borat 30,86 g EDTA 7,44 g H ₂ O ad 2,0 L
Tris-HCl 0,5M pH 7,4	Tris 6,06 g H ₂ O 80 ml Mit HCl pH 7,4 einstellen Auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco (#25300-054)
X-Gal Färbe-Lösung	MgCl ₂ (1M) 266 µl NaCl (5M) 600 µl HEPES (Ph 7,4) 8,8 ml Fe ²⁺ (MW442) 0,25 g Fe ³⁺ (MW329) 0,2 g X-Gal (2,5%) 5 ml H ₂ O ad 200 ml

3 MATERIAL UND METHODEN

Puffer/Lösung	Rezept/Hersteller
X-Gal (2,5%)	X-Gal 100 mg
	N,N-Dimethylformamid 5 ml

3.1.5 Kulturmedien

Medium	Rezept/Hersteller
293-Zellmedium	HGDMEM 500 ml
	Penicillin/Streptomycin 5 ml
	(100x)
	L-Glutamin2 (200 MM) 5 ml
	Fetales Kälberserum 50 ml
Agarose Overlay	Lösung 1:
	SeaPlaque Agarose 2 g
	H ₂ O 250 ml
	Autokolavieren und auf 37°C halten
	Lösung 2:
	Modified Eagle Medium (2x) 250 ml
	Penicillin/Streptomycin (100x) 5 ml
	L-Glutamine (200 mM) 5 ml
	Hefeextrakt (5%) 5 ml
	HEPES Puffer 2,5 ml
	Pferdeserum 25 ml
	Lösung 1 + 2 werden unmittelbar vor Gebrauch auf 37°C gebracht, zusammengeführt und geschwenkt
Einfriermedium für 293-Zellen	293-Zellmedium 9,5 ml
	DMSO 0,5 ml

Medium	Rezept/Hersteller
High Glucosed Dulbecco's Modified Eagle Medium (HGD MEM)	Gibco (#41966-052)
LB-Agar	Trypton 10,0 g Hefe-Extrakt 5,0 g NaCl 10,0 g Agar-agar 15,0 g H ₂ O ad 1,0 L pH-Einstellung mit NaOH auf pH 7,0
LB-Medium	Trypton 10,0 g Hefe-Extrakt 5,0 g NaCl 10,0 g H ₂ O ad 1,0 l pH-Einstellung mit NaOH auf pH 7,0
Modified Eagle Medium (2x)	Gibco (#21935-028)
SOC-Medium	Trypton 20 g Hefe-Extrakt 5 g NaCl 0,6 g KCl 0,5 g H ₂ O ad 1l pH-Einstellung mit NaOH auf pH 7,0

3.1.6 Reagenzienkits

Name	Hersteller	Katalog-Nr.
BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix	Applied Biosystems	4337454

Name	Hersteller	Katalog-Nr.
DC Protein Assay	BioRad	
Reagent A		500-0113
Reagent B		500-0114
DyNAzym™ II DNA Polymerase	Finnzyme	F-550L
Luciferase Assay Kit	Promega	E1501
Plasmid preparation Kit, Mini, Midi, Maxi	Qiagen	12125 (Mini)
		12243 (Midi)
		12263 (Maxi)
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen	28704

3.1.7 Enzyme

Alle enzymatischen Reaktionen wurden mit den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

Enzyme	Hersteller	Katalog-Nr.
BamH I	Roche	567 604
Bgl II	Roche	567 639
EcoR V	Roche	667 153
Hind II	Roche	656 321
Not I	Roche	1014714
Sal I	Roche	567 663
Xba I	Roche	674 257
Xho I	Roche	899 194
Pfu DNA Polymerase	Promega	M7745
T4 DNA Ligase	Boehringer-Roche	799009
Taq DNA Polymerase	Q Biogene	ETQA100
Shrimp alkalische Phosphatase	Roche	1 758 250

3.1.8 Molekulargewichtstandards

Molekulargewichtstandard	Hersteller	Katalog-Nr.
DNA Standard Marker	Finnzyme	F-550L
Rainbow coloured protein molecular weight marker	Amersham	RPN756

3.1.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG bezogen.

Name	Sequenz
vMipII-HindII-for	5' – CCAAGCTTATGGACACCAAGGGCATCC – 3'
vMipII-Sall-rev	5' – CCGTCGACGCGAGCAGTGA CTGG – 3'
vMipII-Tag-XbaI-for	5' – CCTCTAGAATGGACACCAAGGGCATCC – 3'
vMipII-Tag-NotI-rev	5' – CGCGGCCGCTACTTATCGTCGTCATCC – 3'
IRES-sense	5' – CGATGATAAGCTTGC – 3'
Primer-6-antisense	5' – AAGGACAGTGGGAGTGG – 3'
Luc-BglII-sense	5' – CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGG – 3'

3.1.10 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.
Anti-FLAG M2 Antikörper	Stratagene	200471
Goat Anti-Mouse IgG-AP	Southern Biotech	1031-04

3.1.11 Plasmide

Plasmid	Resistenz	Herkunft	Katalog-Nr.
pRC.CMV- β -Gal	Ampicillin	Perricaudet, Institut Gustav Roussy, Villejuif, France	
pJAG.vMip-II	Ampicillin	J.S. Bromberg, Carl C. Icahn Center for Gene Therapy and Molecular Medicine , Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA	
pCMV.Tag4a	Kanamycin	Stratagene	211170
pIRES	Ampicillin/ Neomycin	Clontech	6028-1
pBS.Luc	Ampicillin	H. Ortlepp, Medizinische Klinik, UKE-Hamburg, Deutschland	
pAd.CMV	Ampicillin	S.L. Savio Woo, Carl C. Icahn Center for Gene Therapy and Molecular Medicine , Mount Sinai School of Medicine, NY, USA	
pBHG-10	Ampicillin	F. Graham, Mc Master University, Hamilton, ON, Canada	
pUC 18	Ampicillin	Invitrogen	18258-012

3.1.12 Bakterien

E. coli DH5 (Stratagene)

3.1.13 Viren

Ad5-Luc (A. Block, Medizinische Klinik, UKE-Hamburg)

3.1.14 Zellen

Zelllinie 293-Zellen (humane embryonale Nierenkarzinomzellen, die stabil mit den Basenpaaren 1 - 4344 des adenoviralen Genoms transfiziert ist (Graham *et al.*, 1977))

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

Sterilisation

Hitzestabile Medien, Puffer und Gerätschaften wurden unter Dampfdruck bei 121°C und 1,5 bar in einem Autoklaven für 20 Minuten autoklaviert, hitzesensitive Lösungen unter der Sterilwerkbank durch einen Filter (Porengröße 0,2 µm) filtriert.

DNA Fällung

Zur DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen 3M Na-Acetat, pH 5,5 und 2,5 Volumen 100%iger Ethanol gegeben und ü.N. bei -20°C gefällt. Die Probe wurde anschließend bei 12000-17000g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Die erhaltenen Präzipitate wurden mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in Aqua inieciabilia aufgenommen.

OD-Messung von Bakterienkulturen

Die Trübung einer Bakterienkultur wurde durch die Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 546 und 600 nm gemessen.

DNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit einem Spektralphotometer bei 260 nm. Um eine Protein-Verunreinigung der DNA-Lösung auszuschließen, wurde zusätzlich beim Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren von 280 nm gemessen. Der Quotient E260/E280 sollte hierbei zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Größenbestimmung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese benutzt. Agarose ist ein Polysaccharid, welches von roten Meeresalgen abstammt. Nach Lösung in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen und

anschließendem Abkühlen geliert die Agarose zu einer siebartigen Netzstruktur. Nukleinsäuren liegen durch die ionisierten Phosphatgruppen als Anion vor und wandern im elektrischen Feld zur Kathode. Durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten wird die DNA durch den Siebeffekt der Agarose der Größe nach aufgetrennt. Zur Anfärbung der DNA wird dem Gel Ethidiumbromid zugefügt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und erscheint nach Anregung mit UV-Licht (254, 302 oder 366nm) im sichtbaren Bereich (389-711 nm) als leuchtende Bande. Je nach Größe wurde die DNA in 0,7 - 2%ige Agarose-Gele in 1x TBE-Puffer bei 50 - 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele enthielten 500ng/ml Ethidiumbromid. Die DNA wurde mit 10% Probenpuffer versetzt.

Endotoxinextraktion

Die DNA-Lösung wurde mit 3 M Natriumacetat, pH 7,5 auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt. Pro 100µl DNA-Lösung wurden 3µl Triton X 114 zugegeben. Das Triton X 114 wurde zuvor dreimal dem Temperaturwechsel 3 Minuten auf Eis und anschließend 3 Minuten im 30°C Wasserbad unterzogen. Die Lösung wurde vermenget, für 10 Minuten auf Eis gelagert und anschließend für 5 Minuten in ein 30°C Wasserbad gebracht. Um die Lipid- von der Wasserschicht zu trennen, wurde das Gemisch 1 Minuten bei 8000 rpm und 30°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in eine neue Eppendorftube überführt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Protein-Bestimmung

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) beruht auf der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465nm zu 595nm, wobei die Zunahme der Absorption bei 595nm ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung ist. Der DC Proteinassay (BioRad) funktioniert nach dem gleichen Prinzip. Der DC-Protein-Assay wurde nach Empfehlungen des Herstellers (BioRad) durchgeführt.

Western-Blot

Der Western-Blot dient dem Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch. Dazu wird das Proteingemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die nun fixierten Proteine können mit einem geeigneten Antikörper markiert

und einem Zweitantikörper-Enzym-Konjugat mit dazugehöriger Substratlösung detektiert werden.

15 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 9 µl Ladepuffer versehen. Die Proteine wurden für 10 Minuten bei 100°C denaturiert. Das Probengemisch wurde in einem 12% Acrylamid-SDS-Gel bei 200 V für 45 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurde ein Protein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Die aufgetrennten Proben wurden anschließend auf eine PVDF Transfer Membran geblottet. Dazu wurden die Bindungsstellen der Membran durch Schwenken in 100% Methanol aktiviert. Membran, Gel und Filterpapier wurden in Blotting-Puffer equilibriert, und in der Reihenfolge Filterpapier – Membran – SDS-Gel – Filterpapier in eine Semidry Blot Apparatur geschichtet. Das Blotten fand für 1h bei 130 mA statt. Nach erfolgtem Transfer wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mit Blocking Puffer ü.N. bei 4°C unter kontinuierlichem Schwenken abgesättigt.

3.2.2 Klonierungsmethoden

Bakterienkultur

Bakterien wurden über Nacht in LB-Medium bzw. auf Agar-Platten bei 37°C unter aeroben Bedingungen und 100-200 rpm im Schüttler bzw. im Brutschrank kultiviert. LB-Medium-Kulturen wurden für 16-24 h (je nach Plasmidgröße) bis zum Maximum der Wachstumskurve bei 100-200 rpm inkubiert und geerntet. Es wurde je nach Resistenzgen des transformierten Plasmids Ampicillin bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 50µg/ml zugefügt.

Herstellung transformationskompetenter Bakterien

100 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie E. coli DH5α beimpft und bei 37°C, 120 Upm inkubiert, bis die OD₅₇₈ 0,25 - 0,4 betrug (nach etwa 3 h). Anschließend wurden je 50 ml der Kultur in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 Minuten, 4000 Upm, 4°C) sedimentiert, in 10 ml eiskalte 0,1 M CaCl₂ aufgenommen und für 45 Minuten auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten, 4000 Upm, 4°C) wurden die Zellen in 2 ml

eiskaltes 0,1 M CaCl_2 -Lösung aufgenommen. Dazu wurden 1 ml 50%iges Glycerol und 150 μl 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4) gegeben und dieser Ansatz erneut für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Die kompetenten Zellen wurden in 100 μl -Aliquots nach Schockgefrierung auf Trockeneis bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Plasmidpräparation aus E.coli

Bei der Plasmidpräparation aus E.coli Kulturen wurde nach dem QIAGEN® Plasmid Purification Protokoll verfahren. Der Bakterieninhalt wird bei dem Verfahren durch alkalische Lyse der Zellwand freigesetzt. Chromosomale DNA, Proteine, etc. werden durch NaOH denaturiert, wobei Plasmid DNA durch die kurze Einwirkzeit weitestgehend intakt bleibt. Zugabe von Kalium-Acetat führt zur Ausfällung chromosomaler DNA, Zelltrümmer, etc., Plasmid DNA hingegen bleibt in Lösung. Nach Zentrifugation der Präzipitate wird die gelöste, negativ geladene Plasmid DNA an eine positiv geladene Anionen-Austauscher-Säule gebunden. Letzte Reste von Verunreinigungen werden mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration ausgewaschen, während die Plasmid DNA sich erst unter hohen Salzkonzentrationen eluieren lässt. Die gelösten Plasmide werden mit Isopropanol gefällt, sedimentiert und mit Ethanol (70%) gewaschen, um Restsalze zu entfernen. Nach Trocknung unter sterilen Bedingungen bei RT wurde die DNA in Aqua iniectionis aufgenommen.

Cryokonservierung von Bakterien

Zur Cryokonservierung transformierter Bakterien wurde eine über-Nacht-Kultur in Selektiv-LB-Medium mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 30%) und bei -80°C in einem 1,5 ml Eppendorf tube gelagert.

Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die von Bakterien stammen und doppelsträngige DNA an bestimmten, meist palindromischen, Erkennungssequenzen trennen. Zur DNA-Lösung (3-5 μg) wurde 1/10 Volumen vom Gesamtreaktionsansatz des jeweiligen Restriktionspuffers (10x) und 1 μl Restriktionsenzym gegeben. Das Gemisch wurde mit destilliertem Wasser auf 10-30 μl aufgefüllt und bei 37°C ü.N. inkubiert.

DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen

Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,7%igen Agarose-Gel elektrisch isoliert, unter Durchleuchtung mit 366 nm UV-Licht ausgeschnitten und nach dem QIAquick Gel Extraction Kit Protokoll weiter behandelt. Das Prinzip beruht auf einer pH und Salzkonzentration abhängigen Bindung der DNA an eine Silika-Matrix, während Verunreinigungen, wie Agarose, Enzyme, Nukleotide, etc. ausgewaschen werden. Die Elution der DNA erfolgt dann bei niedrigen Salz- und basischen pH-Bedingungen mit Wasser. Wegen der Gefahr der DNA-Schädigung wurde die UV-Licht Bestrahlung auf ein Minimum reduziert und infolgedessen auf Fotos der Banden verzichtet.

Dephosphorylierung

Um die Religation eines „blunt end“ linearisierten Vektors in einer Ligationsreaktion zu verhindern, wurden die Enden zuvor mit der Shrimp alkalischen Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Dazu wurden nach dem Restriktionsverdau 1/10 Volumen Dephosphorylierungspuffer und 1U SAP zum Reaktionsansatz gegeben und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die SAP für 15 Minuten durch Erhitzung auf 65°C inaktiviert.

Ligation

Um ein DNA-Fragment in einen linearisierten Vektor einzufügen, werden das 3'-Hydroxyl- und das 5'-Phosphatende mit einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Diese Verbindung wird durch eine Ligase katalysiert. Das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert betrug bei „sticky end“ Ligationen 1:3, bei „blunt end“ Ligationen 1:5, wobei bis zu 1µg Vektor verwendet wurde. Es wurde jeweils eine Kontrolle ohne Insert-DNA mitgeführt, um die Religationsrate abschätzen zu können. Zum Reaktionsansatz wurde 1/10 Volumen Ligationspuffer (10x) und 1U T4 DNA Ligase gegeben. Der Ansatz wurde mit Aqua ad iniectabilia auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und bei 16°C ü.N. inkubiert.

Chemische Transformation von Bakterien

Um Plasmid DNA zu konservieren, wurde sie in kompetente *E.coli* transformiert.

Es wurden 2µl Plasmid zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen pipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Ein Kontrollansatz bestand in der Transformation des Plasmids pUC18, zur Bestimmung der Kompetenz der Zellen. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42°C für 30 sec unterzogen, wonach sie sofort für 2 Minuten auf Eis gelagert wurden. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden sie für 1h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 200 µl einer 1:5 Verdünnung auf einer LB-Agar-Platte mit Antibiotikazusatz ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden in LB-Medium für 16-24h kultiviert, einer Plasmidpräparation unterzogen und per Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese auf Richtigkeit überprüft.

PCR

Die PCR ist eine Standardmethode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dabei dient doppelsträngige DNA als Matritze (Template). Zwei, zu den Einzelsträngen komplementäre, gegenläufige Oligonukleotide (Primer) dienen der DNA-Polymerase als Replikationsstart. Durch abwechselnde Zyklen von Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und Synthese des komplementären Stranges kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung des von den Primern flankierten Fragments.

Standardmäßig wurde die PCR mit Hilfe des DyNAzyme TM DNA Polymerase Kit (*Finnzyme*) in einem PCR Thermozykler (*ThermoHybaid*) durchgeführt. In einem 50 µl Ansatz wurde ca. 25-100 ng Template-DNA, Primer in einer Konzentration von 0,3µM, dNTPs mit je 200µM, 2 U Polymerase und der Optimized –DyNAzyme TM-buffer eingesetzt. Initial wurde die DNA zwei Minuten bei 94°C denaturiert, in den anschließenden Zyklen für nur 40s. Für die Anlagerung der Primer wurde die Temperatur für 30s auf 55°C abgesenkt. Der Zweitstrang wurde bei 72°C synthetisiert, wobei sich die Dauer nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes richtete und mit etwa 1min/kb angesetzt wurde. In der Regel wurden 25 Zyklen durchlaufen, worauf sich eine 7-minütige Synthesephase anschloss, um eine vollständige Komplettierung aller Einzelstränge zu gewährleisten. Anschließend

wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Kontrolle der PCR fand in einer anschließenden Agarosegelelektrophorese statt. Sollte die amplifizierte DNA kloniert und sequenziert werden, so wurde die Pfu Polymerase (*Promega*) mit proofreading Aktivität verwendet.

Einfügen von Restriktionsstellen

Bei manchen Klonierungsschritten waren keine geeigneten Restriktionsschnittstellen, entweder beim Plasmid, oder beim Insert vorhanden. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurden geeignete Schnittstellen am 5'- und am 3'-Ende des Inserts generiert. Dazu wurden Primer konzipiert, die mit den Basensequenzen der jeweiligen Enden des zu klonierenden Inserts übereinstimmen. Abweichend von diesen Basenabfolgen wurden Sequenzen der gewünschten Restriktionsenzyme an eine geeignete Position gesetzt. Das Insert-tragende Plasmid wurde mit den generierten Primern einer PCR unterzogen. Das so entstandene Amplifikat erhielt nun die in den Primern enthaltenen Sequenzen für die Restriktionsenzyme. Das noch blunt-end Insert wurde in einem der PCR nachgeschalteten Verdau mit den dazugehörigen Enzymen sticky-end geschnitten und später in die Klonierungsreaktion eingesetzt.

Sequenzierung

Die verwendete Methode basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruchs- bzw. Didesoxynukleotidverfahrens (Sanger *et al.*, 1977).

Der Sequenzierungsansatz bestand aus ca. 500 ng des Plasmids, 15 pMol des jeweiligen Primers, 2 µl BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix und 6 µl 2,5x Sequencing Buffer. Die verwendete DNA aus einer Maxipräparation wurde vorher durch eine Ethanolfällung aufgereinigt und in Aqua dest. aufgenommen. Die photometrisch gemessene 260/280 nm Ratio sollte mindestens 1,8 betragen.

Es wurde folgendes Sequenzierungsprogramm im Thermozykler durchgeführt:

25 Zyklen:

96°C 10 Sekunden

50°C 5 Sekunden

60°C 4 Minuten

Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einem Standard 1,5 ml Eppendorftube mit 80 µl 0,3 M Natriumacetat aufgefüllt, mit 300 µl Ethanol versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die DNA sedimentiert und anschließend luftgetrocknet.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI-Sequenator 377 durch das Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des UKE. Es wurde sowohl die Sense-, als auch die Antisenseorientierung sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen für beide Orientierungen wurden mit der Software MacMolly Tetra (Soft Gene) auf Kongruenz untereinander untersucht.

3.2.3 Klonierung von pAd.CMV-Luc.IRES.vMip-II.Tag4a

Klonierung von pCMV.vMip-II.Tag4a

Die Sequenz des Zielgens vMip-II wurde vor die FlagTag-Sequenz in den Klonierungsvektor pCMV.Tag4a kloniert. Da die MCS des pJAG.vMip-II Vektors (freundlicherweise überlassen von Dr. Bromberg) bei der Insertion verloren ging, wurde an das 5' – Ende von vMip-II eine Hind III Schnittstelle und an das 3' – Ende eine Sal I Schnittstelle mittels PCR (Primer: vMipII-Hind-for, vMipII-Sall-rev) eingefügt. Das Amplifikat wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese gereinigt und anschließend mit den Enzymen Hind III und Sal I verdaut, um „sticky ends“ zu generieren. Der pCMV.Tag4a Vektor (*Stratagene*) wurde mit den Enzymen Hind III und Xho I linearisiert sowie mit einer preparativen Gelelektrophorese gereinigt. Durch den Verdau der Sall und XhoI Enden entstehen identische Überhänge. Linearisierter Vektor und Insert wurden in einer Ligations-Reaktion zusammengefügt und in kompetente Zellen transformiert. Die Zellen wurden auf Kanamycin-haltigen Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zehn Klone wurden für 16h in Kanamycin-haltiger LB-Medium bei 37°C, 120 rpm kultiviert und anschließend einer Plasmidpräparation unterzogen. Der Insertionserfolg wurde mittels PCR (Primer: vMipII-Tag-XbaI-for und vMipII-Tag-NotI-rev) geprüft. Das vMip-II.Tag4a-Amplifikat wurde vor der Ligation auf Kopierfehler der Pfu-Polymerase durch eine Sequenzierungsreaktion überprüft.

Klonierung von pIRES.vMip-II.Tag4a

Die Expressionskassette vMip-II.Tag4a wurde hinter das IRES-Segment des Vektors pIRES (*Clontech*) eingefügt werden. Das zuvor generierte Plasmid pCMV.vMip-II.Tag4a enthielt allerdings keine geeigneten Restriktionsschnittstellen, um die Kassette in die MCS B des Vektors pIRES zu klonieren. Deshalb wurden auch hier Schnittstellen per PCR (Primer: vMipII Tag-XbaI-for; vMipII Tag-NotI-rev.) an die jeweiligen Enden eingefügt. Das Amplifikat wurde mit einer preparativen Gelelektrophorese gereinigt und mit den Enzymen XbaI und NotI verdaut. Der Vektor pIRES wurde mit den gleichen Enzymen linearisiert und anschließend per Gelelektrophorese gereinigt und prepariert. Insert und Vektor wurden ligiert, in kompetente *E.coli* transformiert, auf Ampicillin-haltige Agar-Platten ausplattiert und schließlich bei 37°C ü.N. inkubiert. Zehn Klone wurden in Ampicillin-haltigem LB-Medium kultiviert, die Plasmide präpariert und einem Kontrollverdau mit XbaI und NotI unterzogen.

Klonierung von pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a

Das Luziferase-Gen wurde aus dem Vektor pBS.Luc mit dem Enzym XhoI herausgeschnitten, gereinigt und in den zuvor ebenfalls mit XhoI linearisierten und anschließend dephosphorylierten Vektor pIRES.vMip-II.Tag4a kloniert. Nach Transformation und Kultivierung der erhaltenen Klone wurden die präparierten Plasmide durch einen Verdau mit XhoI auf eine Luc-Insertion überprüft. Bei positivem Ergebnis wurde die richtige Orientierung mit einem BglII Verdau kontrolliert.

Klonierung von pAd-CMV.Luc

Das adenovirale Expressionsplasmid pAd-CMV wurde mit der Restriktionsendonuklease HindIII und dem blunt-end-cutter EcoRV geöffnet. Das Luziferase-Gen wurde aus dem zuvor generierten Plasmid pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a mit den gleichen Enzymen isoliert und in den Expressionsvektor ligiert. Das weitere Verfahren wurde analog zu 2.4.1. durchgeführt. Mit einem HindIII/EcoRV Verdau wurde der Ligationserfolg überprüft.

Klonierung von pAd.CMV-Luc.IRES.vMip-II.Tag4a

Aus dem pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a Vektor wurde die -IRES.vMip-II.Tag4a- Sequenz mit den Enzymen EcoRV und NotI herausgeschnitten. Das zuvor generierte pAd-

CMV.Luc Plasmid wurde mit den gleichen Enzymen mit Schnittstellen hinter der Luc-Sequenz geöffnet und das Insert in einer Ligationreaktion eingefügt.

Das fertige adenovirale Expressionsplasmid wurde mit den Primern IRES-sense, Luc-BglII-sense, Primer-6-antisense auf korrekte Ligation und Klonierungsfehler sequenziert.

3.2.4 Zellkulturmethoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden ohne Ausnahme unter der Sterilwerkbank ausgeführt. Für die Kultivierung der 293-Zellen wurde 293-Zellmedium verwendet.

Aussäen tiefgefrorener Zellen

Die Zellen wurden bei RT aufgetaut und rasch in eine mit 20 ml 293-Zellmedium gefüllte 144 mm Zellkulturschale gegeben, gründlich geschwenkt und bei 37°C und 5% CO² inkubiert. Nach frühestens 6h, aber spätestens 24h wurde ein Mediumwechsel vollzogen, um das im Einfriermedium enthaltene und bei 37°C für die Zellen toxische DMSO zu entfernen. 6h brauchen die Zellen, um fest an der Zellkulturplatte zu haften.

Zellpassage

Nach Absaugen des Mediums wurde mit 5 ml PBS das restliche FCS von den Zellen gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin und einer Einwirkzeit von 2 Minuten bei 37°C von der Schale gelöst und in 10 ml HGDME-Medium in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm und 6°C für 6-12 Minuten abzentrifugiert, mit 5 ml HGDME-Medium resuspendiert und erneut auf die gewünschte Plattenanzahl ausgesäht.

Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden bei -80°C in DMSO-haltigen Einfriermedium gelagert. DMSO verhindert die Kristallisation von Wasser innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas.

Die Zellen wurden wie bei der Passagierung mit Trypsin-EDTA in Suspension gebracht, nach Zentrifugation in Einfriermedium resuspendiert und in 2 ml Kryotubes bei -80°C gelagert.

Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Differenzierung lebender und toter Zellen wurden diese nach einer Trypsinierung und Resuspension in einem Verhältnis von 1:5 mit Trypanblaulösung (0,4% in H_2O) für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschleusen und erscheinen unter dem Mikroskop hell. Tote Zellen sind dagegen tiefblau gefärbt.

Kalzium-Chlorid-Co-Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden fünf 144 mm Zellkulturschalen mit 293-Zellen einer Konfluenz von ca. 90% auf 20 x 94 mm Zellkulturschalen gesplittet, die am nächsten Tag wieder eine Konfluenz von etwa 90% zeigten. Die beiden adenoviralen Plasmide pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a und pBHG-10 lagen steril in 0,1X TE-Puffer (pH 7,6) mit einer Konzentration von 500-1000 ng/ml vor. Jeweils 15-20 μg beider Plasmide wurden in 19 Polystyrenröhrchen (12 x 75 mm) steril pipettiert, welche 1,5 ml HEPES enthielten. Ein Röhrchen erhielt 15 μg des Plasmids pRC.CMV- β -Gal in 1,5 ml HEPES für eine spätere Transfektionskontrolle.

Tröpfchenweise wurden nun 75 μl einer 2,5 M CaCl_2 Lösung zu jedem Röhrchen zugeführt und nach jedem Tropfen die Lösung vermenget. Nach erneutem Mixen inkubierten die Lösungen 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur und bildeten einen feinen Niederschlag aus. Diese Lösung wurde direkt in die 20 x 94 mm Petrischalen auf die 293-Zellen pipettiert, ohne das Nährmedium vorher zu entfernen. Die Zellkulturschalen wurden geschwenkt und 4,5 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach dieser Zeit wurde zunächst das Nährmedium der Petrischale entfernt, die das Plasmid pRC.CMV- β -Gal erhalten hat, und durch 10 ml frisches Nährmedium ersetzt. Am nächsten Tag wurde eine β -Galaktosidase-Färbung durchgeführt.

Bei den anderen 19 Platten wurde das Nährmedium durch 20 ml eines Agarose-Nährmediumgemisches (Agarose-Overlay-Lösung) ersetzt. Die beiden Lösungen 1+2 wurden unmittelbar vor Gebrauch auf 37°C gebracht und zusammengegeben.

Die overlay-Lösung wurde sehr vorsichtig über den Rand der Petrischale auf den Zellrasen pipettiert, um diesen nicht durch Scherkräfte der zähflüssigen Agarose zu zerstören. Nach Erhärtung des Gemisches wurden die Petrischalen bei 37°C und 5% CO₂ für ca. 3 Wochen inkubiert. Alle 4 bis 5 Tage wurden 8 bis 10 ml des Agarose-Overlay hinzu pipettiert, um den Stoffwechsel der Zellen aufrecht zu erhalten. Ab dem 5. Tag wurden die Platten täglich auf verdächtige zytopathische Effekte (CPE) untersucht. Die Areale erscheinen charakteristischerweise als kreisrunde Aufhellung („Plaque“) im Zellrasen, die mit dem bloßen Auge erkennbar sind. Um plaqueverdächtige Areale zu isolieren wurde mit einer abgeschnittenen 1ml Pipettenspitze das Areal zusammen mit dem Agarose-Overlay aspiriert und in 1ml 293-Nährmedium bei – 80°C gelagert.

β-Galaktosidase-Färbung

In Transfektionsstudien wird oft das Gen für β-Galaktosidase aus *E. coli* als Referenzmaß verwendet (Hall et al., 1983). Das Prinzip beruht auf der Umwandlung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galacto-Pyranosid zu 5-Bromo-4-chloro-indigo, das eine blaue Färbung aufweist (Pearson et al., 1963).

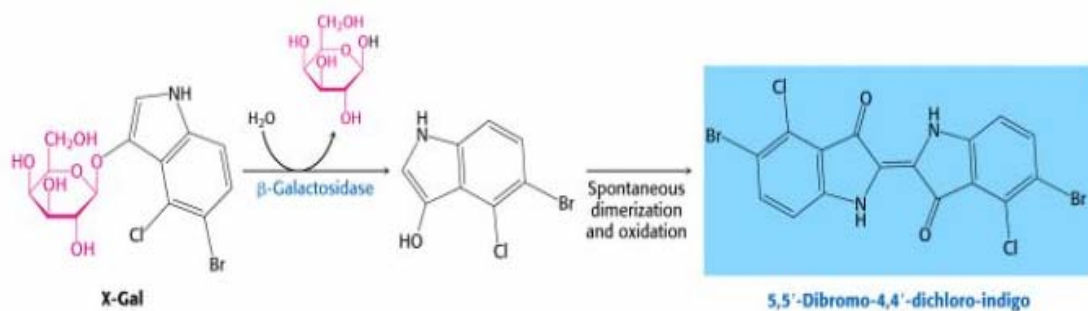


Bild 3.10: Reaktionsformel 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galacto-Pyranosid zu 5-Bromo-4-chloro-indigo (modifiziert nach Pearson)

Einen Tag nach der Transfektion mit dem Plasmid pRC.CMV-β-Gal wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation mit 5 ml einer 0,5%tigen Glutaraldehydlösung. Anschließend wurden die

Zellen erneut zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Nun folgte die Zugabe von 5 ml X-Gal Färbelösung und eine Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Nach 24 Stunden konnte der prozentuale Anteil der blaugefärbten Zellen als ein Maß für die Transfektionseffizienz bestimmt werden.

CPE-Assay

Die von den 94 mm Petrischalen isolierten plaqueverdächtigen Areale wurden auf eine Virusneubildung untersucht. Dazu wurden zunächst die aspirierten Plaques dreimal einem Auftau-Einfrier-Zyklus unterzogen, indem die Eppendorftubes mit den im 293-Medium enthaltenen Plaques erst in ein 37°C Wasserbad und dann in ein Trockeneis-Ethanol-Bad überführt wurden. Durch diese Prozedur brechen die Zellmembranen auf, und das in der Zelle potentiell enthaltene Virus steht für eine Infektion bereit. In einer 24-well Platte wurden nun 75.000 x 293-Zellen pro well ausgesät, die 24 Stunden später mit 300 µl der Suspension aufgebrochener Plaques infiziert wurden. Dazu wurde das Nährmedium von den 293-Zellen entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen wurden die 300 µl hinzupipettiert und die Zellen für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde mit 700 µl Nährmedium auf 1 ml aufgefüllt und die Zellen für 2-5 Tagen im Brutschrank inkubiert.

Das Vorhandensein eines Virus wird durch einen zytopathischen Effekt der 293-Zellen innerhalb von 2 bis 5 Tagen angezeigt. Die Zellen beginnen sich abzurunden, verlieren schließlich die Adhärenz und schwimmen frei im Medium.

Luziferase-Assay

Das Enzym Luziferase kommt in der Natur bei Glühwürmchen, Leuchtkäfern und Leuchtbakterien vor. Es katalysiert die Umwandlung von Luziferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg²⁺ in Oxyluziferin.

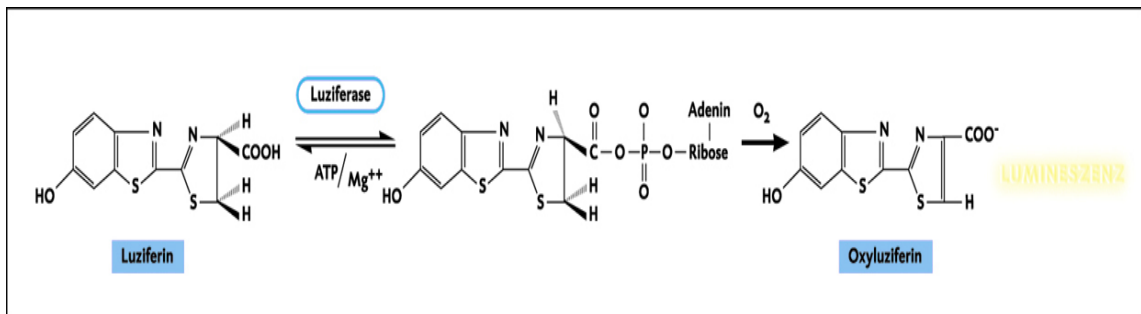


Bild 3.11: Luziferasereaktion (Quelle: Promega)

Bei dieser Reaktion wird Licht in einer Wellenlänge von 562nm emittiert. Diese Lichtemission kann im Luminometer quantifiziert werden.

Die Überstände infizierter bzw. transfizierter Zellen wurden geerntet, für 2 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und auf Luziferase-Expression untersucht. Bis zur Luziferase-Messung wurden die Proben aufgrund des schnellen Zerfalls der Luziferase auf Eis gelagert. Es wurden zu je 20 µl des Überstandes 100 µl Luziferase-Substrat gegeben und die Lumineszenz nach 1 sec Verzögerung für 10 sec. im Luminometer gemessen. Im Luminometer wurden die relativen light units (rlu) als ein Maß für die Luziferasekonzentration in den Überständen bestimmt. Mit Hilfe rekombinanter Luziferase wurde eine Standardkurve für die Luziferasekonzentrationen aus den rlu-Werten berechnet.

Eskalations-Assay

Nach erfolgreicher Generierung des Plasmids p.Ad-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a wurde die Expressionskassette auf Funktionaliät überprüft.

Dazu wurden auf 4 x 6-well-Plates 700.000 293-Zellen pro well ausgesäht und ü.N. bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in halblogarhythmisch ansteigenden Konzentrationen mit pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a transfiziert:

0,01 0,03 0,1 0,3 1,0 3,0 10 und 30µg

Jede Konzentration wurde auf 3 verschiedene wells gegeben. Die Überstände wurden 24h später einem Luziferase-Assay unterzogen. Die innerhalb von 24h produzierte Menge Luziferase wurde so gemessen und galt als Maßstab für die von der transfizierten Plasmidmenge abhängigen Genexpression.

Suppressions-Assay

Es wurden auf 6 x 96mm Zellkulturplatten 293-Zellen mit einer Dichte von 70% ausgesäht. Die Hälfte der Platten wurde mit 7,5 µg des Plasmids PAd.CMV-Luc.IRES.vMip-II.Tag4a transfiziert. Nach 24h wurden die Überstände (10ml/Platte) geerntet.

Auf 2 x 24 well Platten wurden 75.000 293-Zellen pro well ausgesäht. Nach 24h wurde das Medium abgenommen. Die Zellen der ersten 24 well Platte wurden mit je 1ml des zuvor gewonnenen Überstandes der mit pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a transfizierten Zellen beschickt, die Zellen der zweiten Platte mit je 1ml Überstand der nicht transfizierten Zellen der 96mm Platte. Wieder folgte eine 24h-Inkubation. Anschließend wurden alle Zellen der 24 well Platten mit dem Virus Ad5-Luc infiziert. Die Überstände wurden 24h nach Virus-Infektion geerntet, für 2 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und einer Luziferase-Messung unterzogen.

4 Ergebnisse

4.1 Der klonierte Vektor p.CMV-Luc.IRES.vMip-II.Tag4a

4.1.1 Der klonierte Vektor pCMV.vMip-II.Tag4a

Die Proben 2-7 der PCR-Amplifikation mit den Primern vMipTag-Xba I und vMipTag-Not I zeigten in der Agarosegelelektrophorese die erwartete Größe von ca. 310 Basenpaaren, welche den Genabschnitten vMip-II.Tag4a entsprechen.

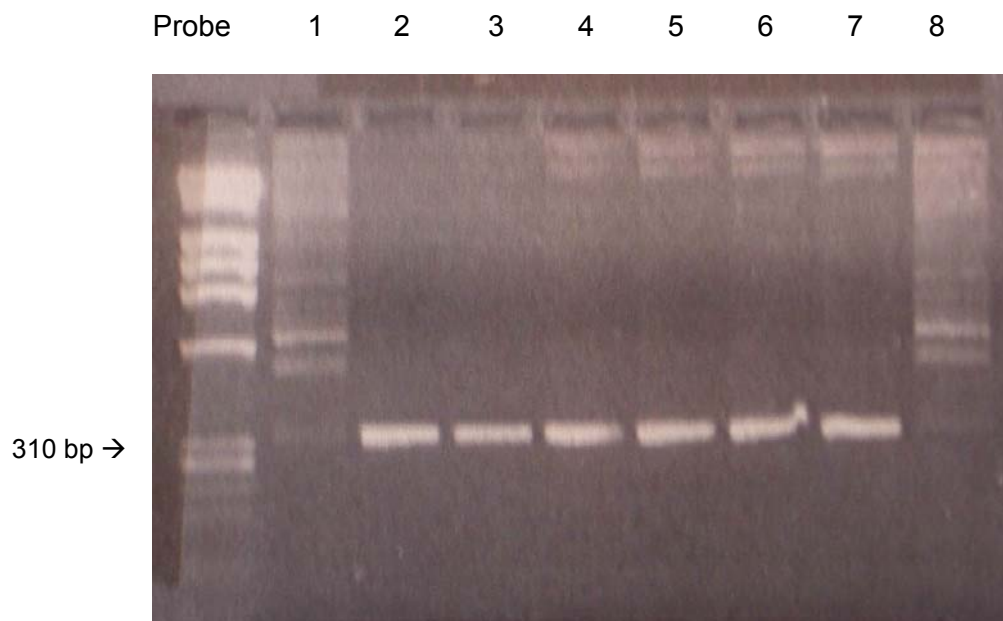


Bild 4.1: PCR pCMV.vMip-II.Tag4a (Primer: vMipII-HindIII, bzw. vMipII-Sall)

Die Sequenzierungsreaktion des PCR-Produktes mit den Primern vMipII-Hind III, bzw. vMipII-Sal I ergab die Sequenz des vMip-II (*Quelle: NCBI Sequence Viewer*). Das generierte Plasmid enthält unter der Kontrolle des CMV-Promotors das HHV-8 Gen vMip-II, welches vor das Flag-Tag4a liegt.

Probe 1 wurde für den folgenden Klonierungsschritt verwendet.

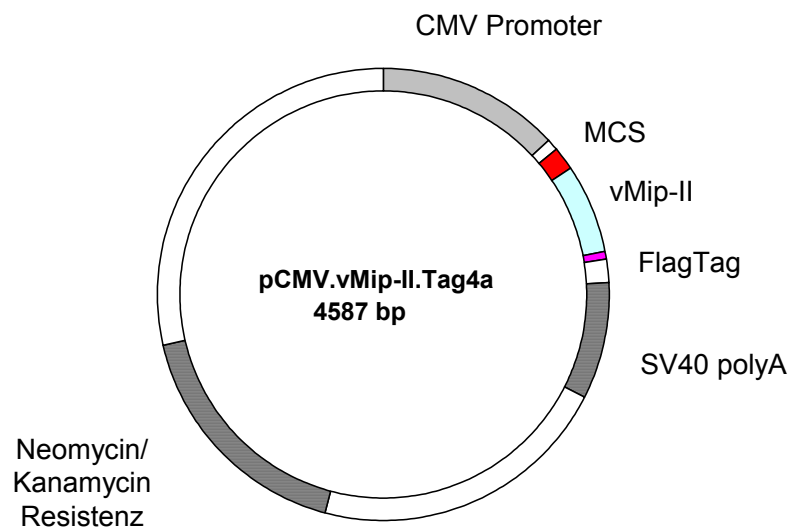


Bild 4.2: Plasmidkarte pCMV.vMip-II.Tag4a

4.1.2 Der klonierte Vektor pIRES.vMip-II.Tag4a

Das PCR Amplifikat XbaI-vMip-II.Tag4a-NotI wurde in den geöffneten Vektor pIRES ligiert. Der Kontrollverdau des neu ligierten Plasmids mit den Enzymen Xba I und Not I zeigte in den Proben 1-8 ebenfalls die erwartete Fragmentgröße von ca. 310 Basenpaaren.

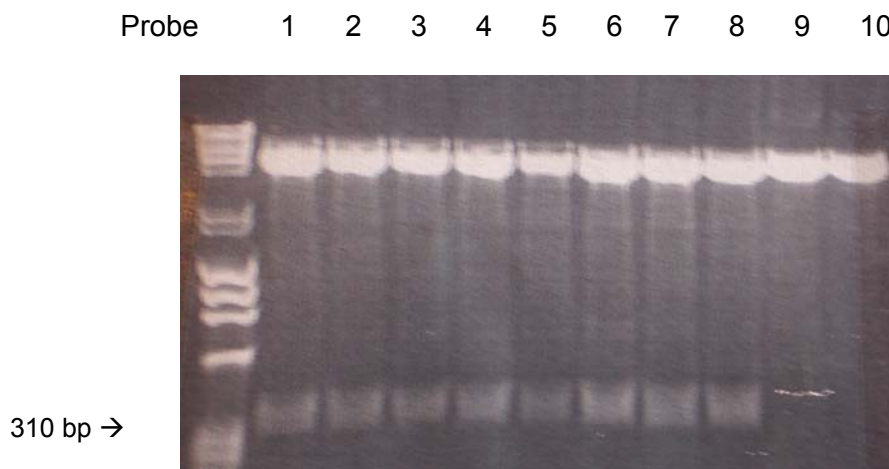


Bild 4.3: pIRES.vMip-II.Tag4a Verdau mit XbaI und NotI

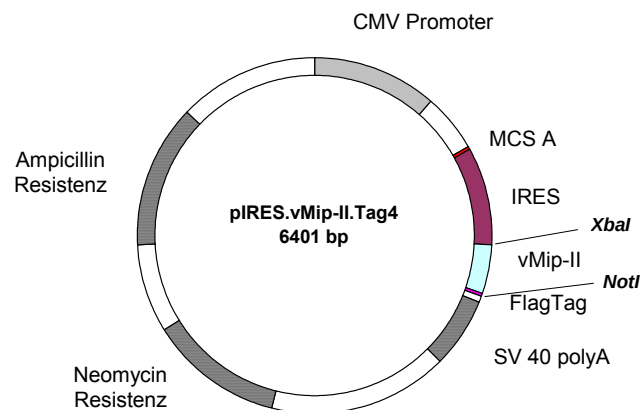


Bild 4.4: Plasmidkarte pIRES.vMip-II.Tag4a

4.1.3 Der klonierte Vektor pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a

Der Kontrollverdau mit XhoI (1c-5c) ergab zwei Fragmente mit den Längen 1650 bp und 6400 bp, welche den Größen des Luc-Gens und des Backbones entsprechen.

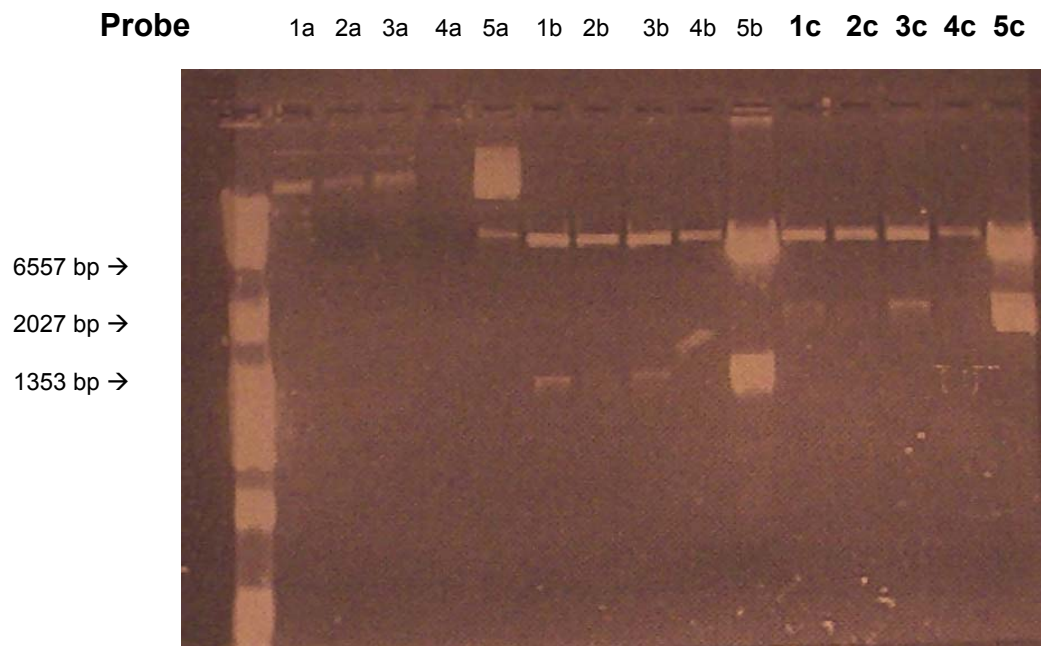


Bild 4.5: Verdau pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a mit XhoI

Probe 1a-5a entsprechen unverdaulichem pIRES.vMip-II.Tag4a.

Probe 1b-5b entsprechen BglII verdaulichem pIRES.vMip-II.Tag4a (s.u.).

Mit Probe 5 wurde weiter gearbeitet.

Die richtige Orientierung der Luc-Insertion wurde mit einem BglII Verdau bestätigt. Die Probe 2 zeigt eine Luc-Insertion in falscher Orientierung, wohingegen Probe 11 eine Luc-Insertion in der richtigen Orientierung zeigt. Die übrigen Proben zeigen keine Luc-Insertion.

Probe 11 wurde zur weiteren Verarbeitung genutzt.

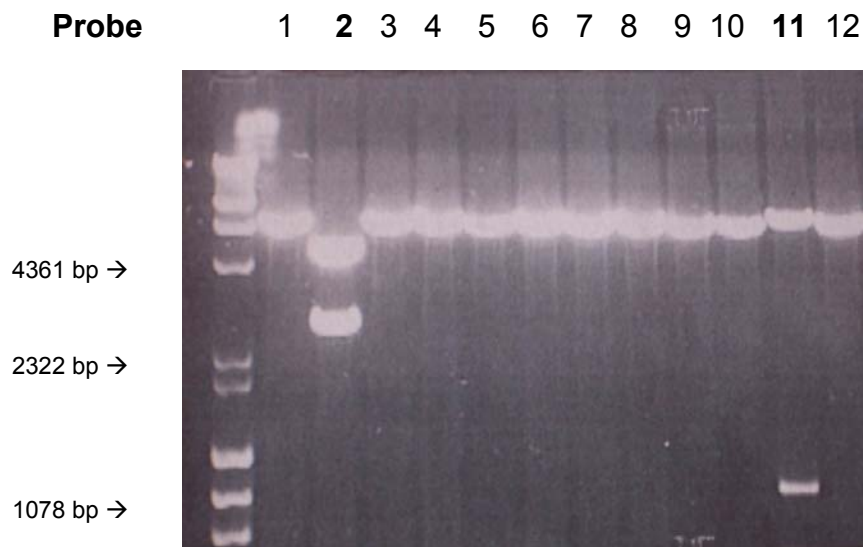


Bild 4.6: *pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a* Verdau mit *BglII*

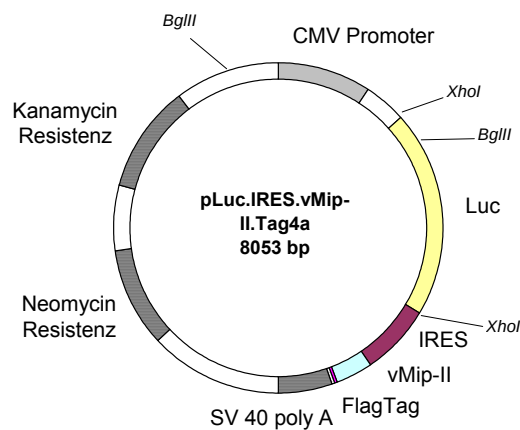


Bild 4.7: Plasmidkarte *pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a*

4.1.4 Der klonierte Vektor pAd-CMV.Luc

Die Luc-Sequenz wurde erfolgreich aus dem Plasmid pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a mit HindIII und EcoRV isoliert. Anschließend wurde das Luc-Insert mit dem Vektor pAd-CMV ligiert. Der Kontrollverdau der Klone mit HindIII und EcoRV ergab 2 Fragmente mit den erwarteten Größen von 1652 (Luc) und 7788 (Backbone) Basenpaaren.

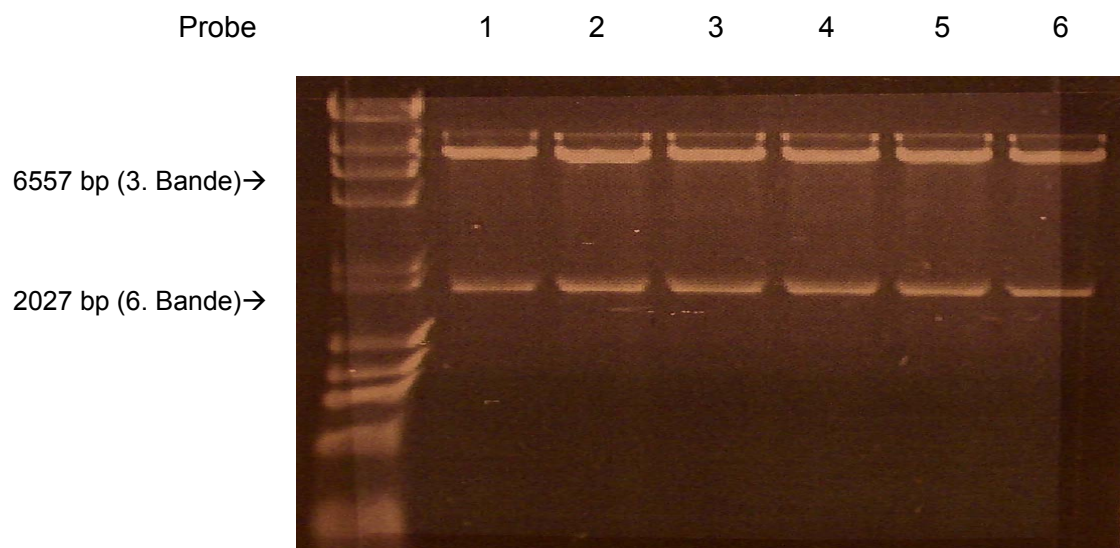


Bild 4.8: Verdau pAd-CMV.Luc mit HindIII und EcoRV

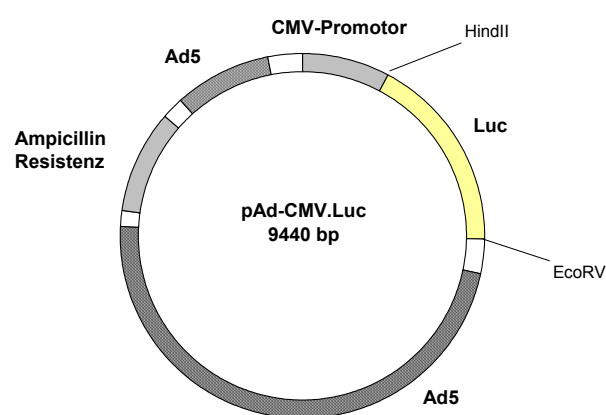


Bild 4.9: Plasmidkarte pAd-CMV.Luc

4.1.5 Der klonierte Vektor pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a

Die Sequenz – IRES.vMip-II.Tag4a – wurde erfolgreich in den Vektor pAd-CMV.Luc ligiert. Die Sequenzierung bestätigte den korrekten Einbau der Expressionskassette Luc.IRES.vMip-II.Tag4a in das adenovirale Expressionsplasmid unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Dieses Expressionsplasmid wurde für die Virus-Generierung verwendet.

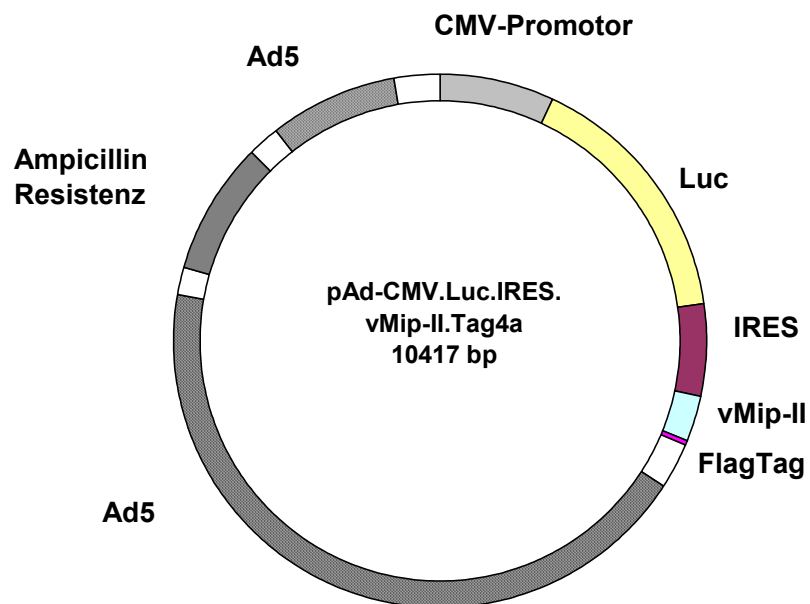


Bild 4.10: Plasmidkarte pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a

4.1.6 Der Luziferase-Eskalations-Assay

Der Eskalations-Assay diente sowohl der Überprüfung der Funktionalität des Expressionsplasmids, als auch der quantitativen Bestimmung der dosisabhängigen Luziferase-Expression.

Die Zellen wurden in halblogarithmisch ansteigenden Konzentrationen mit pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a transfiziert:

0,01 0,03 0,1 0,3 1,0 3,0 10 und 30 µg

Die innerhalb von 24h produzierte Menge an Luziferase wurde so gemessen und galt als Maßstab für die von der transfizierten Plasmidmenge abhängigen Genexpression.

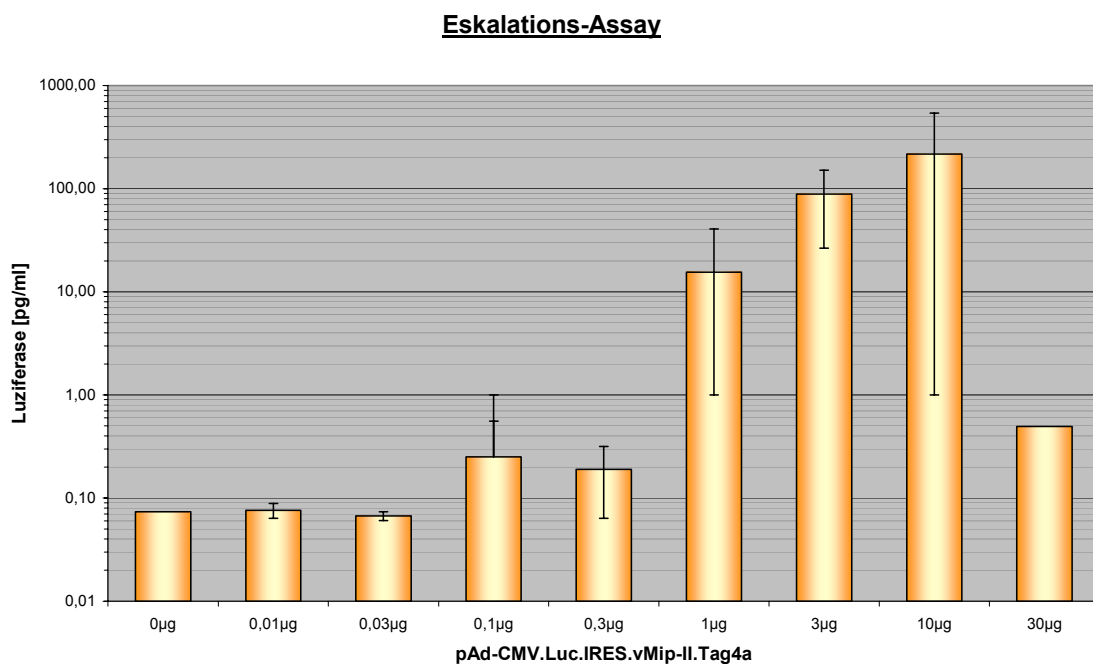


Bild 4.11: Eskalations-Assay Luziferase

Abhängig von der eingesetzten Plasmidmenge ergab sich eine ansteigende Expression des Reportergens Luziferase. Bei einer Menge von 10 µg transfiziertem Plasmid war das Maximum der Luziferase-Expression erreicht und bei Verwendung von größeren Mengen an Plasmid eine Abnahme der Genexpression zu verzeichnen.

4.1.7 Der vMip-II-Eskalations-Assay

Um auch die Expressionsfähigkeit des zweiten Segments der Expressionskassette zu validieren, wurde das Produkt des hinter die IRES-Sequenz klonierten vMip-II Gens bestimmt. Hierzu wurden ebenfalls die Überstände der mit halblogarithmisch ansteigenden Konzentrationen des Plasmids transfizierten Zellen einem Western-Blot unterzogen. Zur Detektion des Proteins vMip-II diente der Anti-Flagtag-Antikörper. Es wurden Banden mit der Größe von 95 Aminosäuren in zunehmender Intensität erwartet. Es lassen sich nur schwache Signale in den Proben von mit 0,01 und 0,03 µg transfizierten Zellen abzeichnen (Bild wegen schlechter Qualität hier nicht abgebildet).

4.2 Virusgenerierung

4.2.1 β -Galactosidase-Assay

Um ein Referenzmaß für die Transfektionseffizienz der Zellen zu bekommen, wurde bei jeder Transfektion eine mit dem Plasmid pRC.CMV. β -Gal transfizierte Zellkulturplatte mitgeführt. Die Transfektionseffizienz lag im Durchschnitt bei 30%.

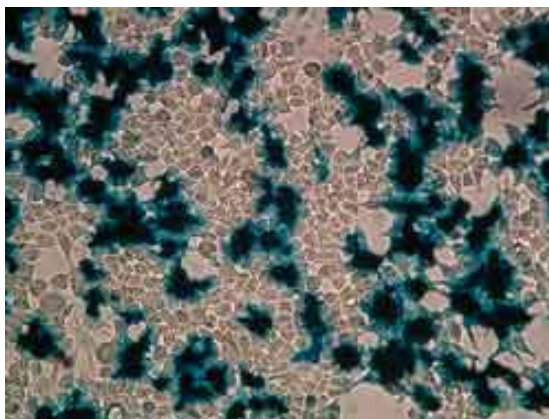


Bild 4.12: β -Gal Transfektion

4.2.2 CPE-Assay

Die mit Agarose beschichteten, transfizierten Zellen wurden ab dem 5. Tag täglich auf plaque-ähnliche Areale untersucht. Diese wurden dann nach steriler Isolierung einem 3-fachen Einfrier-Auftau-Zyklus unterzogen und auf frische 293-Zellen gebracht. Diese Zellen wurden 2-5 Tage danach auf einen zytopathischen Effekt (CPE) untersucht. Es stellte sich bei keinem der plaque-ähnlichen Areale ein zytopathischer Effekt ein. Eine Virus-Generierung blieb aus.

4.3 Suppressions-Assay

Der Suppressions-Assay diente der Untersuchung, ob das multiple Rezeptoren blockierende vMip-II, die Adenovirus-Infektion der Zelle hemmt und somit eine Virus-generierung bzw. Plaquebildung verhindert.

Dazu wurden die Überstände von pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a transfizierten Zellen auf frisch ausgesähte Zellen gegeben, um diese 24h später mit dem Virus Ad.CMV-Luc zu infizieren. Um die Infektions-Effizienz von Ad5.CMV-Luc zu verifizieren, wurde 24h nach Virus-Infektion die Luziferase-Aktivität gemessen. Diese Daten wurden mit Überständen Ad5.CMV-Luc infizierter Zellen verglichen, die zuvor mit nicht transfizierten Zellüberständen behandelt wurden. Der Versuch wurde zur Kontrolle einmal wiederholt. Die Messung mit und ohne pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a wurde mit je drei Proben durchgeführt. In der Grafik sind die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt (n=3).

Suppressionsversuch 1

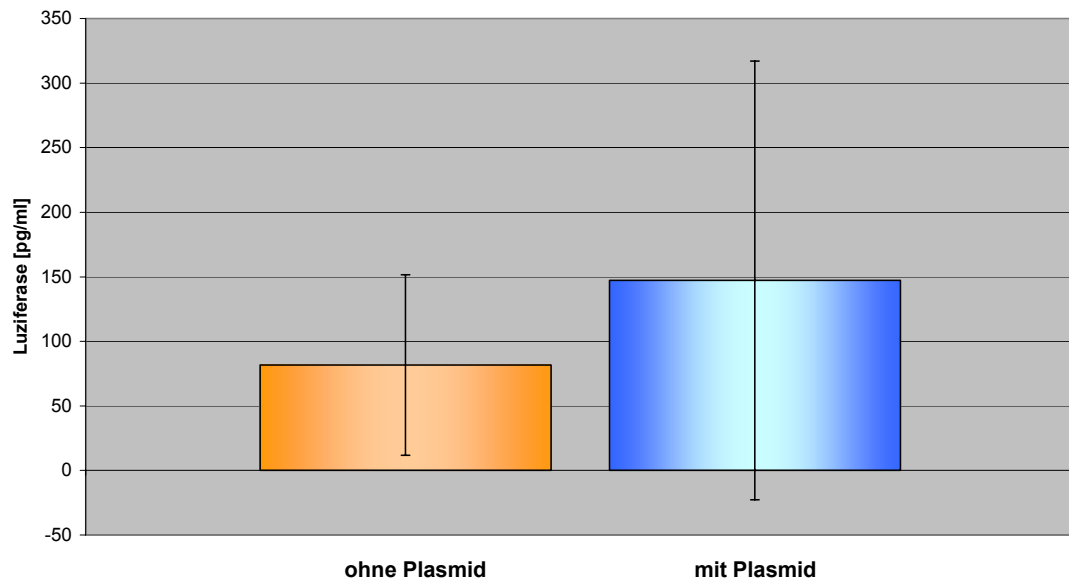


Bild 4.13: Suppressionsversuch 1

Suppressionsversuch 2

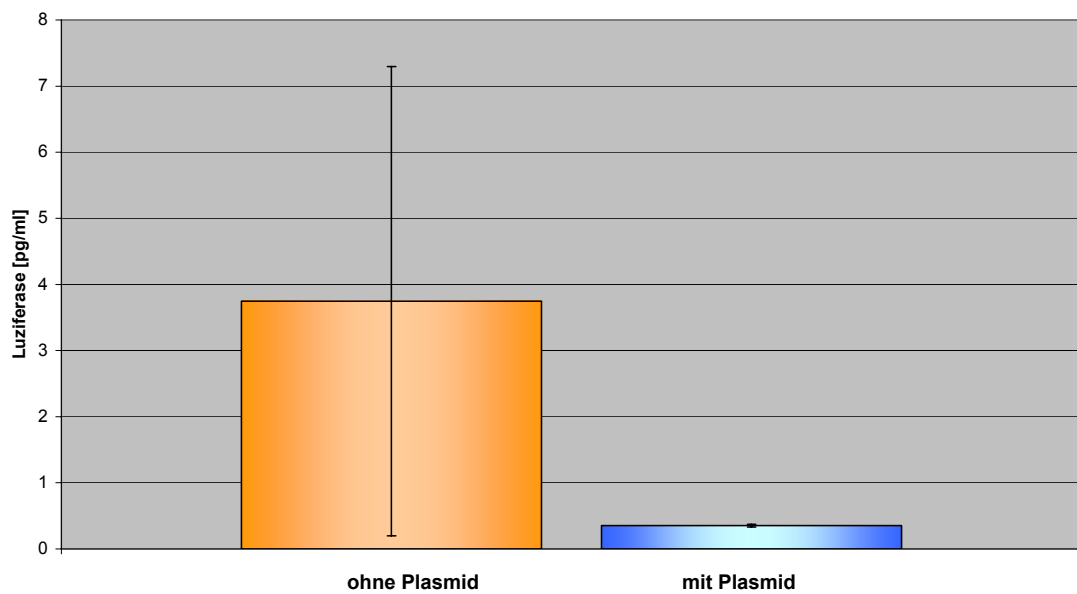


Bild 4.14: Suppressionsversuch 2

5 Diskussion

5.1 Bisherige Ansätze zur Langzeit Expression

Adenovirale Vektoren wurden beim Gentransfer in eine Vielzahl verschiedenster Organe wie Leber, Lunge, Muskel oder Gehirn bei Tieren erfolgreich eingesetzt. Jedoch haben zahlreiche Studien gezeigt, dass die Applikation E1/E3 deletierter adenoviraler Vektoren nur zu einer transienten Genexpression in immunkompetenten Individuen führt. Dies resultiert zum größten Teil aus der Destruktion und Eliminierung Vektor-transduzierter Zellen durch das zelluläre Wirts-Immunsystem, vor allem durch CD8⁺ und CT-Zellen. Um die Vorteile der adenoviralen Vektoren auch für chronische Erkrankungen zu nutzen, beschäftigen sich nun viele Wissenschaftler mit der Langzeit-Expression therapeutischer Gene mit Hilfe adenoviraler Vektoren.

Verminderte Immunogenität des Vektors

Eine Möglichkeit besteht darin, Vektoren zu entwickeln, die weniger immunogen sind. Dazu werden weitere Genabschnitte, die für adenovirale Proteine kodieren und immunogen wirken, entfernt. Die am weitesten reduzierte Variante dieser Vektoren sind die sog. „gutless“ Vektoren. Jedoch bleibt die Immunogenität des Kapsids und des Transgen-Produktes bei dieser Variante weiterhin bestehen [48]. Zudem sind zu ihrer Generierung spezielle Helferviren notwendig. Die Herstellung und Aufreinigung dieser Vektoren ist somit sehr aufwendig, ineffizient und durch Kontamination mit Helferviren geprägt.

Systemische Immunsuppression

Andere Arbeitsgruppen hingegen kombinieren die Vektor-Applikation mit einer systemischen Immunsuppression, wie z.B. Fang et al. [18]. Sie behandelten Hämophilie B erkrankte Hunde parallel zum Faktor IX exprimierenden adenoviralen Vektor mit Cyclosporin A. Es resultierte eine 6 Monate lange Expression des fehlenden Faktors IX. Die dauerhafte systemische Immunsuppression mit ihren erheblichen Nebenwirkungen scheint jedoch keine zufriedenstellende Option darzustellen.

Co-Expression immunmodulatorischer Gene

Die Integration der Gensequenz eines immunmodulatorischen Proteins verspricht eine Methode mit Zukunft zu sein, wenn es um das Ziel der langen Genexpression geht. Die Immunmodulation beschränkt sich auf die transduzierten Zellen, ohne systemische Nebenwirkung.

So benutzten etwa Lee et al. das Protein gp19k aus der E3-Region des Adenovirus [31]. Es setzt die Expression von MHC-Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche herab und limitiert somit die Zellyse infizierter Zellen durch zytotoxische T Zellen.

Scaria et al. konstruierten einen E1-deletierten adenoviralen Vektor, der sowohl das therapeutische Gen hCFTR zur Behandlung der zystischen Fibrose, als auch das immunmodulatorische ICP47-Gen coexprimiert [45]. ICP47 stammt vom HSV ab und blockiert die MHC Klasse I vermittelte Antigen-Präsentation für CD8⁺-Zellen. Der Vektor führte ebenfalls zu einer Reduktion der MHC Klasse I Moleküle auf den infizierten Zelllinien sowie zu einer verminderten Zellyse durch CD8⁺-Zellen.

5.2 Klonierung von pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a

Es sollte das Plasmid pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a mit der Expressionskassette – Luc.IRES.vMip-II.Tag4a – kloniert werden. Die korrekte Klonierung wurde durch Sequenzierungen bestätigt. Die Funktionalität wurde mit den folgenden Tests untersucht.

5.2.1 Luziferase-Eskalations-Assay

Wie erwartet, steigt mit zunehmender transfizierter Plasmidmenge die Luziferase-Expression ebenfalls an. Dies zeigt die korrekte Insertion des Luziferase-Gens in die Expressionskassette und die Funktionalität derselben. Die wieder zurückgehende Luziferase-Expression bei 30µg transfiziertem Plasmid deutet auf einen toxischen Effekt bei zu hoher Plasmid DNA Konzentration und damit auf eine Ineffizienz von Transfektionen in diesem Größenbereich hin. Die größte Expressionseffizienz liegt bei 10µg transfiziertem Plasmid, wobei aber auch schon hohe Expressionsraten bei 1µg

und 3µg Plasmideinsatz gemessen wurden. Expressionsfaktoren werden erst ab einem bestimmten Level von aktiven Genen induziert, was durch den sigmoiden Verlauf der Expressionsleistung veranschaulicht wird.

5.2.2 vMip-II-Eskalations-Assay

Das 285 Basenpaare kleine Protein vMip-II sollte mit dem FlagTag-Antikörper in einem Western-Blot detektiert werden. Dazu wurde hinter die vMip-II-Sequenz der Genabschnitt für das kleine und hoch immunologisch aktive FlagTag kloniert. Es zeigen sich nur schwache Banden bei den Proben mit 0,01 und 0,03 µg transfizierten Zellen. Möglicherweise hat die Expression des hinter das IRES-Segment geschaltete vMip-II stark nachgelassen, so dass nur eine geringe Konzentrationen des vMip-II nachzuweisen war.

5.3 Virusgenerierung

Die Untersuchung der Plaque-ähnlichen Areale der co-transfizierten Zellen ergab keinen zytopathischen Effekt. Die Schlussfolgerung, dass keine Virus-Generierung nach der Methode von Graham et al. erfolgt ist, warf Fragen auf und forderte Erklärungsmodelle.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das erst seit Kurzem bekannte vMip-II selbst die Virusgenerierung hemmt. Durch Arbeiten von Boshoff und Kledal et al. ist bekannt, dass vMip-II inhibitorische Eigenschaften auf die HIV Zellinfektion besitzt [7], [29]. HIV-1 benutzt bei der Infektion CD4⁺-Zellen Co-Rezeptoren: die Envelope-Glykoprotein-Rezeptoren CCR3, CCR5 und CXCR4. Es konnte gezeigt werden, daß vMip-II diese Co-Rezeptoren blockiert. Dadurch wurde es zu einem interessanten Target für die Anti-HIV-Therapie.

Auch in anderen Arbeitsgruppen traten Probleme bei der Virusgenerierung auf:

Morris et al. beschreiben in Ihrer Arbeit einen inhibitorischen Effekt von vMip-II auf die Sivmac251 Infektion [39]. Suppressionsversuche ergaben auch hierbei eine wahrscheinliche Blockierung über CCR3.

Das Adenovirus benutzt bei der Zellinfektion den sog. Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) und zusätzlich diverse Integrin-Rezeptoren, die bisher nur wenig erforscht sind [38], [51]. Als hochpotenter und multipler Rezeptorblocker antagonisiert vMip-II möglicherweise den CA-Rezeptor und/oder einen bzw. mehrere der Integrin-Rezeptoren, die für die adenovirale Zellinfektion notwendig sind. Bleibt diese Zellinfektion aus, kann ein Adenovirus in vitro durch Rekombination zwar entstehen, sich aber nicht durch Infektion der Nachbarzellen vermehren. Die Folge ist das Ausbleiben der sichtbaren Plaques, trotz erfolgter Rekombination.

5.3.1 Suppressions-Assay

Um die mögliche CAR- oder Integrin-Rezeptor-Blockade durch vMip-II zu untersuchen, wurde ein Suppressions-Test durchgeführt. 293-Zellen wurden mit vMip-II haltigem Medium (Überstand von zuvor mit pCMV.vMip-II.Tag4a transfizierten Zellen) inkubiert, in der Annahme, dass sich vMip-II an die Rezeptoren lagert. Die Zellen wurden anschließend mit Ad5-Luc infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen, die in vMip-II-freiem Medium inkubiert und ebenfalls mit Ad5-Luc infiziert wurden, mitgeführt. Die Luziferase-Aktivität wurde nach einer Inkubationszeit von 24h gemessen. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt. Das Ergebnis des ersten Versuchs zeigte eine höhere Luziferase-Aktivität bei den zuvor mit vMip-II inkubierten Zellen. Dies widerspricht der These einer Inhibition der adenoviralen Zellinfektion durch vMip-II. Bei der Wiederholung des Versuchs zeigte sich eine schwächere Luziferase-Aktivität der mit vMip-II kultivierten Zellen, was wiederum die These der Inhibition bestätigen würde. Zusammen betrachtet, lassen die Suppressionsversuche keine eindeutige Interpretation zu.

Mögliche Störfaktoren könnten zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Trotz vorheriger Zellzählung könnten Ungenauigkeiten beim Aussähen der

Zellen zustande gekommen sein. Auch ist die Frage zu stellen, ob die Menge an eingesetztem vMip-II ausreicht, um die Rezeptoren signifikant zu blockieren. Möglicherweise reicht die von den Zellen produzierte Menge vMip-II nur aus, um wenige Viren in ihrer Ausbreitung zu hemmen, wie es bei der Virusgenerierung der Fall ist, jedoch nicht, um eine Infektion vieler Millionen Viren zu verhindern.

5.3.2 Alternative Erklärungsmodelle

Eingriff in die Virusreplikation auf intrazelluläre Ebene

Seit seiner Entdeckung 1994, wurden viele Erkenntnisse über HHV-8, die durch Untersuchungen aus Biopsie-Materialien und isolierter viraler Gene gewonnen wurden, zusammengetragen. Auffällig ist, dass es bisher nicht möglich war, kontinuierlich passagierbares HHV-8 herzustellen. Werden Zelllinien mit HHV-8 infiziert, resultiert dies meist in einem latenten Infektionsstatus. Nur selten und in einem geringen Ausmaße kommt es zu lytischen HHV-8 Replikationszyklen, die zu einem zytopathischen Effekt führen [30], [15].

Das Fehlen eines geeigneten Kultursystems, mit welchem das HHV-8 erfolgreich herangezüchtet werden kann, lässt viele Fragen über seine Pathogenese offen. Möglicherweise besitzt es Mechanismen, die eine kontinuierliche Replikation des Virus verhindern. vMip-II könnte hierbei eine tragende Rolle spielen, möglicherweise auf der Ebene der intrazellulären Virusreplikation.

Down-Regulation der Rezeptoren

Cytokine, wie IFN- γ , TNF- α oder TNF- γ führen zu einer Down-Regulation des CA-Rezeptors, woraus eine verminderte Adenovirus-Zell-Bindung resultiert [57]. Ob vMip-II eine ähnliche Down-Regulation des CA-Rezeptors auslöst und somit die adenovirale Zellinfektion hemmt ist ungeklärt, aber eine Möglichkeit, die diskussionswürdig bleibt.

Weiterhin könnten homologe Rekombination vermittelnde zelluläre Faktoren durch vMip-II in ihrer Expression gehemmt werden [58].

6 Zusammenfassung

Die Gentherapie hat sich zu einem zukunftsweisenden Therapiegebiet in der Medizin entwickelt. Erfolge am Menschen sind dennoch selten zu verzeichnen. Am Beispiel der adenoviralen Vektoren liegt dies u.a. an der Immunantwort des Patienten auf den Vektor. Der applizierte Vektor persistiert nur für kurze Zeit im Organismus und wird rasch eliminiert. Somit werden auch die therapeutischen Gene, die der Vektor zum Zielorgan transportiert eliminiert. Um auch chronische Erkrankungen mit Hilfe der ansonsten sehr vorteilhaften adenoviralen Vektoren therapieren zu können, war es Ziel dieser Arbeit, einen adenoviralen Vektor zu generieren, der zu einer lang anhaltenden Expression der therapeutischen Gene befähigt ist. Um dies zu erreichen, sollte in die Expressionskassette des Vektors die Gensequenz des immunomodulatorischen Proteins vMip-II kloniert werden. Die Besonderheit von vMip-II ist, dass es ein ungewöhnlich breites Spektrum von immunologisch interagierenden Rezeptoren blockiert. Neben den chronischen Erkrankungen könnten auch auto-aggressive Erkrankungen mit Hilfe dieses immunsupprimierenden Vektors behandelt werden.

Zunächst wurde die in den Vektor zu integrierende Expressionskassette kloniert. Die richtige Integration der Expressionskassette wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Funktionalität wurde durch Nachweis der Luziferaseaktivität und Nachweis von vMip-II untersucht. Das neu klonierte Plasmid wurde mit einem zweiten Plasmid co-präzipitiert und auf 293-Zellen gebracht. Durch homologe Rekombination und Aufnahme in die Zellen sollte nach einer Inkubationszeit von ca. 15 Tagen der adenovirale Vektor mit gewünschter Expressionskassette entstehen. Die makroskopisch sichtbare Plaquebildung blieb auch nach mehrfachen Wiederholungen und Variieren der Versuchsparameter aus.

Es wurde die These aufgestellt, dass das Genprodukt vMip-II die Infektion der Nachbarzellen durch den adenoviralen Vektor hemmt, was das Ausbleiben eines Plaques erklären könnte. Zur Untersuchung der These wurde ein Suppression-Test durchgeführt. Die Ergebnisse lassen allerdings keine eindeutige Interpretation zu, so dass der Grund für das Ausbleiben des Plaques weiterhin Spekulation bleibt.

7 Literaturverzeichnis

[1]	Andreason GL, Evans GA.: "Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation". <i>Biotechniques</i> . 1988 <i>Jul-Aug</i> ;6(7):650-60
[2]	Bett AJ, Haddara W: "An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3". <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 1994 <i>Sep 13</i> ;91(19):8802-6
[3]	Bett AJ, Prevec L: "Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors". <i>J Virol</i> . 1993 <i>Oct</i> ;67(10):5911-21
[4]	Borgland SL, Bowen GP: "Adenovirus Vector-Induced Expression of the C-X-C Chemokine IP-10 Is Mediated through Capsid-Dependent Activation of NF- κ B". <i>Journal of Virology</i> , May 2000
[5]	Boshart M, Weber F: „A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus". <i>Cell</i> . 1985 <i>Jun</i> ;41(2):521-30
[6]	Boshoff C, Endo Y: "Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines". <i>Science</i> 278
[7]	Boshoff C, Endo Y: "Angiogenic and HIV-Inhibitory Functions of KSHV-Encoded Chemokines". <i>Science</i> , Vol. 278, 1997
[8]	Bowen GP, Borgland SL: "Adenovirus vector-induced inflammation: capsid-dependent induction of the C-C chemokine RANTES requires NF-kappa B". <i>Hum Gene Ther</i> . 2002 <i>Feb 10</i>
[9]	Capecci MR: "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells". <i>Cell</i> , 22:479–488, 1980
[10]	Chen B, Bacon K: "In vivo inhibition of CC and CX ₃ C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of Glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMip-II". <i>J. Exp. Med</i> . Vol 188 1998
[11]	Chensue SW: "Molecular Machinations: Chemokine Signals in Host-Pathogen Interactions" <i>Clinical Microbiology Reviews</i> , Oct. 2001
[12]	Cook DN, Beck MA: "Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection". <i>Science</i> 269

[13]	Dawson TC, Beck MA: "Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to Influenza A Virus". <i>Am. J. Pathol.</i> 156
[14]	DeBruyne LA, Li K: "Gene transfer of virally encoded chemokine antagonists vMip-II an MC 148 prolongs cardiac allograft survival and inhibits donor specific immunity". <i>Gene Therapy</i> 7/2000
[15]	Dezube BJ, Zambela M: "Characteriazation of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 infection of human vascular endothelial cells: early events". <i>Blood, August 2002, Vol. 100</i>
[16]	Dienstag JL: "Harrisons Innere Medizin", ISBN-13: 9783936072297
[17]	Domachowske JB, Bonville CA: "The chemokine macrophage-inflammatory protein-1 alpha and its receptor CCR1 control pulmonary inflammation and antiviral host defense in paramyxovirus infection". <i>J. Immunol.</i> 165
[18]	Fang B, Eisensmith RC: "Gene therapy for haemophilia B: host immunosuppression prolongs the therapeutic effect of adenovirus-mediated factor IX expression". <i>Hum. Gene Therapy</i> 6(8) Aug. 1995
[19]	Fernandez EJ, Lolis E: "Structure, function, and inhibition of chemokines". <i>Annual Review of Pharmacology and Toxicology Vol. 42</i>
[20]	Ghirnika RS, Lee YL: "Chemokine antagonist infusion attenuates cellular infiltration following spinal cord contusion injury in rat". <i>Neuroscience Res.</i> Jan 2000
[21]	Graham FL, Smiley J:" Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5". <i>J Gen Virol.</i> 1977 Jul;36(1):59-74
[22]	Graham FL:" A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA". <i>Virology.</i> 1973 Apr;52(2):456-467
[23]	Hacein-Bey-Abina,: Sustained Correction of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency by ex Vivo Gene Therapy". <i>The New England Journal of Medicine</i> 16/346/2002. S. 1185-1193
[24]	Handin RI: "Harrisons Innere Medizin", ISBN-13: 9783936072297

[25]	Harms JS, Splitter GA: "Interferon- γ inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter". <i>Hum Gene Therapy</i> 6, 1995
[26]	Hearing P, Samulski RJ: "Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome". <i>J Virol.</i> 1987 Aug;61(8):2555-8
[27]	Hearing P, Shenk T.: "Functional analysis of the nucleotide sequence surrounding the cap site for adenovirus type 5 region E1A messenger RNAs". <i>J Mol Biol.</i> 1983 Jul 15;167(4)
[28]	Higginbotham JN, Seth P: "The Release of Inflammatory Cytokines from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro Following Exposure to Adenovirus Variants and Capsid". <i>Human Gene Therapy</i> January 1, 2002
[29]	Kledal T, Rosenklide M: „A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus". <i>Science Vol.</i> 277, 1997
[30]	Lagunoff M, Bechtel J: „De novo infection and serial transmission of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus in cultured endothelial cells". <i>Journal of Virology</i> , March 2002, p. 2440-2448
[31]	Lee MG, Abina MA: "The constitutive expression of the immunomodulatory gp19k protein in E1-, E3-adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector" <i>Gene Therapy</i> 2(4) Jun. 1995
[32]	Lindow M, Nansen A: "The virus-encoded chemokine vMip-II inhibits virus-induced Tc1-driven inflammation". <i>J. Of Virology</i> , July 2003
[33]	Liu Q, Zaiss AK: "The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors". <i>Humene Gene Therapy</i> 2003 May 1
[34]	Luo Z, Fan X: "Structure function study and anti-HIV activity of synthetic peptide analogues derived from viral chemokine vMip-II". <i>Biochemistry</i> , 2000 Nov 7

[35]	Lusky M, Christ M: "In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted". <i>J Virol.</i> 1998 Mar;72(3):2022-32
[36]	Lüttichau HR, Lewis IC: "The herpesvirus-8 encoded chemokine vMip-II, but not the poxvirus encoded chemokine MC148, inhibits the CCR10 receptor": <i>Eur. J. Immunol.</i> 31
[37]	Mannino RJ, Gould-Fogerite S.: "Liposome mediated gene transfer". <i>Biotechniques.</i> 1988 Jul-Aug;6(7):682-90
[38]	Mathias P, Galleno M: "Interactions of soluble recombinant integrin alphav beta5 with human adenoviruses". <i>J Virol.</i> 1998 Nov;72(11):8669-75
[39]	Morris KV, Higgins J: "The effects of HHV-8 vMip-II on SIVmac251 infection and replication competent and incompetent SIVmac239Δ3 vectors". <i>Virus Research,</i> 94, 2003
[40]	Nevins JR: "Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product". <i>Cell.</i> 1981 Oct;26
[41]	Quin L, Ding Y: "Promoter attenuation in gene therapy: Interferon- γ and tumor necrosis factor- α inhibit transgene expression". <i>Hum Gene Therapy</i> 1997, 8
[42]	Rekosh DM, Russell WC: „Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA". <i>Cell.</i> 1977 Jun;11
[43]	Rowe WP, Huebner RJ: „Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture". <i>Proc Soc Exp Biol Med.</i> 1953 Dec;84
[44]	Ruzek MC, Kavanagh BF: "Adenoviral Vectors Stimulate Murine Natural Killer Cell Responses and Demonstrate Antitumor Activities in the Absence of Transgene Expression". <i>Molecular Therapy Vol. 5,</i> Febr. 2002
[45]	Scaria A, Sullivan JA: "Adenoviral vektor expressing ICP47 inhibits adenovirus-specific cytotoxic T Lymphocytes in nonhuman primates". <i>Molecular Therapy Vol. 2,</i> Nov 2000

[46]	Schnell M.A., Zhang Y: "Activation of innate Immunity in nonhuman Primates following intraportal administration of Adenoviral vectors". <i>Molecular Therapy Vol. 3, 2001</i>
[47]	Sozzani S, Luini W: "The viral chemokine macrophage inflammatory protein-II is a selective Th2 chemoattractant". <i>Blood Dec 1998</i>
[48]	Thorrez L, VandenDriessche T: "Preclinical gene therapy studies for haemophilia using adenoviral vectors". <i>Semin. Thromb. Hemost. 30(2) Apr. 2004</i>
[49]	Tibbles LA, Spurell JC: "Activation of p38 and ERK signaling during adenovirus vector cell entry lead to expression of the C-X-C chemokine IP-10". <i>J. of Virology 2002 Feb, 76</i>
[50]	Tollefson AE, Scaria A: "The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells". <i>J Virol. 1996 Apr;70(4):2296-306</i>
[51]	Tomko RP, Johansson CB: "Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob". <i>Exp Cell Res. 2000 Feb 25;255(1):47-55</i>
[52]	Varda-Bloom N, Shaish A: "Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis". <i>Gene Ther. 2001 Jun;8(11):819-27</i>
[53]	Weber K, Gröne HJ: "Selective recruitment of Th2-Type cells and evasion from a cytotoxic immune response mediated by viral macrophage inhibitory protein-II". <i>Eur. J. Immunol. 2001.31:2458-2466</i>
[54]	White E, Sabbatini P.: "The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha". <i>Mol Cell Biol. 1992 Jun;12(6):2570-80</i>
[55]	Worgall S, Wolff G: "Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration". <i>Hum. Gene Therapy 1997 Jan 1</i>

[56]	Yang Y, Nunes FA: "Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy". <i>Proc. Natl. Acad. Sci Vol. 91</i> , 1994
[57]	Zhang HG, Wang YM: "Recombinant adenovirus expressing adeno-associated virus cap and rep proteins supports production of high-titer recombinant adeno-associated virus". <i>Gene Therapy</i> , 2001, 8
[58]	
[59]	Zhang-Xu D.A., Barnes M.J.: "Adenoviral Gene Therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo". <i>Hum. Gene Therapy</i> , 1999 Apr 10
[60]	Zhang-Xu I, Govindarajan S: "NK Cells cause Liver Injury and facilitate the Induction of T Cell-Mediated Immunity to a Viral Liver Infection". <i>J. of Immunology</i> , 2000, 164

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alaninaminotransferase
ANA	Antinukleäre Antikörper
AST	Aspartataminotransferase
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CCRL	Cell culture lysis reagent
Cd	Cluster of Differentiation
CT-Zellen	Zytotoxische Zellen
DEAE	Diethylaminoethanol
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony stimulating factor
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
hCFTR	Human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
HCV	Hepatitis C Virus
HHV-8	Human herpes virus 8
HIV	Human immunodeficiency virus
HSV	Herpes simplex virus
ICP47	infected cell peptide 47
IFN- γ	Interferon- γ
IP-10	Inducible protein-10
IRES	Internal ribosome entry site
kDa	Kilo Dalton

LKM-AK	Liver-kidney-microsome-Antikörper
LP-AK	Liver pancreas-Antikörper
Luc	Luciferase
MCP-1	Monocyte chemoattractant Protein-1
MCS	Multiple cloning site
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minuten
Mip	Macrophage inflammatory protein
NK Zellen	Natural Killer Zellen
ORF	Open reading frame
P38	P38 kinase
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
RANTES	Regulated on activation-normal T cell expressed and excreted
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
Sec.	Sekunden
SIV	Simian immunodeficiency virus
SLA-AK	Soluble liver antigen-Antikörper
sog.	so genannt
Th Zellen	T Helfer Zellen
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U	Units
ü.N.	Über Nacht
vMip-II	Viral macrophage inhibitory protein-II

8.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Bild 2.1: Gerinnungskaskade	9
Bild 2.2: Adenoviren, elektronenmikroskopische Aufnahme	16
Bild 2.3: Aufbau eines Adenovirus mit seinen wichtigsten Strukturmerkmalen.....	16
Bild 2.4: Genomorganisation der adenoviralen Wildtypform	17
Bild 2.5: Zusammenfassung der wichtigsten Ereignisse der frühen Phase des adenoviralen Lebenszyklusses	18
Bild 2.6: Prinzip der Herstellung adenoviraler Vektoren durch homologe Rekombination	21
Bild 2.7: Immunreaktion auf eine Adenovirus-Infektion.....	23
Bild 2.8: Histologisches Bild einer Hepatitis	23
Bild 2.9: Serpentinrezeptor.....	25
Bild 3.10: Reaktionsformel 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galacto-Pyranosid zu 5-Bromo-4-chloro-indigo.....	53
Bild 3.11: Luziferasereaktion.....	55
Bild 4.1: PCR pCMV.vMip-II.Tag4a.....	57
Bild 4.2: Plasmidkarte pCMV.vMip-II.Tag4a	58
Bild 4.3: pIRES.vMip-II.Tag4a Verdau mit XbaI und NotI	59
Bild 4.4: Plasmidkarte pIRES.vMip-II.Tag4a	59
Bild 4.5: Verdau pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a mit XhoI	60
Bild 4.6: pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a Verdau mit BglII	61
Bild 4.7: Plasmidkarte pLuc.IRES.vMip-II.Tag4a	61
Bild 4.8: Verdau pAd-CMV.Luc mit HindIII und EcoRV	62
Bild 4.9: Plasmidkarte pAd-CMV.Luc	62
Bild 4.10: Plasmidkarte pAd-CMV.Luc.IRES.vMip-II.Tag4a.....	63
Bild 4.11: Eskalations-Assay Luziferase	64
Bild 4.12: β -Gal Transfektion	65

Bild 4.13: Suppressionsversuch 1 67

Bild 4.14: Suppressionsversuch 2 67

Tabellen

Tabelle 2.1: Einteilung der Autoimmunhepatitis 7

Tabelle 2.2: Schweregrade der Hämophilie A 10

Tabelle 2.3: Hauptgruppen der viralen Vektoren 14

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Laufs, der mir ermöglicht hat, die beschriebene Arbeit an seiner Klinik beginnen zu dürfen. Ich wünsche ihm alles Gute im Ruhestand. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thaiss, für seine Spontaneität, die Rolle des Doktorvaters für diese Arbeit zu übernehmen.

Den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission möchte ich für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit danken. Herrn Dr. Peter Schäfer danke ich für die Vermittlung an die Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Block, unter dessen Leitung die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe für Gentherapie an der medizinischen Klinik des UKE angefertigt wurde. Herrn Dr. Andreas Block möchte ich für die interessante Aufgabenstellung und seine Motivation zum selbstständigen experimentellen Denken und Arbeiten danken.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das gute Arbeitsklima, die gegenseitige Hilfs- und Motivationsbereitschaft. Der größte Dank gilt hier Dr. Holger Wulff. Er führte mich mit viel Geduld in die vielen Labortechniken ein und war ein aufgeschlossener Diskussionspartner während dieser Arbeit. Ohne ihn wäre der Weg dieser Arbeit um einiges schwerer gewesen. Auch für das Korrekturlesen in fachlichen Fragen möchte ich ihm ein grosses Dankeschön aussprechen. Dr. Holger Rohde soll nicht unerwähnt bleiben, der mir mit viel Fachwissen, Geduld und Humor zur Seite stand.

Darüber hinaus möchte ich Karen Eggers für ihre großartige Unterstützung bei Formatierungsproblemen, Ihrem Verständnis und Ihre Motivationsschübe danken.

Ich danke meinem Bruder Sven Flürenbrock, der mir bei der Erstellung der Bilder und Grafiken mehr als eine große Hilfe war.

Zum Schluss geht noch ein großer Dank an meine Mutter, die mich meine Arbeit nie hat vergessen lassen, und wie immer der ruhende Pol meines Lebens ist.

Ein letzter Dank gilt allen bisher Unerwähnten, die sich als tapfere und hartnäckige Korrektur-Leser erwiesen haben, oder mich währen dieser Zeit mit ihrer Geduld und Hilfsbereitschaft unterstützt haben.

Danke!

10 Lebenslauf

Name	Wibke Flürenbrock
Geburtsdatum, -ort:	07. Januar 1975, Lippstadt
Bildungsweg:	
1981 - 1994	Schulbildung, Abitur
1994 – 2002	Studium der Humanmedizin, RWTH Aachen, 3. Staatsexamen
Berufliche Nebentätigkeiten:	
10/2001-08/2002	Studentische Mitarbeiterin, Institut für Humangenetik, RWTH Aachen
Beruflicher Werdegang:	
09/2002 - 02/2004	Arzt im Praktikum, Institut für Infektionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Approbation
Seit 03/2004	Pharmacovigilance and Safety Manager, Lundbeck GmbH
Promotion:	
09/2002 –03/2007	„Langzeit-Expression in der adenoviralen Gentherapie mit Hilfe eines immunmodulatorischen Proteins“, Institut für Infektionsmedizin und Medizinische Klinik I, Universitätsklinik Hamburg- Eppendorf

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Wibke Flürenbrock

Hamburg, den 10.04.2007