

**Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
Molekulare Zellbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

**Direktorin:
Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel**

**Charakterisierung eines adenoviralen Vektors mit cholesterinregulierter
LDL-Rezeptor Expression**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von**

Tobias Carsten Lange

aus Hamburg

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

Der Universität Hamburg am: 05.11.2007

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. F. U. Beil

Inhalt:

Abkürzungsverzeichnis	Seite V-VI
1. <u>Einleitung</u>	
1.1 Adenoviren als Vektoren	Seite 1
1.2 Familiäre Hypercholesterinämie (FH)	Seite 4
1.3 Therapieansätze bei der familiären Hypercholesterinämie	Seite 7
1.4 Entstehungsgeschichte der Gentherapie , insbesondere in Bezug auf die familiäre Hypercholesterinämie	Seite 8
1.5 Gentherapeutische Methoden bei der familiären Hypercholesterinämie	Seite 10
1.6 Titerbestimmung von Viren / Adenoviren	Seite 11
2. <u>Ziel der Arbeit und Arbeitshypothesen</u>	Seite 13
3. <u>Material und Methoden</u>	
3.1 Methoden	Seite 14
3.1.1 Herstellung der Virenstocks von Ad-P _{-600ap} hLDLR und Ad-RSV hLDLR	Seite 14
3.1.2 Titerbestimmung durch Ermittlung der Tissue Culture Infectious Dose	Seite 16
3.1.3 Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)	Seite 19
3.1.4 Zellkulturen	Seite 20
3.1.5 Western-Blot aus Zellkulturprotein	Seite 20
3.1.6 Immunhistochemische Methoden	Seite 22
3.1.7 Infektion von Zellen mit Adenovirus	Seite 23
3.1.8 Tierexperimentelle Methoden	Seite 24
3.1.9 DNA Präparation	Seite 24
3.1.10 Real-Time PCR	Seite 26
3.1.11 Zellkern Präparation	Seite 29
3.1.12 Dynamic Light Scattering	Seite 30

3.2.	Material	<i>Seite 31</i>
3.2.1	Virenkonstrukte	<i>Seite 31</i>
3.2.2	Zelllinien	<i>Seite 32</i>
3.2.3	Verbrauchsmaterialien	<i>Seite 32</i>
3.2.4	Geräte	<i>Seite 34</i>
3.2.5	Lösungen	<i>Seite 36</i>
4.	<u>Ergebnisse</u>	
4.1.1	Titerbestimmung der Viren mit Funktionalitätsnachweis	<i>Seite 41</i>
4.2	Testung der Funktionalität von Ad-P _{-600ap} hLDLR in Zellkultur	<i>Seite 42</i>
4.2.1.	Suppression des -600ap-Promoters durch 25-Hydroxycholesterin	<i>Seite 42</i>
4.2.2	Immunzytologische Darstellung der Suppression des -600ap-Promoters	<i>Seite 44</i>
4.3	Testung der Funktionalität von Ad-P _{-600ap} hLDLR in der Maus	<i>Seite 48</i>
4.3.1	Dosisanpassung in Wild-Typ Mäusen	<i>Seite 48</i>
4.3.2	Immunhistologische Untersuchung der Wild-Typ Mäuse	<i>Seite 49</i>
4.3.3	Serum-Lipoproteinprofile nach adenoviraler Expression des LDLR in LDLR knock-out Mäusen	<i>Seite 50</i>
4.4	Titerbestimmung mittels quantitativer Real-Time PCR	<i>Seite 54</i>
4.4.1	Quantitative Real-Time PCR: Bestimmung des Messbereichs in Verdünnungen präparierter Adenoviren	<i>Seite 54</i>
4.4.2	Etablierung einer Standardreihe für die absolute Quantifizierung der Titer	<i>Seite 58</i>
4.4.3	Absolute Quantifizierung anhand der Standardreihe	<i>Seite 59</i>
4.4.4	Berechnung der absoluten Titer	<i>Seite 60</i>
4.5	Aufnahme von Viren in die Zelle	<i>Seite 61</i>
4.5.1	Untersuchung der Korrelation der mittels Real-Time PCR bestimmten Vektorkopienzahlen mit dem infektiösen Titer	<i>Seite 61</i>

4.5.2	Zelluläre DNA Präparation versus nukleäre DNA Präparation	<i>Seite 62</i>
4.5.3	Vergleich der Titer aus Photometrie, TCID, DNA- und nukleärer DNA Präparation	<i>Seite 63</i>
4.5.4	Visueller Nachweis der Adenoviren	<i>Seite 65</i>
4.5.5	Nachweis der Größenverteilung Fluoreszenz markierter Viren mittels dynamischer Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering)	<i>Seite 71</i>
4.5.6	Real-Time PCR ist wichtiger Qualitätsfaktor einer Virenpräparation	<i>Seite 73</i>
4.6.	Testung der Funktionalität von Ad-P _{-600ap} hLDLR in der LDLR defizienten Maus mit dem aus der quantitativen Real-Time PCR ermittelten Titer.	<i>Seite 74</i>
5.	<u>Diskussion</u>	
5.1.	Fragen des gentherapeutischen Einsatzes des Vektors Ad-P _{-600ap} hLDLR	<i>Seite 75</i>
5.2.	Faktoren, die die Expressionshöhe von Ad-P _{-600ap} hLDLR bestimmen.	<i>Seite 76</i>
5.3.	Lösungswege zur Bestimmung eines viralen Titors zum Vergleich von Vektoren. Die Methode der quantitativen Real-Time PCR (qPCR)	<i>Seite 77</i>
5.4	Nachweis infektiöser Viren via Real-Time PCR	<i>Seite 78</i>
5.5	Korrelation der Titer und Wirksamkeit von Vektoren	<i>Seite 80</i>
5.6	Betrachtung der Experimente mit dem aus der Real-Time PCR erhaltenen Titer	<i>Seite 82</i>
5.7	Abschliessende Betrachtung über die Wirksamkeit des Vektors Ad-P _{-600ap} hLDLR	<i>Seite 83</i>

6.	Zusammenfassung	<i>Seite 84</i>
7.	Anhang	<i>Seite 85</i>
8.	Abbildungsverzeichnis	<i>Seite 87</i>
9.	Literaturverzeichnis	<i>Seite 89</i>
10.	Danksagung	<i>Seite 98</i>
11.	Curriculum vitae	<i>Seite 99</i>
12.	Erklärung	<i>Seite 100</i>

Abkürzungsverzeichnis

293	humane embryonale Nierenzelllinie mit stabil transfizierter adenoviraler E1-Genregion
911	humane Retinoblastom Zelllinie
µM	Mikromolar
AAV	Adeno assoziiertes Virus
Ad	Adenovirus
Ad5	Adenovirus Serotyp 5
Ad-MV EGFP	benutzter Adenovirus mit GFP-DNA Sequenz
Ad-P _{-600ap} hLDLR	benutzter Adenovirus der die LDL-Rezeptor Sequenz beinhaltet mit humanem Promoter
Ad-RSV hLDLR	benutzter Adenovirus der die LDL-Rezeptor Sequenz beinhaltet mit Rous sarcoma Virus Promoter
AdV	Adenoviraler Vektor
apobec-1	ApoB mRNA editing polypeptide 1
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua tridest.	dreifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	complimentäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CPE	Zytopathischer Effekt
CsCl	Cäsiumchlorid
Ct	Threshold cycle
Cy3 TM	Floureszenz Farbstoff (mit λ ex max bei 550-552 nm)
Delta Rn	baseline-corrected normalized fluorescence
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dR	baseline-corrected fluorescence
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß (1.5 ml Volumen)
EtBr	Ethidium Bromid
FCS	Foetales Kälber Serum
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Gewichtskraft
GFP	Green Flourescent Protein
Huh7	humane Hepatomazelllinie
ITR	Inverted Terminal Repeat
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LDL	Low-Density Lipoprotein

LDLR	Low-Density Lipoprotein Rezeptor
LPDS	Lipoprotein defizientes Serum
LRP	LDL-Receptor related Protein
LTR	long terminal repeat
Mab	Mono-clonal-antibody = Monoklonaler Antikörper
max.	maximal
MEF	Murine Embryonic Fibroblast
Min	Minute
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
Mpa	MegaPascal
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
nMol	Nanomol
OD λ	Optische Dichte bei λ in nm
ORF	Open Reading Frame
Pab	Poly-clonal-antibody = Polyklonaler Antikörper
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphat buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque forming unit
RCA	replication Competent Adenovirus
rpm	round per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transskriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SD	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris Borate/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TCID	Tissue culture Infectious Dose
TCID 50	Tissue culture Infectious Dose 50
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethyl-ethylendiamin
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
VLDLR	Very Low-Density Lipoprotein Rezeptor
wt	Wild-Type

1. Einleitung

1.1 Adenoviren als Vektoren

Das Adenovirus wurde um 1950 erstmals beschrieben. Eine ausführliche Untersuchung sowie Charakterisierung erfolgte durch Hilleman und Werner 1954 und Rowe et al. 1953 (51. Hilleman und Werner 1954 / 52. Rowe et al. 1953). Die Isolation der Adenoviren geschah aus entzündeten Tonsillen, bzw. aus deren Krypten nach Wucherungen. Diese Erreger waren in der Lage Zellkulturen aus Tonsillengewebe zu lysieren (52. Rowe et al. 1953). Ein ähnlicher Erreger, der ein Jahr später isoliert wurde, war verantwortlich für eine fieberhafte Atemwegserkrankung in einer Kaserne und wurde von Hilleman und Werner 1954 (51. Hilleman und Werner 1954) beschrieben. Die Bezeichnung „Adenovirus“ wurde 1956 eingeführt (53. Enders et al. 1956). Seit der Entdeckung um 1950 bis heute wurden mittlerweile mehr als vierzig verschiedene Adenovirustypen beschrieben. Die Mehrzahl dieser Viren verursachen fieberhafte Infektionen der Atemwege, wobei aber auch Infektionen des Gastrointestinaltraktes nicht selten sind. Seltener sind die Adenoviren Ursache einer Keratokonjunktivitis, hämorrhagischen Zystitis oder Meningoenzephalitis. Einige der entdeckten Adenoviren besitzen die Potenz zur malignen Entartung der Zielzellen. Diese Onkogenität des Adenovirus „human type 12“ wurde 1962 erstmals beschrieben (29. Trentin et al.). Allerdings besitzen die für die Gentherapie am häufigsten eingesetzten Adenoviren Typ 2 und Typ 5 keine Onkogenität (30. Ali et al., 1994). Die Klassifizierung der Adenoviren erfolgt durch ihre chemischen bzw. ihre physikalischen Eigenschaften und wurde von Matthews et al. beschrieben (Matthews et al. 54. 1994, 55. Matthews et al. 1995, 56. Matthews et al. 1998a, 57. Matthews et al. 1998b, 58. Matthews et al. 1999). Der Aufbau des Adenovirus Typ 2 und Typ 5 ist gekennzeichnet durch eine lineare doppelsträngige DNA von 36 Kilobasen (kb) (50. Chroboczek 1992), wobei beide Stränge transkribiert werden. Innerhalb der viralen Transkription werden einige Regionen früher, andere dagegen später umgeschrieben. Die „frühen“ Regionen sind mit E1 bis E4 bezeichnet, wobei die „späten“ Genabschnitte mit II bis XII bezeichnet werden.

Das Adenovirus besitzt ein Protein Capsid aus 12 Pentonen und 240 Hexonen, wobei die Pentone aus einem Pentonbasisprotein und einem Fiberprotein bestehen. Die äußere Form des Virus entspricht einem Ikosaeder. Des Weiteren eine Anzahl von kleinen Proteinen VI, VIII,

IX, IIIa und IVa2 (siehe Abbildung 1a). Die Anheftung an eine Wirtszelle geschieht über die Fiberproteine an den hochaffinen Zelloberflächenrezeptor CAR (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor) (59. Bergelson 1997). Die physiologische Funktion des Rezeptors ist unklar, er spielt eine Rolle bei Zell zu Zell Kontakten (60. Walters 2002) oder in der Anheftung von MHC class I Proteinen (Major histocompatibility class) (61. Hong 1997). Nach Rezeptorbindung der Fiberproteine folgt eine Wechselwirkung zwischen den viralen Pentonproteinen mit den in der Zellmembran sitzenden Integrinen, wobei eine rezeptorvermittelte Endozytose folgt. Nach Eindringen in die Zelle gelangt das Endosom an die Kernmembran. Hier wird durch Verschmelzung des Endosoms die nackte virale DNA in den Zellkern geschleust. Die DNA wird nicht in die zelleigene DNA integriert während die promotervermittelte Transkription der viralen Genabschnitte beginnt. Nach Produktion der viralen Bestandteile und Zusammenbau der neu produzierten Viren erfolgt ein Absterben der Zelle durch das produzierte „adenovirus death protein“ (E3-11.6K). Bedingt durch die Zellyse werden die neu produzierten Adenoviren in die Nachbarschaft freigegeben. (62. Doronin 2003 und 63. Tollefson 1996). Die frühen Genabschnitte der E1 bis E4 Region spielen eine Rolle bei der adenoviralen Transskription, der viralen DNA Produktion, sowie der Immunsuppression der Wirtszelle und somit der Verhinderung der zelleigenen Apoptose. Die späten Abschnitte enthalten Information für den Zusammenbau der Hüllproteine und somit die Komplettierung des Virus. Als wichtigster Faktor in der frühen Replikationsphase ist somit der Abschnitt E1A zu nennen, der die Wirtszelle anregt, in die Synthesephase des Zellzyklus zu wechseln und somit die Voraussetzung zur viralen Replikation schafft (64. Flint 1997).

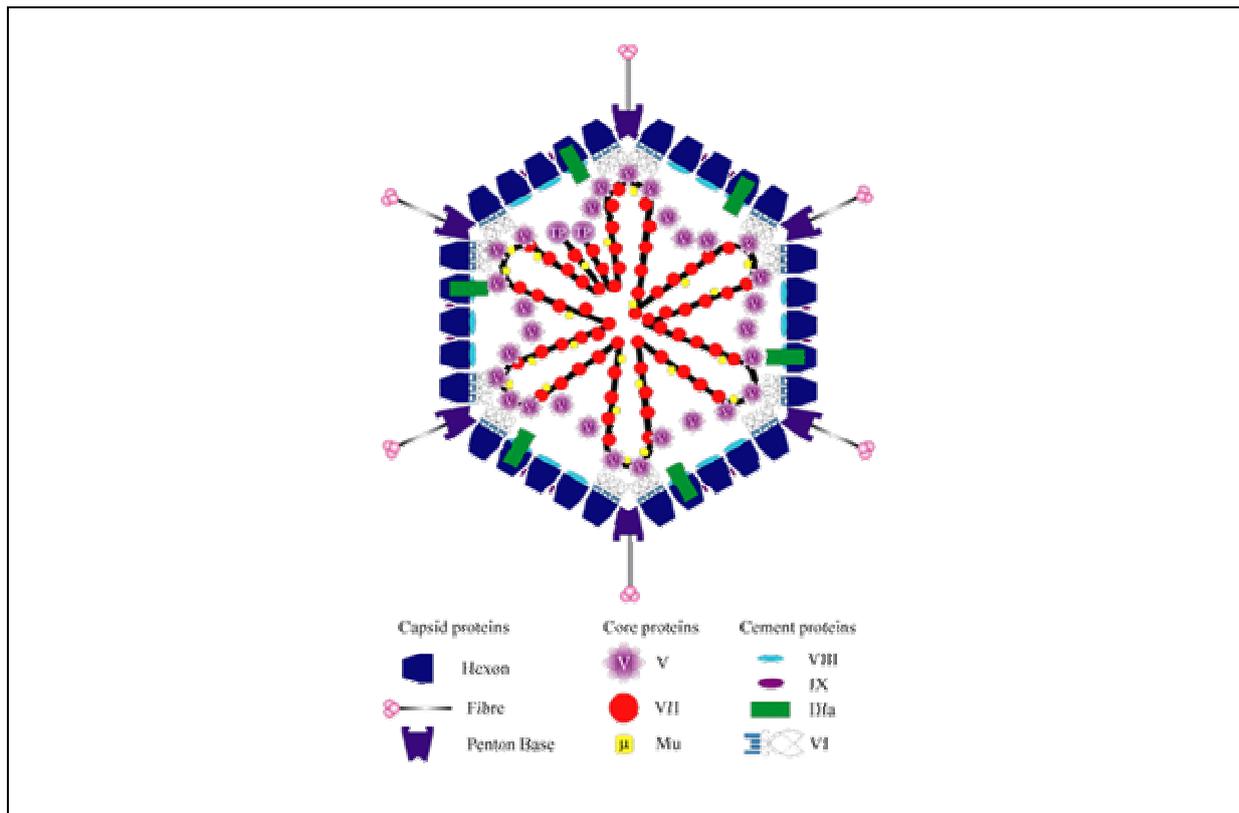


Abbildung 1a Schematische Darstellung des Aufbaus eines Adenovirus. Ebenfalls sind die Lokalisationen der verschiedenen Strukturproteine schematisch dargestellt und durch verschiedene Form und Farbe kenntlich gemacht. Bildquelle: W.C. Russel, Journal of General Virology. „Update on adenovirus and its vectors“ <http://www.sgm.ac.uk/jgvdirect/17217/17217ft.htm>

Adenoviren bieten sich für den Gentransfer an. Sie können rekombinat hergestellt werden und sind somit in ausreichender Menge zu produzieren. Durch Deletion der E1 Region kann die viruseigene Replikation unterdrückt werden und die infizierte Zelle wird nicht zerstört. Die restlichen physiologischen Funktionen der Wirtszelle bleiben erhalten. Zur Anzucht der E1 deletierten Viren werden Zelllinien benutzt, die die E1 Region in ihrem eigenen Genom integriert haben. Als Beispiel kann die HEK 293 (human embryonic kidney) genannt werden. Weitere Zelllinien mit transfizierter E1 Region sind: 911-Zellen, HER-Zellen (human embryonic retina) oder bestimmte HeLa-Zellen (GH329-Zellen).

Ein Problem der ersten Zelllinien besteht darin, dass die zelleigene E1 Region sich mit den Abschnitten der viralen DNA überlappt. Es kann somit nach Rekombination dieser Abschnitte zu einer Virenproduktion kommen, deren zweite Generation durch Einbau der E1 Region wieder replikationsfähig ist. Diese Viren werden dann als replikationskompetent bezeichnet. Sie können sich dann autonom weiter vermehren und sind somit für gentherapeutische Ansätze nicht mehr zu gebrauchen, da sie ihre Pathogenität wieder erlangt haben (65. Hehir 1996, 66. Zhu 1999). Adenoviren der zweiten Generation zeichnen sich dadurch aus, dass

ihnen weitere Teile des viralen Genoms deletiert worden sind. Der Vorteil liegt in der vergrößerten Transportkapazität für therapeutische DNA und der geringeren Immunreaktion des Wirtsorganismus (71. Gorziglia et al. 1999). Die verpackte genetische Information kann sogar größer sein als das ursprüngliche Wildtyp Genom. Die Wildtypgröße von 36 kb kann bis zu 37,75 kb erweitert werden, dies entspricht ungefähr 105% der Ausgangsgröße.

Eine Weiterentwicklung stellen der Adenoviren der dritten Generation dar, die als helperabhängige Viren bezeichnet werden (67. Parks 1996). Sie rufen im Gegensatz zu den Adenoviren der ersten Generation kaum Entzündungsreaktionen hervor.

Bei gentherapeutischen Anwendungen muss man beachten, dass auch die Toxizitätsgrenze nicht erreicht wird. Die Toxizität beruht vermutlich auf der adenoviralen Hülle und wird mit circa 6×10^{11} Partikel/kg Körpergewicht angegeben (69. Raper 2002). Es wird deutlich, dass bei den gentherapeutisch eingesetzten Viren eine genaue Titerbestimmung der Virenpräparationen wichtig ist.

1.2 Familiäre Hypercholesterinämie (FH)

Bei der familiären Hypercholesterinämie (FH) handelt es sich um eine autosomal rezessive Erkrankung, wobei es zu Mutationen im Gen des Low-Density Lipoprotein Rezeptor (LDLR) kommt. Diese Mutation führt zu einer erniedrigten Expression von LDLR und somit zu einer Erhöhung der Low-Density-Lipoprotein (LDL) Fraktion im Blut.

Das LDL ist für den Transport des Cholesterins im Blut zum großen Teil verantwortlich. 70% des im Körper zirkulierenden Cholesterins werden durch LDL transportiert und nach Bindung an die hepatischen LDLR via apoB-100 in die Zelle aufgenommen. Ist dies durch Reduktion oder Fehlen der LDLR eingeschränkt oder nicht mehr möglich, lagert sich das Cholesterin ab. Dies geschieht an den Gefäßwänden und führt zur Arteriosklerose. Die daraus folgenden Herz- und Gefäßerkrankungen können schon frühzeitig zu Malperfusionssyndromen (z.B. periphere arterielle Verschlusskrankheit, Koronare Herzkrankheit) und schließlich zum Herzinfarkt führen. Als phänotypisches Merkmal sind Ablagerungen unter den Augen so genannte Xantheasmen oder ein Kornealring zu erkennen (72. Hobbs et al. 1992). Diese Erkrankung ist mit einer Häufigkeit von 1/500 Geburten sehr häufig, allerdings fällt die LDL Erhöhung bei den heterozygoten Trägern dieser Erkrankung nicht so dramatisch aus, wie bei den viel seltener vorkommenden homozygoten Trägern (Häufigkeit 1:1 000 000). Ob die

Mutation in demselben oder in zwei verschiedenen Abschnitten der zwei Gene liegt, spielt für die Ausprägung der Symptome nur eine untergeordnete Rolle. Die homozygoten Träger der FH haben massiv erhöhte Werte (ca. 1000 mg/dl) für Serum LDL (1. Goldstein et al. 2001.) Diese massiven Erhöhungen sind unabhängig von der Ernährung in verschiedenen Ländern. Ein Vergleich zwischen homozygoten LDL defizienten Trägern aus China und Westeuropa ergaben vergleichbare Plasmawerte von LDL (2. Sun, X.M. et al. 1994.).

Bei der heterozygoten Form hängen die kardiovaskulären Folgen von der Ausprägung der Störung des LDL Rezeptors, sowie von weiteren kardialen Risikofaktoren ab. Zu nennen sind an dieser Stelle, Nikotinabusus, Adipositas, ballaststoffarme Ernährung sowie eingeschränkte körperliche Betätigung (3. Hill, J.S. et al. 1991). Die heterozygoten Merkmalsträger bekommen meist unbehandelt um die dritte Lebensdekade arteriovasculäre Komplikationen. Die homozygoten Träger haben meist schon in ihrer Kindheit, spätestens jedoch mit Beginn der zweiten Lebensdekade lebensbedrohliche kardiovaskuläre Ereignisse. Diese stellen sich in Form von supra-avalvulärer Aortenstenosen oder als Folge dieser Stenosen Sklerosierungen der Koronararterienostien und somit einen Herzinfarkt (73. Summers et al. 1998).

Über 900 verschiedene Mutationen des LDLR Gens sind bis jetzt bekannt (4. www.Ucl.ac.uk/fh), so dass zurzeit ein Screening der Bevölkerung keinen präventiven Nutzen bringen würde. Auch die gleiche LDLR Mutation hat keinen prädiktiven Wert auf Dauer und Komplikationen der Erkrankung (11. Hegele, R.A. 2002). Der LDL Rezeptor besitzt eine extrazelluläre Domäne die hochaffin an das LDL bindet und durch Faltung das LDL an die Zellmembran heranführt und in das Zellinnere als Endosom verpackt entlässt (5. Rudenko, G. et al. 2002). Die extrazelluläre Domäne besitzt eine Ligandenbindungsdomäne, diese wird mit in das Endosom aufgenommen. Im aziden Milieu des Endosoms beginnt die Rückfaltung des LDLR und der Ligandenbindungsdomäne fungiert eine β -Propeller Struktur als Pseudosubstrat um einerseits das LDL im Endosom zu belassen und andererseits den LDLR wieder an die Zelloberfläche zu bringen. Viele Störungen des LDLR beruhen auf einer Mutation der codierenden Sequenzen dieser β -Propeller Struktur. Eine Rückfaltung des LDLR nach Bindung an das LDL ist somit nicht mehr möglich (6. Jeon, H., et al. 2001). Ein Überblick des LDLR soll folgende Abbildung geben.

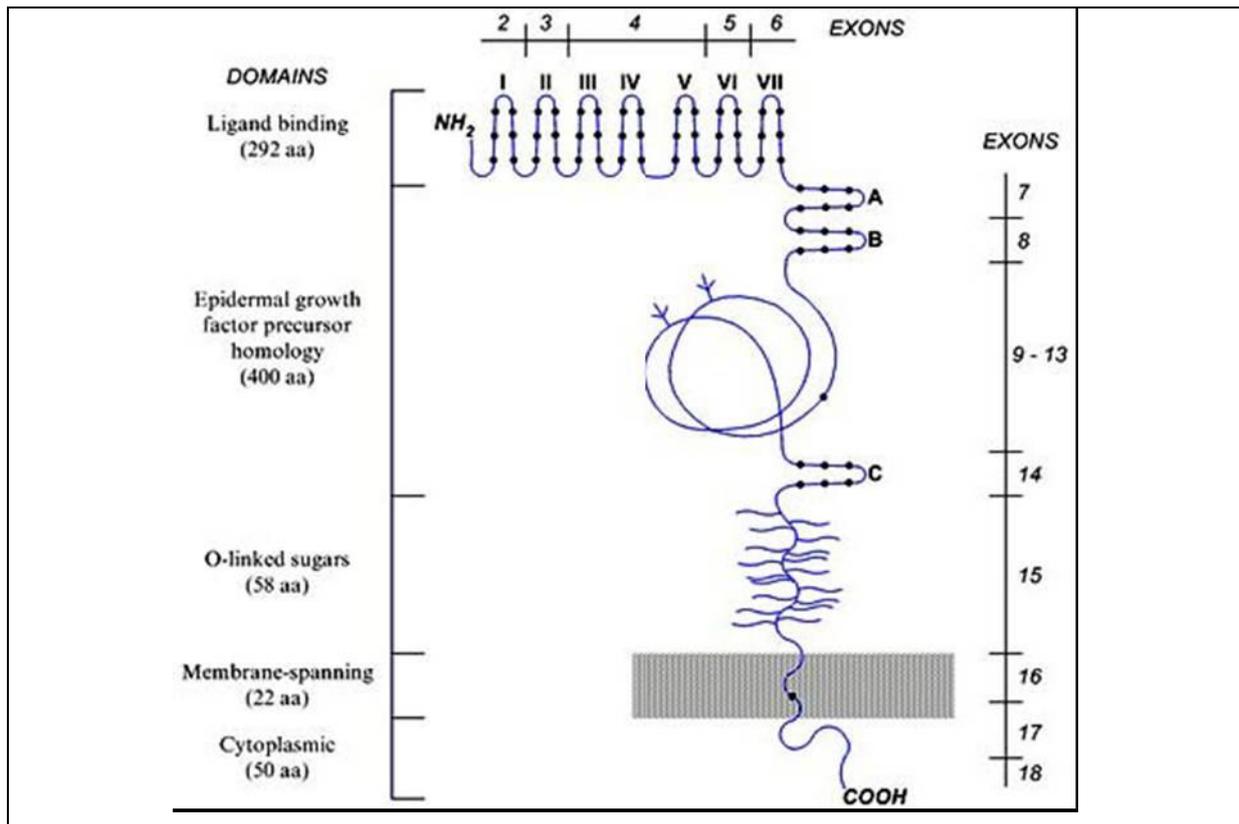


Abbildung 1b Struktureller Aufbau des LDL-Rezeptorproteins.

Darstellung der codierenden Exons, sowie schematische Darstellung der Proteinfaltung außerhalb der Zellmembran, sowie deren Homologien zum Epidermal growth factor Bildquelle: <http://www.iemrams.spb.ru:8100/english/molgen/fh-en/ldl-rec.htm>

Durch die starke Erhöhung der Serum LDL-Werte und der damit verbundenen eingeschränkten medikamentösen therapeutischen Ansätze ergibt sich die Frage nach weiteren Behandlungsansätzen bei der homozygoten familiären Hypercholesterinämie. Aufgrund des frühzeitigen Auftretens von Krankheitssymptomen mit ebenfalls frühzeitigen letalen Folgen, stellt sich die Frage nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten. Neben eben diesen konservativen pharmakologischen Ansätzen bietet der gentherapeutische Ansatz neue Ansätze in der Therapie der familiären Hypercholesterinämie. Ein Ziel wäre ein frühzeitiges und lebenslang wirksames Heilungsprinzip zu finden.

1.3 Therapieansätze bei der familiären Hypercholesterinämie

Für die familiäre Hypercholesterinämie gibt es derzeit eine Vielzahl von therapeutischen Ansatzmöglichkeiten. An erster Stelle steht die möglichst cholesterinarme Ernährung. Arteriosklerotische Risikofaktoren sollten ausgeschaltet werden. Dies gilt insbesondere für das Rauchen, Übergewicht und Bewegungsmangel (3. Hill, J.S. et al. 1991). Die meisten medikamentösen Interventionen basieren auf einer Reduktion der Fettsynthese oder der Fettaufnahme in den Organismus. Die derzeitigen pharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten haben allerdings nur einen therapeutischen und damit lebensverlängernden Effekt bei der heterozygoten Form der familiären Hypercholesterinämie. Zum einen sind hier die weit verbreiteten Statine zu nennen. Diese wirken über die Hemmung der HMG-CoA Reduktase und eine „de novo“ Synthese von Cholesterin in der Leber wird gehemmt (76. Henry et al. 1985, 77. Istvan E., Deisenhofer J. 2001). Als Folge wird die körpereigene Genregulation der LDLR Produktion erhöht. Allerdings haben die HMG-CoA Reduktase-Hemmer nur einen geringfügigen Effekt bei Patienten der familiären Hypercholesterinämie und dann auch nur, wenn sie in hohen Dosen appliziert werden (74. Goldstein et al. 1987, 75. Brorholt-Petersen et al. 2001, 9. Gagne, C., Gaudet, D. and Bruckert, E. 2002).

Ältere pharmazeutische Konzepte beruhen auf der Gabe von Gallensäurederivaten die in den enterohepatischen Kreislauf eingreifen und die Ausscheidung von Fetten durch den Darm fördern sollen. Allerdings haben seit der Entdeckung der Statine diese nur noch Bedeutung bei milden Verläufen der Hyperlipidämie.

Stanoester, die die Aufnahme von Cholesterin verringern, indem sie aus den Mizellen Cholesterol entfernen, werden ebenfalls eingesetzt (70. Thompson GR., Grundy SM. 2005). Die Stanoester werden allerdings nur als Kombinationstherapie verwendet, da sie alleinig keine ausreichenden Effekt besitzen (7. Miettinen, T.A. and Gylling H. 1999).

Ezetimibe ein Stoff der die Absorbtion von Cholesterol verringert, steht seit einiger Zeit zur Verfügung. Ezetimibe bindet an die Mikrovilli der jejunalen Enterozyten und interferiert mit der enterhepatischen Zirkulation des Cholesterols. Vermutlich wird ein Cholesteroltransporter inhibiert (8. Van Heck, M. et al. 1997). Es resultiert eine 20%ige Reduktion des Serum LDLs.

Alle diese medikamentösen Therapien führen bei homozygoten Trägern der LDLR-Defizienz nicht zur ausreichenden Senkung des Serum Cholesterins, so dass die Folgen der arteriosklerotischen Veränderungen im besten Falle nur zeitlich verzögert auftreten und eine extrakorporale Entfernung des Serum LDL durch eine Blutwäsche erforderlich wird. Hierbei werden die LDL Partikel durch Heparin oder Dextransulfat herausgewaschen (78. Nishimura S., Sekiguchi M. Kanol T. et al.1999; 79. Smilde T.J., Van Wissen S., Wollersheim H. et al 2001). Diese so genannte Aphaese muss allerdings alle ein bis zwei Wochen wiederholt werden. Sie führt zu einem Rückgang der Xanthelasmen und zu einer verzögerten Ausbildung der arteriosklerotischen Komplikationen. Vollständig verhindert werden diese Komplikationen allerdings nicht, da in den dialysefreien Intervallen genug Zeit verbleibt, in denen sich das Cholesterin gefäßwandschädigend ablagern kann. (10. Thompson, G.R. 2003). Es ergibt sich die Frage nach einer langfristigen Methode den eigentlichen Rezeptordefekt zu beheben. Gentransfer könnte der geschädigten Zelle die Möglichkeit zur Produktion von LDLR zurückgeben. Dies ist der theoretische Ansatz der gentherapeutischen Maßnahmen auf diesem Gebiet.

1.4 Entstehungsgeschichte der Gentherapie, insbesondere in Bezug auf die familiäre Hypercholesterinämie

Die familiäre Hypercholesterinämie war einer der ersten monogenetischen Erkrankungen, für die mit der Entwicklung einer Gentherapie begonnen wurde. Grundsätzlich ist die Gentherapie definiert als das Einführen von Nukleinsäuren in eine somatische Zelle mit dem Zweck der Behandlung oder Heilung einer erworbenen oder angeborenen Erkrankung. Diese Nukleinsäuren sollen den genetischen Defekt des Patienten korrigieren, entweder durch Ersatz des defekten Gens oder Kompensation des Defektes.

Die ersten Versuche wurden an einem Kaninchen Tiermodell (12. Wilson et al. 1990; 13. Chowdhury et al. 1991; 14. Raper et al. 1992) durchgeführt. Hierbei wurden autologe Hepatozyten mit rekombinanten retroviralen Vektoren, die das LDLR-Gen trugen, transduziert. Danach wurden die Hepatozyten durch die Portalvene den entsprechenden Tieren injiziert. Die ersten Versuche am Menschen wurden zwei Jahre später durchgeführt (15. Grossmann et al. 1994; 16. Grossmann et al. 1995). Die Ergebnisse der LDL-Senkung waren allerdings nicht überzeugend und höchstens als moderat zu bezeichnen. Die Methode war

aufwendig und mit einem operativen Eingriff verbunden, da die Spenderzellen erst aus dem Organismus entnommen werden mussten, um sie dann zu infizieren.

Der erste direkte *in vivo* Versuch erfolgte im Jahre 2000 (17. Ylä-Herttuala, S. and Martin, JF. 2000). Hierbei wurden Wachstumsfaktoren zur Angiogenese bei kardiovaskulären Erkrankungen erfolgreich transduziert. Bei der familiären Hypercholesterinämie ist der Bestimmungsort des Gentransfers die Leber, denn dort findet der größte Teil des Fettstoffwechsels statt. Hierbei wurden verschiedene Methoden getestet, den Transfer möglichst vor Ort herbeizuführen.

Versuche, virale Vektoren direkt in das Leberparenchym zu geben, wurden im Jahre 2000 erstmals durchgeführt (18. Kuriyama et al. 2000). Es folgten weitere Versuche den Vektor in das Zielorgan zu transportieren. Zum Beispiel der Transfer in die Milzkapsel (19. Chen et al., 2000), durch die Leberarterie (20. Raper et al., 2002) oder durch die Portalvene (21. Kozarsky et al., 1994; 22. Pakkanen et al., 1999). Tiermodelle der familiären Hypercholesterinämie wurden an Kaninchen durchgeführt (23. Watanabe 1980). Diese LDLR defizienten Kaninchen haben, wie das humane Homolog erhöhte LDL Plasmawerte, diffuse arteriosklerotische Veränderungen sowie Xanthelasmen (24. Goldstein et al. 1983).

Ein Mausmodell durch „knock out“ des LDLR wurde 1993 entwickelt (25. Ishibashi et al. 1993). Dieses Modell allerdings zeigte eine nicht so ausgeprägte Hypercholesterinämie, wie das Kaninchenmodell. Erst unter Fütterung einer hochgradig Fett enthaltenden Nahrung entwickelten die Mäuse die typischen Symptome einer Hypercholesterinämie (z.B. Arteriosklerose der Aorta). Der Grund liegt in den Unterschieden des Fettstofftransports in der Maus. Bei prädominanten High density lipoprotein (HDL) als Träger des Cholesterins in der Maus anstatt des LDLs ist der Effekt des LDLR-Defektes für die Maus nicht so relevant. Ferner wird in der Maus das apo B-48 exprimiert (26. Greeve et al. 1993), welches eine Aufnahme außerhalb des Weges über LDL ermöglicht. Lipoproteine die das apo B-48 beinhalten können zum Beispiel über LDLR-related protein (LRP) aufgenommen werden (27. Martins et al. 2000).

Ein Mausmodell mit doppelten „knock out“ von LDLR und dem ApoB mRNA editing polypeptide 1 (apobec-1) haben Lipoproteinmuster, die ähnlich denen in der familiären Hypercholesterinämie sind. Diese Mäuse entwickeln auch ohne fetthaltige Diät nach acht Monaten eine manifeste Arteriosklerose (28. Powell-Braxton et al. 1998). Durch die Weiterentwicklung der viralen Vektoren durch Lundstrom wurde die Möglichkeit einer direkten Gentherapie einfacher (31. Lundstrom 2003). Es gab auch Versuche, DNA-Protein Komplexe direkt in die Leber von LDLR defizienten Watanabe heritable hyperlipidemic

(WHHL) Kaninchen zu geben (32. Wilson et al. 1992). Ein anderer Ansatz gelang durch die Expression eines LDLR und eines Transferrin Fusionsproteins. Dieses Fusionsprotein bindet spezifisch LDL und wird von Fibroblasten in WHHL Kaninchen aufgenommen (33. Parise et al. 1999).

1.5 Gentherapeutische Methoden bei der familiären Hypercholesterinämie

Der erste in vivo Transfer mit Adenoviren wurde von Ishibashi 1993 durchgeführt. Hierbei wurden E1 deletierte Adenoviren benutzt, um das LDLR Gen in LDLR defiziente Mäuse zu transfizieren, allerdings hielt die cholesterinsenkende Wirkung weniger als drei Wochen an (25. Ishibashi et al. 1993). Weitere Ansätze folgten von Kozarsky et al., Li et al. und Cichon et al. (21. Kozarsky et al. 1994, 34. Li et al. 1995, Cichon et al. 2004). In der Cichon-Studie musste allerdings auch festgestellt werden, dass es nicht nur zur Senkung des Cholesterinserumspiegels, sondern auch zu Kristallisation von Cholesterin innerhalb der Zelle kam. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, statt den defekten LDL-Rezeptor zu ersetzen, den VLDL-Rezeptor übermäßig zu exprimieren. Hier wurde davon ausgegangen, dass der VLDL-Rezeptor das Zwischenprodukt des LDL katabolisiert. Kobayashi et al. und Kozarsky et al. konnten damit eine verlängerte Phase der Erniedrigung des Serumcholesterols in LDLR-Knock out Mäusen messen (36. Kobayashi et al. 1996 und 37. Kozarsky et al. 1996). Die erste Generation der Adenoviren beinhaltet noch Sequenzen, die die virale Genexpression ermöglichen. Durch diese Genprodukte wird im infizierten Organismus eine Entzündungsreaktion hervorgerufen, die in eine zelluläre immunologische Reaktion übergeht und somit die infizierten Zellen angreift und vernichtet. Durch Untergang dieser Zellen ist auch die Expression der gewünschten Gene und damit Proteine zeitlich begrenzt. Der jüngsten Generation der Adenoviren fehlen diese Sequenzen, eine Entzündungsreaktion fällt deutlich geringer aus und die Expression des gewünschten Gens wird prolongiert. Dies wurde von Oka et al. 2001 gezeigt (38. Oka et al. 2001). Trotzdem können Adenoviren auch weitreichende Entzündungen hervorrufen, so dass der betroffene Organismus heftig reagieren kann (39. Lehrmann 1999, 40. Marshall E. 1999). Ein Parvovirus, durch seine zufällige Entdeckung als kontaminierendes Virus bei Adenoviren als „Adeno assoziiertes Virus“ (AAV) benannt, bietet eine weitere Möglichkeit als Vektor in der gentherapeutischen Therapie. Diese Viren bieten die Möglichkeit einer langen und stabilen Genexpression in dem infizierten

Organismus. Versuche mit VLDL in LDL^{-/-} Mäusen zeigte eine 40%ige Reduktion von Plasmacholesterin über sieben Monate (19. Chen et al. 2000). Wobei nach neueren Versuchen die Serotypen AAV-7 und AAV-8 mehr Potenz in der Normalisierung des Plasmacholesterins und der Verhinderung der Arteriosklerose zeigen als die erstmalig eingesetzten Vektoren AAV-2 (41. Leberherz et al. 2004). Es wurden auch Versuche mit Retroviren an ex vivo transduzierten Hepatozyten unternommen. Diese bauen ihre cDNA, die die Information des LDL-Rezeptors enthält, in die zelluläre DNA ein. Der Nachteil dieser Vektoren liegt in der Stimulation des Zielgewebes, sprich in der Proliferation der Hepatozyten. Eine aufwändige und teils toxische Methode für das Zielgewebe ist die Folge. So werden Leberteilresektion oder Stimuli wie z.B. Thymidinkinase hierbei benutzt (22. Pakkanen et al. 1999). Lentiviren stellen noch eine Alternative zur gentherapeutischen Behandlung dar. Im Vergleich zu den Retroviren sind sie auch in der Lage, sich nicht teilende Zellen zu infizieren. Somit kann die gentische Information über längere Zeit expremiert werden. Versuche hierzu wurden von Kafri et al. 1997 unternommen (42. Kafri et al. 1997 und 43. Kafri et al. 2001).

1.6 Titerbestimmungen von Viren / Adenoviren

Bis heute gibt es noch keine genormte Methode, die zur Ermittlung eines viralen Titer verwendet wird. Viele Methoden haben sich über die Zeit zwar etabliert, die meisten bieten allerdings immer noch nicht die Möglichkeit über Laborebene hinaus Virenpräparationen miteinander vergleichen zu können.

Um in gentherapeutischen Experimenten vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, müssen Angaben bezüglich eingesetzter Viren bestimmt sein. Ebenso wichtig wie die Art des eingesetzten Virus, ist die Angabe über die Menge oder Partikelzahl des Virus. Eine Schwierigkeit besteht darin, die genaue Anzahl der Viren zu bestimmen. 1961 veröffentlichte Philipson eine Methode, um Adenoviren mittels einer Fluoreszenzmessung in Zellen zu zählen (44. Philipson L. 1961). Die erste Möglichkeit eines fluoreszenzbasierten Plaque Assays wurde von Thiel bzw. Smith 1967 beschrieben. Es ist möglich, durch direkte Mikroskopie und Errechnung der eingesetzten Konzentrationen einen viralen Titer zu bestimmen (45. Thiel J.F. and K.O.Smith und 46. K.O. Smith and Thiel. 1967). Eine Weiterentwicklung stellt die Messung viraler Aktivität in einlagigen Zellkulturen dar. Hier kann man durch Anfärbung der infizierten Bereiche die Infektion mit dem Virus nachweisen.

Dies kann auch über Anfärbung bestimmter Antikörper geschehen (47. Bewig B. et Schmidt 2000). Über eine Verdünnungsreihe kann man die Konzentration der Virenpräparation ermitteln, die noch eine Infektion vermitteln kann. Hier spricht man dann von Plaque forming units (pfu). Diese Methode gilt auch heute noch unter Virologen als allgemein gültig. Um eine Einheit zu erhalten, werden diese auf Milliliter der Infektionsmenge bezogen, es ergibt sich somit die Einheit pfu / ml. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den cytopathischen Effekt (CPE) der Viren zu ermitteln. Die Methode basiert darauf, dass auf Zellkultur aufgebrachte Viren nach der Infektion im Rahmen einer bestimmten Zeit den Zelltod vermitteln. Die in der Zellkultur sichtbaren Bereiche von Zelltod können in Bezug auf die ebenfalls verwendete Verdünnungsreihe über eine Näherungsgleichung Auskunft über den Titer der verwendeten Viren-Stammlösung geben. Diese Methode wird später innerhalb der Arbeit ebenfalls benutzt und dort nochmals genauer erläutert.

Grimm et al. entwickelte ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), der zur Titration von Adenoviren benutzt werden kann. Grimm weißt durch den Antikörper ein Protein des Viruscapsids nach (48. Grimm et al. 1999). Neue Möglichkeiten bietet die quantitative Real-Time PCR. 2002 wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR AAV-2 Vektoren zu titrieren (49. Veldwijk 2002). In dieser Arbeit wurde eine Möglichkeit gezeigt eine schnelle und reproduzierbare Methode der Titration von AAV-2 Viren zu schaffen. In zellbiologischen Ansätzen bietet sich der Bezug auf die Zellzahl an. Man spricht hier von der „Multiplicity of infection“ (MOI). Eine MOI von 100 bedeutet somit den Einsatz von hundert Viren auf eine Zielzelle.

2. Ziel der Arbeit und Arbeitshypothesen

In der gentherapeutischen Therapie der familiären Hypercholesterinämie wurden Adenoviren eingesetzt, die den LDL-Rezeptor exprimieren können. Bei der Wahl der Promotoren zur Expression des LDL-Rezeptors wurden bis dahin konstitutive Promotoren eingesetzt. Diese führten zu kristallinen Cholesterinablagerungen in den Zielzellen. Um dieses Problem zu beheben, wurde ein cholesterinregulierter Promoter (P_{-600ap}) humaner Herkunft entwickelt, der eine überschießende zellschädigende Expression verhindern soll. Der Vergleich des humanen cholesterinregulierten Promoters im Vektor Ad-P_{-600ap}hLDLR soll mit dem konstitutiven Promoter des Rous sarcoma Virus im Vektor Ad-RSV hLDLR verglichen werden. Es soll weiterhin überprüft werden, ob der neu entwickelte Vektor in der Lage ist, eine Expression des LDL-Rezeptors in einer Höhe zu erreichen, die eine Anwendung im gentherapeutischen Bereich möglich macht. Die Testung und der Nachweis der Expressionsstärke von LDL-Rezeptoren sollen nach Expression in Zellkulturen erfolgen. Vortestungen der Virenkonstrukte an Mäusen sollten ergänzend durchgeführt werden. Hierzu dienen einerseits Wildtypmäuse um die Applikationsart zu testen und die Dosisanpassung zu optimieren, andererseits LDL-Rezeptor Knock-out Mäuse, um schon eventuelle Effekte auf dem Niveau der Lipidkonstellation im Serum sichtbar zu machen bzw. immunhistochemische Gewebenachweise zu führen. Um Promotoren vergleichen zu können, müssen die genauen Titer der Virenpräparationen bekannt sein. Um dies zu erreichen werden konventionelle Methoden wie die TCID-Titerbestimmung eingesetzt. Als neuartige Methode der genauen Quantifizierung soll eine Real-Time PCR entwickelt werden. Es sollte die Frage geklärt werden, ob ein infektiöser Titer mit Hilfe der quantitativen PCR (Real-Time PCR) ermittelt werden kann und welche Bedingungen dabei erfüllt werden müssen. In diesem Zusammenhang galt es, Untersuchungen zum Mechanismus der Aufnahme von Virus in die Zelle zu machen. Hierbei wurden Viren mit Fluorophoren markiert, sowie deren Weg zum Zellkern mittels konfokaler Mikroskopie sichtbar gemacht. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse sollen dann, zur Absicherung des Titers von Ad-P_{-600ap}hLDLR und Ad-RSV hLDLR dienen und die Frage nach der Möglichkeit einer Anwendung des neuentwickelten Vektors Ad-P_{-600ap}hLDLR für gentherapeutische Zwecke klären.

3. Material und Methoden

3.1 Methoden:

3.1.1 Herstellung der Virenstocks von Ad-P_{-600ap}hLDLR und Ad-RSV hLDLR

Als produzierende Zellen zur Herstellung der Virenstocks wurden 293 Zellen (siehe Seite 32) benutzt. Alle folgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Zur Vorbereitung der Infektion wurden 20 Zellkulturflaschen (siehe Seite 33) mit 300 cm² Grundfläche benutzt und 293 Zellen darin kultiviert (siehe Kapitel „Zellkulturen“). Nach drei Tagen Wachstum der Zellen, waren diese circa 70 % konfluent, so dass die Infektion mit Ad-P_{-600ap}hLDLR erfolgen konnte. Die Infektion wurde mit einer MOI von 5 in 15 ml Komplettmedium (siehe Seite 38) durchgeführt, wobei die Infektionszeit 4 h betrug. Danach wurde die Komplettmediummenge auf 50 ml pro Zellkulturflasche aufgefüllt. Nach zwei Tagen und deutlichen CPE-Effekten einzelner vom Flaschenboden gelöster Zellen konnte mit der „Ernte“ begonnen werden. Diese geschah durch Abschaben der Zellen, die zusammen mit ihrem Medium in ein 50 ml Röhrchen (siehe Seite 39) überführt wurden. Eine sofortige Zentrifugation von 20 min bei 500 g und 4 °C folgte, wonach der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde nun mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und danach im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Diese Frier-/ Tau-Lyse wurde wiederholt und nach dem dritten Einfrieren, wurde das Zellysat- / Virusgemisch bei -80 °C gelagert.

Die weitere Aufreinigung des Gemisches geschah durch einen dreischichtigen Cäsium-Chlorid (CsCl) Gradienten (siehe Seite 37). Die CsCl-Lösungen wurden in einem Ultrazentrifugenröhrchen (siehe Seite 33) mittels einer sterilen Kanüle unterschichtet, beginnend mit 1 ml der 1,2411 g/cm³ Lösung, gefolgt von 2 ml der 1,3393 g/cm³ Lösung, darauf 1ml der 1,4525 g/cm³ Lösung. Nun wurden 5ml des aufgetauten Zellysat- / Virusgemisches auf den vorbereiteten Gradienten geschichtet.

Die Röhren wurden in einem SW41 Rotor (siehe Seite 35) für 2 Stunden bei 35000 rpm und 10 °C zentrifugiert.

Die charakteristische Schichtung im CsCl-Dichtegradienten (siehe Abbildung 1) wurde beobachtet und mittels einer Kanüle, erst die oberen Banden (Lipide, genomische DNA, zelluläre Rückstände und leere Virushüllen) abgenommen.

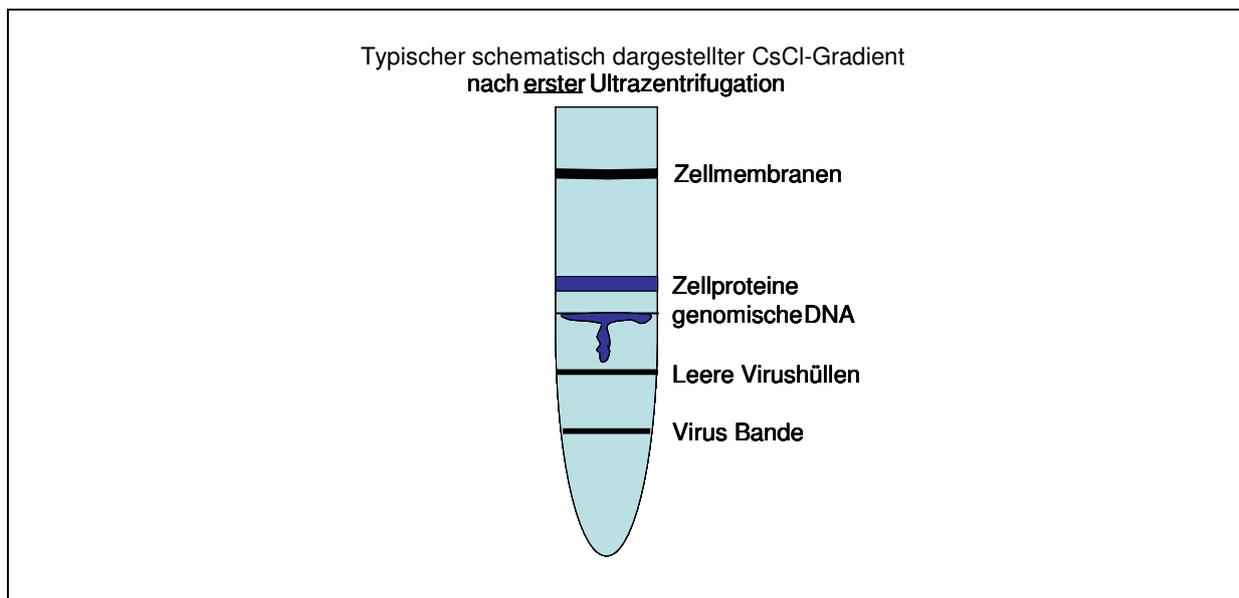


Abbildung 2 Darstellung eines CsCl-Gradienten nach erster Ultrazentrifugation.

Dargestellt ist das Ultrazentrifugenröhrchen mit typischer Schichtung der Bestandteile der Virenproduktion. Die Schichtung erfolgt aufgrund der verschiedenen Dichtegradienten der Cäsiumchloridlösungen, sowie der geschichtenden zellulären und viralen Bestandteile während der Zentrifugation.

Als Nächstes folgte die Abnahme der Virusbande, wobei darauf geachtet wurde, diese vollständig und ohne Verunreinigungen aufzunehmen. Die abgenommene Virusbande wurde in ein neues Ultrazentrifugenröhrchen überführt, welches mit 10 ml der $1,35 \text{ g/cm}^3$ CsCl-Lösung befüllt war. Es folgte eine 20 stündige Zentrifugation bei 30.000 rpm und 10°C. Es sollte eine deutliche Virusbande erkennbar sein, die dann wie oben beschrieben abgenommen werden kann. Die abgenommene Virusbande wurde mittels einer NAP 25 Säule (siehe Seite 32), die vorher mit Adeno storage buffer (siehe Seite 36) equilibriert wurde, in 2 ml Adeno Storage Buffer eluiert. Das Eluat wurde durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Mikrofilter (siehe Seite 33) steril filtriert. Die gewonnene Menge an aufgereinigter Viruslösung wurde aliquotiert und bei -80°C bis zur jeweiligen Anwendung gelagert und frisch aufgetaut.

Die Produktion des Vektors Ad-RSV hLDLR erfolgten analog nach dem oben beschriebenen Procedere, wobei die Infektion der 293 Zellen mit Ad-RSV hLDLR erfolgte.

3.1.2 Titerbestimmung durch Ermittlung der Tissue Culture Infectious Dose

Zur Ermittlung des infektiösen Titers einer unbekanntem Virenlösung z.B. nach einer neuen Virenpräparation, wurde der TCID-Wert (Tissue Culture Infectious Dose) bestimmt. Dies geschieht über die Beobachtung des cytopathischen Effektes (CPE) bestimmter zur Virenreplikation fähigen Zellen. In Falle dieser Arbeit wurden 911 Zellen (es handelt sich um eine komplementaktivierende Zelllinie humaner Retinoblasten) in üblicher Weise angezüchtet (siehe Kapitel „Zellkultur“). Die Zellen wurden in einer Verdünnung von ca. 10^5 Zellen / ml in 2% DMEM (Komplettmedium mit 2% FCS, siehe Seite 38) angezüchtet. Pro Well einer 96-Well Platte wurden 100 μ l des Gemisches ausgesät.

Den Zellen wurde 24 h Zeit gegeben anzuwachsen und der Erfolg mikroskopisch kontrolliert. Die Verdünnungsreihe des Virus wurde ausgehend von 1 ml Grundlösung bis zu der Konzentration von 10^{-14} /ml stufenweise verdünnt.

Die Infektion der Zielzellen in der 96-Well-Platte mit den Virenlösungen begann bei einer Konzentrationsmenge von 10^{-7} / ml (0,2 ml pro Well) und endete bei der 10^{-14} / ml Verdünnung. Jeweils 10 Wells wurden mit derselben Virenkonzentration infiziert und zwei weitere Wells wurden ohne Vireninfection als Negativkontrollen weiter kultiviert. Die Versuchsanordnung inklusive der verwendeten Verdünnungsreihen wird aus der Abbildung 3 ersichtlich.

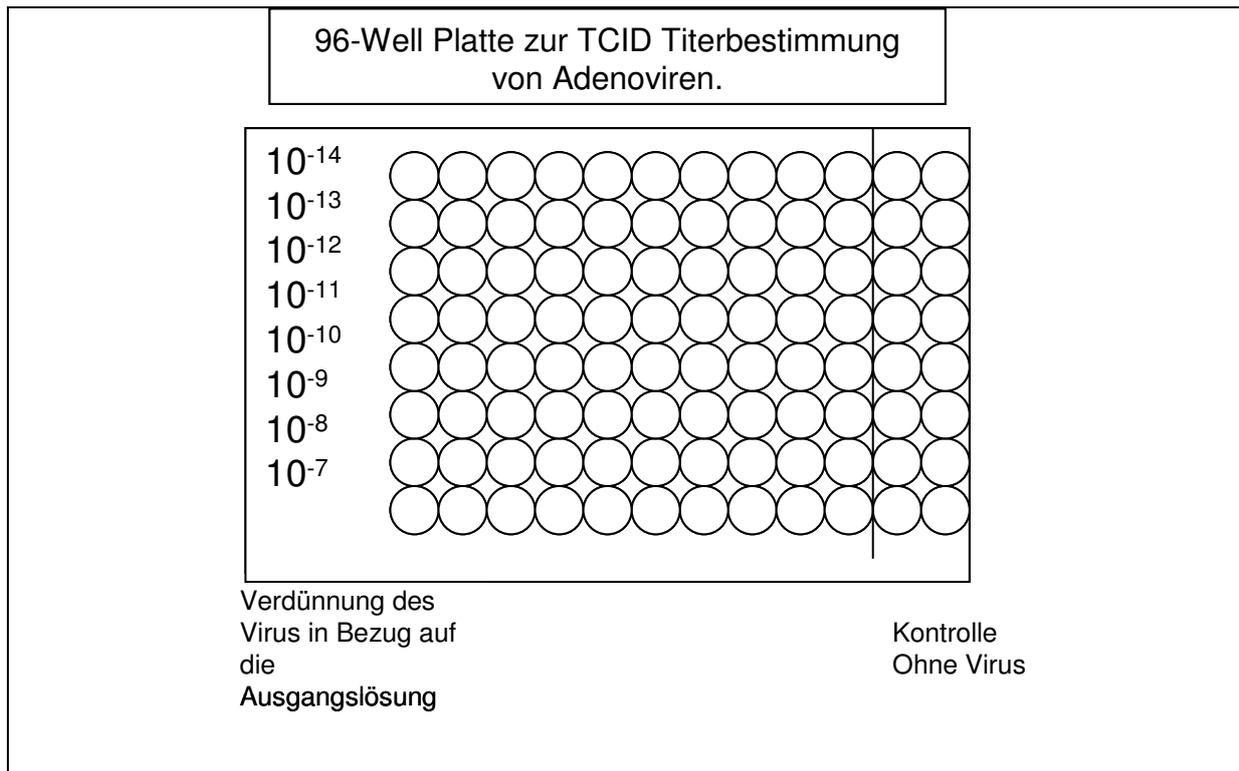


Abbildung 3 Schematische Darstellung einer 96-Well Platte mit Darstellung der Verdünnungsreihen der Virenausgangslösung.

In den Wells werden 911 Zellen kultiviert. Auf der rechten Seite werden zwei Reihen zur Kontrolle nicht mit Virus in Kontakt gebracht. Diese dienen zur Kontrolle. Die verwendeten 96-Well-Platten der Marke Nunclon™ stammen von der Firma Nunc™.

Die Platten wurden nun 14 Tage lang bebrütet. In regelmäßigen Abständen wurden die Wells mit offensichtlicher Virusinfektion und daraus resultierendem cytopathischem Effekt markiert. Zum Vergleich, ob es sich um CPE handelt werden die Wells mit den Kontrollen verglichen. Typische Infektionszeichen sind mehrere Zellen große Löcher in dem sonst noch intakten Zellrasen.

Die endgültige Ablesung erfolgte nach 14 Tagen, wobei auch kleine Bereiche in denen ein CPE zu finden ist als positiv gewertet wurden. Diese Bereiche finden sich typischerweise in den Wells mit hoher Verdünnung der Virenlösung. Eine schematische Darstellung eines möglichen Ergebnisses ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die Titerbestimmung wurde zu Beginn dieser Arbeit mit den Vektoren Ad-P_{-600ap}hLDLR und Ad-RSV hLDLR durchgeführt. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte die nochmalige TCID Titerbestimmung der Virenlösungen von Ad-P_{-600ap}hLDLR, Ad-RSV hLDLR und Ad-CMV EGFP. Hierbei wurden als zu infizierende Zellen 293 Zellen (Siehe Seite 32) benutzt.

Der restliche Ablauf der Titerbestimmung entsprach der oben beschriebenen Weise.

3.1.3 Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)

Um eine Zuordnung der Lipoproteinspitzen in Mäuseseren darzustellen, wurden getestete und aufgereinigte Lipoproteinfraktionen (VLDL, LDL, HDL) durch die FPLC fraktioniert, bearbeitet und in Diagrammen dargestellt.

Die FPLC wurde an einem Gerät der Firma Amersham (siehe Seite 34) durchgeführt. Als Proben wurden Mäuseseren verwendet, welche zuvor mit 14.000 rpm eine Minute lang zentrifugiert wurden. Zur Ermittlung der Daten wurden jeweils 100 µl dieses Serums für die FPLC eingesetzt. Diese Serummenge wurde in 45 Fraktionen aufgeteilt, wobei die ersten fünf Fraktionen verworfen wurden. Die Apparatur und die Trennungssäule (siehe Seite 35) wurde mit FPLC-Puffer (siehe Seite 38) gereinigt und danach befüllt. Der Spitzendruck der FPLC überschritt den Wert von 2,0 Mpa nicht.

Die aufgefangenen Fraktionen wurden auf ihren Cholesteringehalt hin untersucht. Dies geschah anhand einer Eichkurve, die aus einer Cholesterinprobe bekannter Menge (100 mg/dl) hergestellt wurde. In einer 96-Well-Platte (siehe Seite 33) wurden jeweils 100 µl der zu untersuchenden Fraktion mit 200 µl Cholesterin-Nachweisreagenz (siehe Seite 32) versetzt. Die Testung der Proben erfolgte immer in Doppelansätzen. Die Extinktion wurde in einem ELISA-Reader (siehe Seite 34) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen und anhand der Eichwerte und dem daraus resultierenden Umrechnungsfaktor in einem Diagramm eingetragen (siehe „Ergebnisse“).

3.1.4 Zellkulturen:

Die verwendeten Zelllinien wurden in einheitlicher Weise kultiviert. Zur Fütterung der Zellen wurde Kompletmedium (siehe Seite 38) eingesetzt. Die verwendeten Kulturflaschen (25, 75, 175, 300 cm²) wurden je nach weiterer Bestimmung der Zellkulturen ausgewählt. Als weitere Anzuchtbehältnisse wurden Petrischalen (6 oder 10 cm Durchmesser) oder gegebenenfalls 6- oder 12-Well Platten verwendet. Die Anzucht der Zellen erfolgte bis diese circa 80 %ige Konfluenz in dem jeweiligen Behältnis zeigten. Das Passagieren erfolgte durch Abnahme des Mediums und zweimaliges Waschen mit angewärmtem PBS. Die Ablösung der Zellen erfolgte mittels einer kleinen Menge (ca. 1,5 ml pro 75 cm²) Trypsin-EDTA (siehe Seite 39). Die Ablösung der Zellen erfolgt durch kurzzeitige Einwirkungszeit des Trypsins bei 37 °C (ca. 2 min). Nach Ablösung der Zellen (unter lichtmikroskopischer Kontrolle) wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von Kompletmedium gestoppt. Das Zählen der Zellen fand in einer Neubauererkammer nach Zugabe von Trypanblau statt. Die anschließende Aussaat wurde dann in einem Verdünnungsverhältnis nicht unter 1:8 durchgeführt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge an Kompletmedium (ca. 4 ml pro 25 cm²) wurde die neue Kultur in einem Brutschrank (bei 37°C und 5% CO₂) gelagert.

3.1.5 Western-Blot aus Zellkulturprotein

Die für den Western-Blot verwendeten Zellen wurden nach dem Protokoll für Zellkultur angezüchtet und behandelt. Die Vorbereitung erfolgte durch Abnahme des Mediums, danach zweimaliges Waschen mit PBS. Nun wurden die Zellen mit Hilfe eines "Cellscrapers" abgeschabt. Zur Aufnahme der Zellen wurde entweder PBS oder direkt Zell-Lysis-Buffer (100-200 µl pro 50 cm², siehe Seite 40) benutzt. Im Falle der Aufnahme in PBS erfolgte eine Zentrifugation mit 2000 rpm ~ 200 g bei 4°C, danach Abnahme des Überstandes und folgender Zugabe von Zell-Lysis-Puffer. Die folgende Zentrifugation bei 13000 rpm, 15 min und 4°C trennt die Zellbestandteile (im Pellet) und Proteine (in der Lösung) auf. Danach folgt eine Proteinbestimmung nach Bradford. 10 µg Protein wird mit 3µl Probenmix (siehe Seite 39) versetzt. Im Probenmix ist Mecaptoethanol enthalten womit es sich damit um reduzierende

Gele handelt. Die Probenansätze wurden mit Aqua dest. aufgefüllt, so dass gleiche Volumina aufgebracht wurden. Die Proben wurden 10 min bei 95°C im Heizblock erwärmt und nach dem Abkühlen in die vorbereiteten Geltaschen gefüllt. Die Gelvorbereitung wurde mit dem BioRad System (siehe Seite 35) durchgeführt. Das Trenngel besteht aus einem 10% SDS-Page. Die Geldicke betrug 0,75 mm. Der Polymerisationsstart erfolgte durch Zufügen von 1:200 Volumen 10% APS und 1:800 Volumen TEMED. Nach Einfüllen in das System wurde mit Hilfe einer Schicht Isopropanol eine glatte Kante gewährleistet. Nachdem das Gels ausgehärtet war, wurde die Schicht Isopropanol mittels Filterpapier entfernt, mit Sammelgel ohne Zusatz vom TEMED gewaschen und danach mit vollständigem Sammelgel (siehe Seite 39) befüllt. Hier wurde die Polymerisation durch Zugabe von 1:200 Volumen 10% APS und 1:800 Volumen TEMED gestartet. Nach Aushärten des Gels wurden die Proben eingefüllt. Als Marker wurde der Rainbowmarker (siehe Seite 33) verwendet. Nach Überführung des Gels in die Pufferkammer (Oberpuffer und Unterpuffer siehe Seite 38 + 39) wurde Dieses bei 10 mA und RT gestartet. Nach Erreichen der Trenngelinie wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht. In dieser Arbeit wurde nach LDL-Rezeptoren gesucht, die sich nach Reduzierung in etwa bei einer Größe von 160 kDa nachweisen lassen sollten. Somit wurde bis zum Erreichen der Bromphenolbande an der unteren Kante aufgetrennt.

Der Transfer der Proteine erfolgte in dem BioRad System (siehe Seite 35) mit Blotpuffer (siehe Seite 37) bei 4°C und 220 mA auf eine Nitrocellulosemembran (siehe Seite 32). Zur Überprüfung des Proteintransfers auf die Nitrocellulosemembran wurde diese kurz in Ponceau-Lösung angefärbt und die Bahnen und Markerbanden angezeichnet. Die Membran wurde danach mit Wasser wieder entfärbt. Es folgte eine mindestens einstündige Blockierung der Membran zur Saturierung der überschüssigen Proteinbindungsstellen mit Blocklösung (siehe Seite 37). Die Membran wurde danach mit Waschpuffer A (siehe Seite 39) gespült. Nun erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Huhn-Anti-LDL-Antikörper) (siehe Seite 36) über zwei Stunden in einer Lösung aus Waschpuffer A und 5% BSA. Nach Abnahme des ersten Antikörpers erfolgten Waschungen der Membran nach folgendem Schema, einmal 1 min Waschpuffer A, zweimal 20 min Waschpuffer B, einmal 1 min Waschpuffer A. Danach erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Esel-Anti-Huhn-Peroxidase) (siehe Seite 36) über 1,5 h bei RT im vorgeschriebenen Verdünnungsverhältnis. Nach der Inkubation folgt die oben beschriebene Waschprozedur (einmal 1 min Waschpuffer A, zweimal 20 min Waschpuffer B, einmal 1 min Waschpuffer A). Die Detektierung der gesuchten Bande erfolgte entweder mit Hilfe von ECL (siehe Seite 38) oder durch das ECL-Detection-reagent der Firma Amersham (siehe Seite 32). Wobei diese

nach Inkubation von einer Minute mit den genannten Reagenzien mittels Röntgenfilm und entsprechender Belichtungsdauer als geschwärzte Bande auf dem entwickelten Film sichtbar gemacht wurde.

3.1.6 Immunhistochemische Methoden

Zum einem wurden in dieser Arbeit immunhistochemische Färbungen von Kryoschnitten angefertigt. Zum anderen wurden immunzytologische Färbungen von Zellen präpariert.

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden die Kryoschnitte für 5 min angetrocknet. Danach erfolgte eine Fixierung in -20°C Methanol für 10 min. Der Waschschrift in PBS für fünf Minuten wurde fünfmalig wiederholt. Es folgte ein Waschschrift für fünf Minuten in PBS mit 0,5% Glycin. Das Blocken der Schnitte geschah mit der Blocklösung für Immunhistochemie (siehe Material und Methoden, Kapitel: Lösungen) für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer. Danach begann die Inkubation mit dem ersten Antikörper (siehe Material und Methoden, Kapitel: Lösungen) in einer Verdünnung 1:100 bei 4°C über 12 Stunden. Anschließend wurde die Schnitte zwei mal fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (siehe Material und Methoden, Kapitel: Lösungen) erfolgte über zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei RT und Dunkelheit. Dreimaliges Waschen mit PBS über jeweils fünf Minuten schloss sich an. Als nächstes folgte die Kernfärbung mit DAPI (siehe Material und Methoden, Kapitel: Lösungen) bei RT für drei Minuten. Ein abschließender Waschschrift für fünf Minuten in PBS folgte. Die fertigen Schnitte wurden mit Mowiol und 1,2-Phenylendiamin eingedeckelt. Die luftdichte Umrandung der Deckgläschen erfolgte mit handelsüblichem Nagellack.

Zur Vorbereitung der Immunzytochemie wurden Zellen auf Deckgläschen angezchtet. Die Deckgläschen wurden mit einer 4% igen Lösung von Paraformaldehyd für 30 min bei RT fixiert. Danach erfolgte ein Waschschrift für fünf Minuten in kaltem PBS sowie anschließend ein Waschschrift für fünf Minuten in PGS (PBS mit 0,5% Glycin und 0,05% Saponin). Im Anschluß folgte das Blocken für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer mit der bereits oben erwähnten Blocklösung (Siehe Material und Methoden, Kapitel: Lösungen). Nach dem Waschen für fünf Minuten in PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper im Verhältnis 1:100 über 12 Stunden bei 4°C in Blocklösung. Es folgte zweimaliges Waschen in

PBS für fünf Minuten. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte im Verhältnis 1:500 in Blockpuffer über 2 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer. Dreimaliges Waschen mit PBS über jeweils fünf Minuten schloss sich an. Als nächstes folgte die Kernfärbung mit DAPI (siehe Material und Methoden, Kapitel: Lösungen) bei RT für drei Minuten. Ein abschließender Waschriff für fünf Minuten in PBS folgte. Die fertigen Schnitte wurden mit Mowiol und 1,2-Phenylendiamin eingedeckelt. Die luftdichte Umrandung der Deckgläschen erfolgte mit handelsüblichem Nagellack.

3.1.7 Infektion von Zellen mit Adenovirus

Zur Infektion von Zellen mit Adenovirus wurden diese Zellen, wie in dem Kapitel „Zellkulturen“ beschrieben, angezüchtet. Es wurde gewartet bis die Zellkulturen eine 70% bis 80% Konfluenz zeigten. Eine unter gleichen Bedingungen angezüchtete Zellkultur wurde trypsiniert, mit Kompletmedium (siehe Seite 38) gestoppt und danach die Gesamtzellzahl unter Zugabe von Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer-Kammer ermittelt. Anhand der Gesamtzellzahl und der gewünschten MOI (Multiplicity of Infection) wurde die Anzahl der Viren ermittelt. Zur Infektion wurde ein Aliquot von Viren unmittelbar vor Infektion aufgetaut. Infiziert wurden die Zellen durch Zugabe der Viren in Kompletmedium, wobei die Menge an Kompletmedium, im Gegensatz zur Kultivierung von Zellen, auf circa 4 ml / 25 cm² reduziert wurde.

Leichtes Schwenken des Inkubationsgefäßes (Petrischalen) während der Zugabe der Viren soll diese besser in dem Medium verteilen und damit die Verteilung verbessern. Die reine Inkubationszeit der Viren ist auf vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank angesetzt, danach wird Kompletmedium bis zum Erreichen der normalen Kultivierungsmenge zugefügt. Auch hier wird weiter im Brutschrank unter den vorher genannten Bedingungen kultiviert. Die Ernte der Zellen geschieht circa zwölf Stunden später. Hier werden die Zellen entweder mit einem Zellschaber zusammen geführt und in PBS aufgenommen oder direkt mit Zell-Lysis-Puffer (siehe Seite 40) aufgenommen und den jeweils folgenden experimentellen Schritten zugeführt. Alle Schritte innerhalb dieser Arbeit, die in einem direkten Zusammenhang mit Viren stehen, wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt und die Arbeitsvorschriften und Entsorgungsvorschriften für S2 Arbeiten wurden beachtet (z.B. Entsorgung von Virenabfall, Autoklavierung von Gegenständen die mit Virus in Kontakt kamen usw.).

3.1.8 Tierexperimentelle Methoden

Die Mäuse wurden vor Experimentbeginn gewogen und eindeutig markiert, um diese identifizieren zu können. Das Körpergewicht wurde als Bemessungsgrundlage zur Vireninfection benutzt. Somit ergibt sich eine bestimmte Virendosis pro Gramm Körpergewicht der Maus. Als Berechnungsgrundlage der Virenanzahl dient der in der TCID (siehe Seite Kapitel „Titerbestimmung durch Ermittlung der TCID“) errechnete Virentiter. Vor jeglicher Behandlung der Tiere wurden diese anästhesiert mit einer Narkosemittelinjektion in den Peritonealraum, welche Ketamin und Rompun beinhaltet (Zusammensetzung siehe Seite 36). Erst nach vollständiger Wirkung der Anästhesie wurde mit weiterer Behandlung der Tiere fortgefahren. Blutproben wurden aus der Retroorbitalvene entnommen bzw. nach Sektion der Tiere direkt aus der rechten Herzkammer. Die Injektion der Viren erfolgte mit einer feinen Kanüle und einer Insulinspritze in die Schwanzvene der Mäuse. Den Mäusen wurde prä injektionem venöses Blut abgenommen und nach fünf Tagen post injektionem. Dieses Blut wurde kurz nach Abnahme mit 1500 rpm bei RT zentrifugiert und das daraus entstehende Serum wurde bei -20°C gelagert. Es erfolgte nach Abnahme des Blutes aus der rechten Herzkammer eine Perfusion der Organe mit PBS (ca. 20 ml), so dass die Leber eine helle Farbe annahm. Diese wurde in drei Lappen geteilt, in Tissue Tag eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Herz, Nieren, Hode und Milz wurden frei präpariert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Mäuseserum wurde der FPLC zugeführt und die in Tissue Tag eingefrorenen Leberstücke wurden mit dem Mikrotom 4-5 µm dick geschnitten und der immunhistologischen Aufbereitung zugeführt.

3.1.9 DNA Präparation

Für die Aufbereitung von DNA aus Zellen wurde das „NucleoSpin[®] Tissue“ Kit von Marchery & Nagel verwendet. Nachfolgende Chemikalien wurden mit dem Kit mitgeliefert. Basierend auf der Aufnahme eines Zellpellets in 180 µl Zell-Lysis-Puffer und einen Proteinase K Verdau (25 µl) bei 56°C für 15 min, folgten die in der Anleitung für „Support protocol for cultured animal or human cells“ weiteren Schritte. Die verwendeten Puffer und

Lösungsbezeichnungen beziehen sich auf die im Kit verwendeten Namen. Diese bestanden aus Hinzufügen von 200 µl Puffer B und 210 µl Ethanol abs. und anschließendem Vortexen. Danach wurden die Proben in NucleoSpin Tissue Säulen überführt und bei 6000 g bis zum völligen Durchtritt der flüssigen Phase zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgte das Hinzufügen von 500 µl BW Lösung und eine Zentrifugation für eine Minute bei max. Geschwindigkeit (circa 14000 g). Der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurden 600 µl B5 Lösung hinzugefügt und auch hier bei max. Geschwindigkeit eine Minute zentrifugiert. Ein nochmaliges Nachzentrifugieren sollte die Membran in den Säulen von der Ethanol enthaltenen Waschlösung trocknen. Die Säulen wurden in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Auf die Säulen wurde dann 100 µl einer vorgewärmten Elutions Puffers Lösung aufgebracht. Nach einer Minute Einwirkzeit wurden die Reaktionsgefäße bei max. Geschwindigkeit (circa 14000 g) für eine Minute bei RT zentrifugiert. Der DNA enthaltene Durchfluß wurde bei einer OD₂₆₀ in Photometer Eppendorf gemessen.

Nach Präparation mit dem Marchery & Nagel Kit erfolgte eine DNA-Messung durch ein Photometer der Firma Eppendorf (siehe Seite 34), bei einer OD₂₆₀ in einer Verdünnung von 2µl DNA Probe zu 198 µl Aqua dest. und dem Geräte internen Umrechnungsfaktor wurden die ermittelten Werte in µg/µl ausgegeben.

Im Verlaufe der Arbeit wurde zur Überprüfung der Effektivität der Säulenaufreinigung mittels Marchery & Nagel Kit ein Vergleich mit herkömmlicher Phenol / Chloroform Extraktion statt. Verwendet wurden HUH 7 Zellen in 6 cm Petrischalen. Hier wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Zellen, die für die DNA Präparation mit dem Marchery & Nagel Kit vorgesehen waren, gelangten nach dieser Vorbehandlung in die oben beschriebene weitere Präparation laut Protokoll „Support protocol for cultured animal or human cells“, das dem Kit beiliegt. Die zum Vergleich herangezogenen Zellen wurden folgendermaßen behandelt. Ein weiterer Waschschrift mit TE-Puffer (siehe Seite 39). Danach wurden die Zellen in 500µl Hirt-Lysis-Puffer (siehe Seite 39) und 20 µg/ml RNase aufgenommen. Dies wurde 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen in ein 2-ml-Reaktionsgefäß für Mikrozentrifugen überführt. Die in den Petrischalen verbliebenen Zellen wurden mit weiteren 200 µl Hirt-Lysis-Puffer aufgenommen. Der Verdau mit 10 µl Proteinkinase (Konzentration: 20 µg/ml) fand über 1 h bei 55°C statt. Danach folgt die eigentliche DNA Extraktion. Den Proben wurde 600 µl Phenol hinzugefügt und die wässrige Phase wurde mit einer Pipette abgezogen. Darauf folgend wurde ein Gemisch aus 500 µl Phenol /Chloroform hinzugefügt. Auch hier folgte das

Abnehmen der wässrigen Phase. Ein dritter Waschritt erfolgte mit 700 µl Phenol und anschließenden Abnehmen der wässrigen Phase. Nach diesen Waschritten erfolgte das Aussalzen der DNA durch Hinzufügen einer Lösung aus 80 µl Ammoniumsulfat und 800 µl Isopropanol. Dann wurde das Reaktionsgefäß bei 1400 rpm bei 4°C für 20 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml 70% igen Alkohol gewaschen und danach an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 100 µl TE-Puffer (siehe Material und Methoden, Kapitel: Lösungen) aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde bei einer OD₂₆₀ im Photometer Eppendorf ermittelt.

3.1.10 Real-Time PCR

Prinzip:

In dieser Arbeit kamen zwei Real-Time PCR Geräte zum Einsatz. Anfängliche Experimente wurden an einen Abiprism 7000[®] (siehe Seite 34) durchgeführt. Weiterführende Experimente, sowie Gegentestungen zur Vergleichbarkeit beider Geräte wurde an einer Stratagene MX 4000[®] (siehe Seite 34) durchgeführt.

Das Prinzip der Real-Time PCR besteht darin, dass sequenzspezifische Primer und Sonden an die gewünschten DNA Stränge binden. Die Sonden besitzen bei der TaqMan[®] Version der Real-Time PCR einen Reporter und einen Quencher, wobei der Quencher den Reporter im Ruhezustand so beeinflusst, dass dieser keine Fluoreszenz abstrahlt. Dies geschieht durch die Suppression der Fluoreszenz basierend auf dem Förster Typ des Energie Transfers (Förster 1948; Lakowicz 1983).

Die Sonde und die Primer binden nun während der Annealingphase an ihre komplementäre DNA Sequenz des gesuchten Amplicons. Wenn nun die Primer die Synthese des Zweitstranges beginnen, gelangt die hitzestabile Taq-Polymerase an die Sonde und kann durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Sonde hydrolytisch spalten, wobei sich der Reporter und der Quencher voneinander trennen. An dieser Stelle beginnt der Reporter, da er sich nicht mehr in direkter Nachbarschaft des Quenchers befindet, seine Fluoreszenz zu emittieren. Dieses Fluorophor sendet Licht einer ganz bestimmten Wellenlänge aus, welches durch verschiedene Filtersysteme und Messverfahren aufgenommen werden kann. Der wichtigste Zusammenhang besteht darin, das die emittierte Intensität der Fluoreszenz direkt proportional

zur der Anzahl neu gebildeter DNA-Stränge ist, wodurch eine Quantifizierbarkeit der eingesetzten Produkte möglich wird.

Durch die Zunahme der Fluoreszenz entstehen typische Kurvenverläufe mit einer Anstiegsphase und einer Plateauphase. Gemessen wird die Stärke der Fluoreszenz des Reporters, wobei als Referenz ein weiteres Fluorophor benutzt wird, welches normalerweise keine weiteren Reaktionen eingeht. Es kommt in der Anfangsphase der Real-Time PCR zu kaum einem Anstieg der Fluoreszenz, so dass hier von einer Base Line gesprochen wird. Die Anstiegsphase setzt als Nächstes ein und in dieser sollte möglichst auch die Grenzlinie (Threshold) gelegt werden, damit die Werte an denen die Kurve die Grenzlinie schneidet auch eindeutig mit einem Wert belegt werden kann und damit die Vergleichbarkeit verschiedener Kurven gewährleistet ist. Der beschriebene Schnittpunkt ist der so genannte C_T -Wert (Threshold cycle) und ein Maß ab welchen Zyklus man von einem detektierten Wert ausgehen kann (siehe Abbildung 5). Die Grenzlinie bleibt somit in der Vergleichbarkeit verschiedener Kurven der gleichen PCR fester Wert, mit dem die verschiedenen Proben miteinander verglichen werden können.

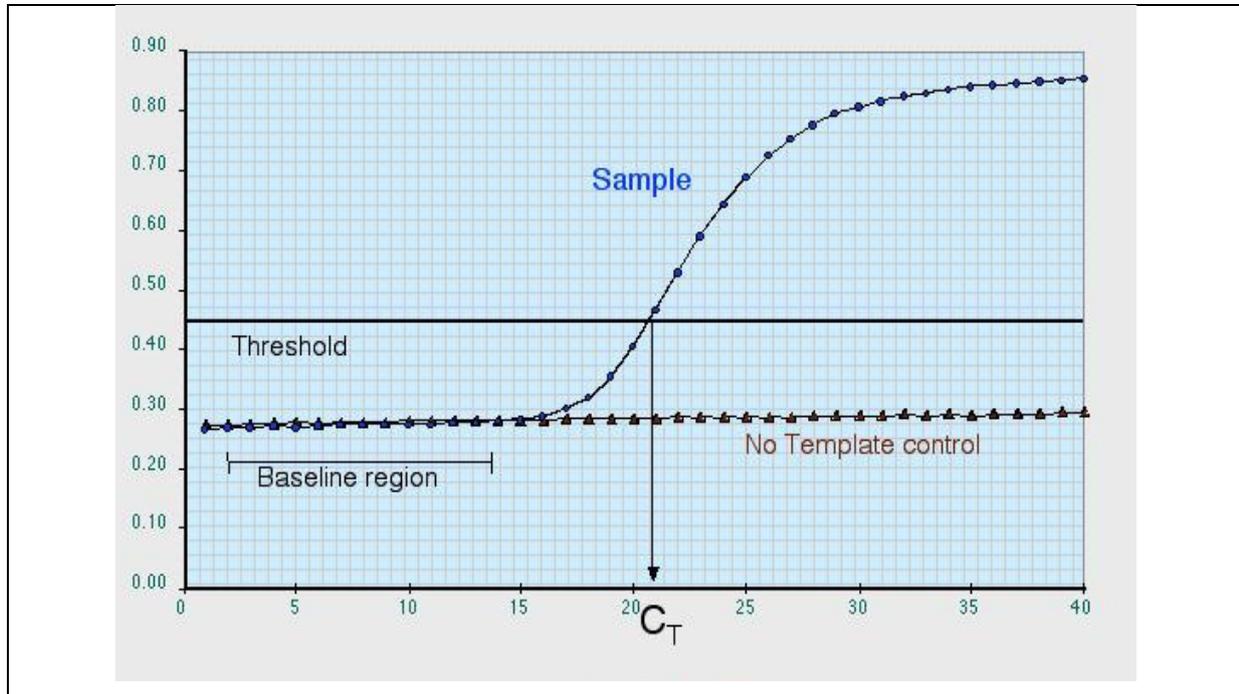


Abbildung 5 Schematische Darstellung eines Real-Time PCR Kurvenverlaufs.

Dargestellt sind der Kurvenverlauf einer Probe bzw. dessen gemessener Anstieg der Fluoreszenz, sowie einer Kontrolle. Die Probenkurve schneidet den Threshold bei Zyklus 21. Die Kontrolle zeigt keine Fluoreszenzverstärkung.

Primer und Probes:

Es fand eine Vorüberlegung statt, welche Sequenzen es innerhalb dieser Arbeit nachzuweisen galt. Als erstes sollte eine eindeutige Identifizierung der viralen DNA möglich sein. Somit wurde ein Primer gewählt, dessen Sequenzen nur im viralen Genom anzutreffen sind. Ein Sequenzvergleich mit Hilfe des „BLAST“ Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) der NCBI (National Center for Biotechnology Information) zeigte keine Übereinstimmungen mit DNA Sequenzen aus dem humanen Genom.

Die Sonde liegt im adenoviralen Hexon-Gen. Das TaqMan[®]-System für das virale Genom erhält somit den Arbeitsnamen „Hexon“, so dass im weiteren Verlauf von Hexon-Sonde als Sonde, Hexon-F als Forwardprimer und Hexon-R als Reverseprimer die Rede sein wird. Die Hexon-Sonde ist mit FAM[™] als Fluorophor gelabelt. Dieses Primer-Probe-System wurde von der Firma Applied Biosystems synthetisiert und geliefert. Die Sequenzen sehen wie folgt aus:

Hexon-Sonde (in 5' → 3'): ACCTTGGAGCACGCTGGTCCCTTG

Hexon-F (in 5' → 3'): CCCGGGTTAGTGGACTGCTA

Hexon-R (in 5' → 3'): AGCATTGCGGTGGTGGTTAA

Annealingtemperatur: 60°C

Als System zur indirekten Überprüfung der eingesetzten Zellzahl, bot sich der Nachweis von Telomerase codierenden Sequenzen an, da diese in der DNA der eingesetzten Zellen auch nach der Aufreinigung zu finden ist im Gegensatz zur viralen DNA, der diese Informationen fehlen. Bei gleichzeitigem Ansatz einer Standardreihe ermöglicht es so eine Aussage über die eingesetzte Zellzahl in Bezug auf die nachgewiesene virale DNA. Telomerase ist in allen Säugetierzellen vorhanden, so dass mit Einsatz dieses Systems eine gewisse Unabhängigkeit gegenüber verschiedenen eingesetzten Zellen in Experimenten gewährleistet würde. Allerdings kamen bei den Experimenten dieser Arbeit lediglich HUH 7 Zellen zum Einsatz, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Als Arbeitsname wird im folgendem „TERT“ benutzt. Die TERT-Sonde ist mit dem Fluorophor TET[™] markiert.

TERT-F bezeichnet den Forwardprimer und TERT-R den Reverseprimer. Dieses Primer-Probe-System wurde von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert und geliefert. Die Sequenzen sehen wie folgt aus:

TERT-Sonde (in 5' → 3'): TCAGGACGTCGAGTGGACACGGTG

TERT-F (in 5' → 3'): CGCTTCCTCAGGAACACCAA

TERT-R (in 5' → 3'): CATATCTAAAGATGGGACCAGG

Die so genannten Mastermixe enthalten alle nötigen weiteren Bestandteile zum Starten und Aufrechterhalten der PCR Reaktion. So ist das von Applied Biosystems gelieferte Mastermix mit folgenden Komponenten bereits gebrauchsfertig ausgestattet: AmpliTaq Gold[®] Polymerase, AmpErase[®] UNG (Uracil-N-Glycosylase), dNTPs, dUTPs, Magnesiumchlorid, Puffer Komponenten und das Fluorophor ROX[™] als Passivreferenz. Bei den Assays, die an der Stratagene MX 4000 liefen wurde der Mastermix von selbiger Firma verwendet. Außer dass ROX[™] als Passivreferenz gesondert hinzu pipettiert werden musste, unterschied sich dieses Mix aber in der Zusammensetzung nicht von dem vorher verwendeten Mastermix.

Die Verbrauchsmaterialien wie zum Beispiel PCR-Gefäße und Deckel wurden jeweils vom entsprechenden Hersteller bezogen und mit der zugehörigen Maschine verwendet.

Die Endkonzentration der Primer betrug 300 nM und der Sonden 200 nM.

Die im Assay verwendeten Proben wurden immer in Triplets pipettiert und gemessen. Für jede Probe wurde ein Pipettenspitze gewechselt, so dass keine Eigen- (innerhalb der Triplets) oder Fremdkontamination (zwischen verschiedenen Proben) stattfinden konnte.

3.1.11 Zellkern Präparation

Die Präparation von Zellkernen geschah aus Huh 7 Zellen. Diese wurden nach den oben genannten Methoden (siehe Kapitel Zellkulturen) in 10 cm Petrischalen kultiviert. Zum Ernten der Zellen wurde diese zweimal mit PBS gewaschen und danach mit einer kleinen Menge (ca. 1,5 ml pro 75 cm²) Trypsin-EDTA (siehe Seite 39) von den Zellkulturschalen gelöst. Nach kurzer Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die abgelösten Zellen mit 4

ml Komplettmedium (siehe Seite 38) aufgenommen und somit die Wirkung des Trypsin-EDTA gestoppt. Ab diesem Schritt folgen alle weiteren auf Eis (bei 4°C) mit vorgekühlten Lösungen. Die Aufgenommenen Zellen werden in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden ad 15 ml mit PBS befüllt. Diesem Waschschrift folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 300 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurde wiederum in 15 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine nochmalige Zentrifugation von 5 min bei 300 g und 4°C. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml NP-40 Puffer (siehe Seite 38) resuspendiert. Nun folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 1500 g bei 4°C. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der vorige Schritt nochmals wiederholt. Das nun entstandene Pellet wurde in 2 ml CaCl₂ Puffer (Siehe Seite 37) resuspendiert. Auch hier folgte eine Zentrifugation über 10 min mit 1500 g bei 4°C. Nach Verwerfen des Überstandes folgte der letztgenannte Waschschrift in 2 ml CaCl₂ mit nachfolgender Zentrifugation über 10 min bei 1500 g und 4°C noch einmal. Das nach dem letzten Waschschrift entstandene Pellet, wurde in 180 µl Lysis-Puffer des Marchery & Nagel DNA Purification Kits (siehe Seite 32), aufgenommen und der DNA Aufreinigung, wie im Kapitel „DNA Präparation“ beschrieben, zugeführt.

3.1.12 Dynamic Light Scattering

Nach Eichen des Gerätes mit einer Flüssigkeit die genau definierte Moleküle bestimmter Größe enthält wurden nicht markierte und danach mit Cy3TM markierte Viren in dem Laser-Spectroscatter 201 gemessen.

Die Größe der gemessenen markierten Viren gibt Aufschluss, ob bei dem markieren mit dem Flourophor Cy3TM wirklich einzelne Viren markiert wurden. Das Prinzip des Dynamic Light Scattering beruht auf der Streuung von monochromatischem Licht (z.B. Laser), das durch eine colloidale Lösung fällt dessen Partikel das Licht in alle Richtungen streut. Kleine Partikel (in Vergleich zur Wellenlänge) streuen das Licht gleichmäßig, während große Partikel das Licht winkelabhängig streuen. Mit einem entsprechenden Detektor sind diese zeitabhängigen Fluktuationen des Lichts messbar. Bei bekannter Viskosität der Messlösung kann unter Berücksichtigung der Stokes Einstein Gleichung der Hydrodynamische Durchmesser der gesuchten Partikel errechnet werden. In dem oben beschriebenen Experiment ist dies also der Durchmesser des nicht markierten und des markierten Virus.

3.2 Material:

3.2.1 Virenkonstrukte:

Die Virenkonstrukte sind in der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Frank Schnieders im Vorfeld hergestellt worden. Es handelt sich um Adenoviren der ersten Generation. Hierbei ist gemäß der Abbildung 6 die Kassette entgegengesetzt zum Adenovirusgenom in die E1-Region des Virus eingesetzt.

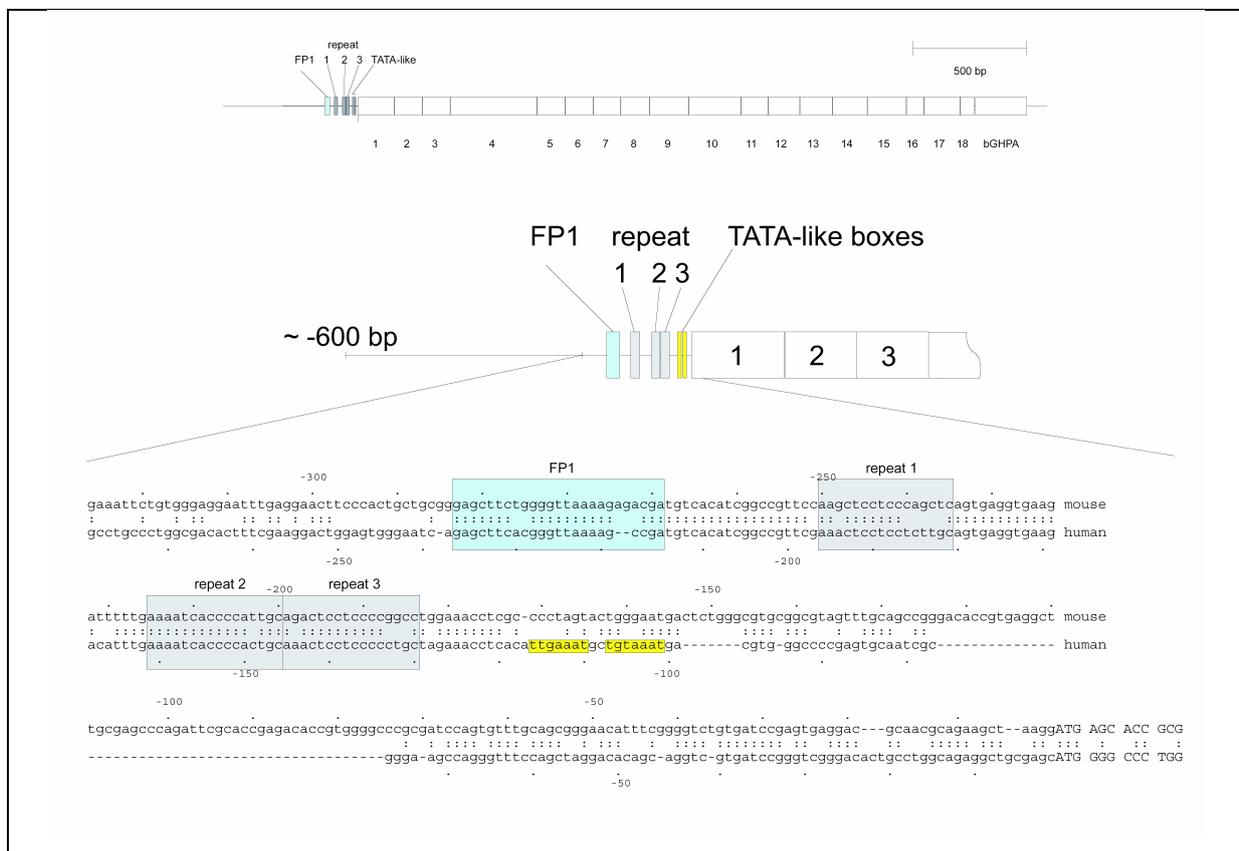


Abbildung 6 Darstellung des Adenovirusgenoms mit für den Gentransfer wichtigen Regionen.

Oben: Schematische Darstellung des Virusgenoms mit Angabe der Legende in bp.

Mitte: Darstellung der ersten Early repeat Regionen des Adenovirus (E1-Region).

Unten: E1-Region mit eingesetzter Kassette des codierenden Abschnitts für den LDLR (entgegengesetzt dem Virusgenom, um später bei der Transkription einen funktionstüchtigen LDLR zu erhalten).

3.2.2 Zelllinien:

293 Zellen: Humane embryonale Nierenepithelienzelllinie mit stabil transfizierter adenoviraler E1-Genregion

911 Zellen: Humane Retinoblastomzellen

Huh 7 Zellen: Humane Hepatomazellen

MEF 1 Zellen: Murine Embryonic Fibroblasts (Wildtyp)

MEF 4 Zellen: Murine Embryonic Fibroblasts (LDL-Rezeptor und LRP knock out)

3.2.3 Verbrauchsmaterialien:

Cholesterin Reagenz: Chol R1 Roche/Hitachi
Roche Diagnostics GmbH

ECL Detection Reagent: Amersham Biosciences
Detection Reagent 1 und 2
RPN 2106 D1
RPN 2106 D2

DNA-Purification Kit: NucleoSpin[®] Tissue
Marcherey & Nagel
Cat.No. 740 952.50

NAP[™]-25 Säule: NAP[™]-25-Column der Firma Pharmacia Biotech mit
Sephadex[®] G-25

Nitrocellulosemembran: Protran[®] (Order No. 1040 1196)
Schleicher & Schuell
Poren Größe 0,45 µm

Mikrofilter:	Zum Sterilfiltrieren von Lösungen wurden entweder Mikrofilter der Marke Schleicher & Schuell mit einer Porengröße von 0,2 µm benutzt, oder falls es sich um größere Volumina handelte, wurde das Vakuum Filtersystem der Firma Nalgene® für 500 ml benutzt.
Rainbowmarker:	RPN 800 Rainbow™ coloured protein molecular weight markers Amersham pharmacia biotech®
Tissue-Tek®	Tissue-Tek® O.C.T.™ compound Firma Sekura
Ultrazentrifugenröhrchen:	Ultracentrifuge Tubes 1X3 ^{1/3} inch (for SW41 Rotor) Beckmann
Well-Platten:	Es wurden 6-Well, 12-Well und 96-Well-Platten der Marke Nunclon™ von der Firma Nunc™.
Zellkulturflaschen:	Verwendet wurden Zellkulturflaschen in den Größen: 25, 75, 175 und 300 cm ² . Die Hersteller sind TPP® für die 25 cm ² und 300 cm ² , Nunc® für die 75 cm ² und Falcon® für die 125 cm ² Zellkulturflaschen.
Zentrifugenröhrchen:	Es wurden 50 ml Tubes der Firma Falcon® Typenbezeichnung Blue Max™ verwendet. Ferner wurden 15 ml Tubes der Firma Nunc® verwendet.

3.2.4 Geräte:

Dynamic Light Scattering:	Laser-Spectroscatter 201 RiNA GmbH Netzwerk RNA-Technologien
ELISA-Reader:	MRX Microplate reader Dynatech Laboratories™
FPLC-Gerät:	FPLC-System der Firma Amersham pharmacia biotech™ Bestehend aus: Pumpe: LKB-Pump P-500 Controller: LCC-contr-500 Plus Fraktionierer: FRAC-100
Mikroskope:	Zeiss® Axio Vert® mit der Software AxioVision Viewer® in der Version 3.0 Konfokales Mikroskop der Firma Zeiss® mit der Typenbezeichnung LSM 510 und der Software Zeiss LSM Image Browser® Version 3.1.0.99
Mikrotom:	Microm HM560
Photometer:	Eppendorf BioPhotometer (Version 1.32)
Real-Time PCR Geräte:	Die ersten Real-Time PCR Versuchsreihen wurden mit einem Gerät der Firma Applied Biosystems® mit der Typbezeichnung Abiprism 7000™ durchgeführt. Nachfolgende Untersuchungen wurden auf einem Gerät der Firma Stratagene® mit der Typbezeichnung MX 4000™ durchgeführt. Beide Geräte wurden mit den passenden Verbrauchsmaterialien (z.B. Reaktionsgefäße, Deckel, usw.) der jeweiligen Firmen betrieben.

SDS-Gele

Bio Rad Gelsystem: Mini Protean 3 von BioRad

Trennsäule (FPLC):

Superose™ 6

Von Amersham pharmacia biotech

Code nr. 17-0537-01

Id No. 9903130

Zentrifugen:

- Tischzentrifuge der Firma Sigma® mit der Typbezeichnung 1-15 K.
- Standzentrifuge der Firma Sigma® mit der Typ 6 K 15.
- Ultrazentrifuge der Firma Beckmann mit der Typenbezeichnung L7-55 Ultracentrifuge mit verschiedenen Rotoren z.B. SW 41 Rotor.

3.2.5 Lösungen:

Adeno storage buffer:

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
135 mM	NaCl
3 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
50 ml	Glycerin
ad 500 ml	Aqua dest.

⇒ steril filtrieren

Antikörper für Immunhistologie:

1. Antikörper: Mab to human LDL-R
Chicken polyclonal (IgY)
Gegen extrazelluläre Domäne I,II und III
des humanen LDL-Rezeptors
Progen Biotechnik GmbH
Verdünnung 1:100
2. Antikörper: Donkey-Anti-Chicken-Cy3TM
1:500 in Blocklösung (siehe unten)

Antikörper für Western-Blot:

1. Antikörper: Mab to human LDL-R
Chicken polyclonal (IgY)
Gegen extrazelluläre Domäne I,II und III
des humanen LDL-Rezeptors
Progen Biotechnik GmbH
Verdünnung 1:100
2. Antikörper: Donkey Anti-Chicken IgG
DACPO
(CyTM2-Konjugiertes-Fab₂-Fragment
Jackson ImmunoResearch Laboratories
inc.
Verdünnung: 1:5000

Blocklösung Immunhistochemie:	5%	Ziegenerum
	5%	Eselserum
	1%	BSA
	in PBS / 0,5% Glycin (bei Immunzytochemie in PGS)	
Blocklösung Western-Blot:	10%	entfettetes Milchpulver
	5%	BSA
	in Aqua dest.	
Blot-Puffer:	12.1 g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
	56.2 g	Glycin
	ad 5 L	Aqua dest.
CaCl ₂ Puffer:	100 ml	Chelsky Puffer (siehe: Chelsky Puffer)
	1 mM	Calcium Chlorid
Chelsky Puffer:	0,01 M	Tris-HCl
	0,01 M	NaCl
	0,003 M	MgCl ₂
	0,03 M	Sucrose
	pH 7,0	
CsCl-Gradient:	Obere Schicht	(Dichte = 1,2411 g/cm ³)
	=>	32,27 g CsCl Aqua dest. ad 100 ml
	Mittlere Schicht:	(Dichte = 1,3393 g/cm ³)
	=>	45,54 g CsCl Aqua dest. ad 100 ml
	Untere Schicht:	(Dichte = 1,4525 g/cm ³)
	⇒	61,00 g CsCl Aqua dest. ad 100 ml
DAPI	5 µl 4'-6-Diamidino-2-phenylindole in 100 ml PBS	

ECL Lösung:	10 ml	Trispuffer pH 8,5
	25 µl	Cumarinsäure
	50 µl	Luminol
	3 µl	Wasserstoffperoxid (als Startreagenz)
FPLC-Puffer:	0,1%	Natriumacid
	10 mM	Tris
	100 mM	NaCl
	10 mM	EDTA
	=> steril filtrieren und 1:10 verdünnen	
Hirt-Lysis-Puffer:	0,6% SDS	
	10 mM EDTA	
	10 mM Tris/HCl	
Komplettmedium:	Dulbecco's MEM with Glutamax-1, Gibco, 31966-021	
	10% Foetal Bovine Serum (FBS), Gibco, 10106-169	
	1% Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml), Gibco 15140-122	
Narkosemittel für Mäuse:	Ketamin mit PBS auf 10 mg/ml verdünnt	
	Rompun mit PBS auf 4 mg/ml verdünnt	
	Im Mischungsverhältnis 1:1	
	circa 300 µl pro Maus (3 mg Ketamin / 1,2 mg Rompun)	
NP-40 Puffer:	100 ml	Chelsky Puffer (siehe Chelsky Puffer)
	500 µl	NP-40 Detergens
Oberpuffer für SDS-Gele:	24,8 g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
	12,4 g	Borsäure
	ad 5 L	Aqua dest.
PBS:	PBS Dulbecco's, Gibco, 14190-094	
PGS	PBS mit 0,5% Glycin und 0,05% Saponin	

Probenmix:	SDS (Natriumdodecylsulfat) Bromphenolblau Mercaptoethanol (im Verhältnis 2:1:1)
Sammelgel für Western-Blot:	3% Acrylamid 40 mM TRIS/HCl, pH 6.14
TE-Puffer:	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8 ad Aqua dest.
Trenngel für Western-Blot:	10% Acrylamid 40 mM TRIS/HCl, pH 6.14
Trypsin-EDTA:	Trypsin-EDTA (1X) in HBSS W/O CA&MG W/EDTA.4NA Gibco™ Cat. No. 3073478
Unterpuffer für SDS-Gele:	258,5 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) ad 5 L Aqua dest., pH 9.5 mit HCl
Waschpuffer A: (TRIS)	12,1 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 45 g Natriumchlorid 5 g Tween 20 ad 5 L Aqua dest., pH 7.4 mit HCl
Waschpuffer B: (TRIS)	12,1 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 5 g Natriumchlorid 12,5 g Natriumdesoxycholat 5 g Tween 20 5 g Natriumdodecylsulfat (SDS) ad 5 L Aqua dest. , pH 7.4 mit HCl

Zell-Lysis-Puffer:	5 ml	1 M Tris/HCL pH 8,0
	2 ml	0,1 M Calciumchlorid
	0,47 g	Natriumchlorid
	1 ml	Triton X-100
	ad. 100 ml	Aqua dest.

4. Ergebnisse

4.1. Titerbestimmung der Viren mit Funktionalitätsnachweis

Als Erstes wurden größere Mengen der Viren Ad-P_{600ap}hLDLR und Ad-RSV hLDLR angezüchtet. Dies geschah wie unter 3. Material und Methoden „Herstellung der Virenstocks von Viren Ad-P_{600ap}hLDLR und Ad-RSV hLDLR“ beschrieben wurde. Die produzierten Viren sollten einer Quantifikation unterzogen werden. Dies geschah durch die Methode der TCID (siehe „Material und Methoden“). Im ersten Falle der Titerbestimmung wurde mit 911 Zellen gearbeitet. Nach 14 Tagen, am Ende der Ablesezeit der TCID Titerbestimmung ergaben sich nach Auszählen der 96-Well Platten folgende Ergebnisse:

$$\text{Ad-P}_{600\text{ap}}\text{hLDLR: } 1,585 \cdot 10^{12} \text{ Viren /ml} \quad = 1,585 \cdot 10^9 \text{ Viren /}\mu\text{l}$$

$$\text{Ad-RSV hLDLR: } 3,162 \cdot 10^{11} \text{ Viren /ml} \quad = 3,162 \cdot 10^8 \text{ Viren /}\mu\text{l}$$

Ferner wurde in folgenden Experimenten der Kontrollvektor Ad-CMV EGFP eingesetzt, welcher das Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (green fluorescence protein = GFP) trägt. Dieser Vektor war zu Beginn der Arbeit bereits präpariert und lag in einer Konzentration von

$$\text{Ad-CMV EGFP: } 6,5 \cdot 10^{10} \text{ Viren /ml} \quad = 6,5 \cdot 10^7 \text{ Viren /}\mu\text{l} \quad \text{vor.}$$

Diese gemessenen Konzentrationen sind die Ausgangswerte und Bezugsgrößen für alle weiteren experimentellen Schritte. Wenn es im weiteren Verlauf der Arbeit um Infektionsmengen mit Angabe einer Virenmenge bzw. einer MOI geht, sind die oben genannten Konzentrationen Ausgangsbasis zur Berechnung dieser, sofern nicht ausdrücklich auf einen anderen Bezugswert aufmerksam gemacht wird.

4.2 Testung der Funktionalität von Ad-P_{-600ap}hLDLR in Zellkultur

4.2.1 Suppression des -600ap-Promoters durch 25-Hydroxycholesterin

Es wurde die Funktionalität des Inserts im adenoviralen Vektor und damit die Expression der LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Huh 7 Zellen bzw. deren cholesterinregulierte Expression durch den eingesetzten humanen Promoter P_{-600ap} getestet. Um eine Regulation im Chromosom des Zielorgans nachzustellen, wurde das Experiment in einer dem Zielorgan verwandten Huh7-Zellkultur durchgeführt. Als Vergleichsvektor wurde Ad-RSV hLDLR benutzt. Dieser Vektor besitzt einen viralen Promoter aus dem Rous Sarcoma Virus. Der Promoter besitzt keine Möglichkeit innerhalb des Systems negativ reguliert zu werden. Die Folge ist eine Cholesterin-unabhängige Expression des LDL-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Mittels dieses Vektors war ein Vergleich zwischen regulierter und unregulierter Expression des LDL-Rezeptors möglich. Als Negativkontrolle dienten Huh 7 Zellen, die unter gleichen Bedingungen mit Ad-CMV EGFP infiziert wurden, und so das Grün fluoreszierende Protein produzierten, so dass nur die zelleigene Regulation des LDL-Rezeptors nachweisbar blieb. Das Infektionsverhältnis entsprach bei allen eingesetzten Zellkulturen einer MOI von 200 und die Infektionszeit betrug 4 Stunden. Die Fütterung mit LPDS sollte die Zellen, durch das Fehlen von externen Lipoproteinen anregen, auf ihrer Zelloberfläche möglichst viele LDL-Rezeptoren zu präsentieren und somit vergleichbare Werte zu erhalten. Zelleigene maximale Hochregulation der LDL-Rezeptorproduktion und nach viraler Infektion durch die additive Translation der LDL-Rezeptoren der viralen DNA wurden miteinander verglichen. Um nun beurteilen zu können, in welchem Maß der humane Promoter P_{-600ap} in der Lage ist, auf äußere Einflüsse zu reagieren, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Huh 7 Zellen wurden kultiviert (siehe Kapitel Zellkultur) und zu gleichen Teilen ausgesät. Nach der Infektionsphase von vier Stunden erfolgte danach eine 24 stündige Inkubation mit LPDS. Danach wurde die eine Hälfte der infizierten Zellkulturen weiterhin konsequent mit LPDS gefüttert, die andere Hälfte wurde zusätzlich mit einem Gemisch aus Cholesterin (10 µg pro ml eingesetztem Medium) und 25-Hydroxy-cholesterin (1 µg pro ml eingesetztem Medium) gefüttert. Diese Mischung wurde in Ethanol aufgelöst und den Zellen zugeführt (circa 6 µl EtOH auf 3 ml Medium). Die Vergleichsgruppe ohne Zugabe von Cholesterin und 25-

Hydroxy-cholesterin erhielt ebenso die entsprechende Menge an Ethanol und wurde auch sonst gleich behandelt.

Vierundzwanzig Stunden nach Fütterung der Zellen wurden diese geerntet und die Proteine zum Western-Blot aufgereinigt (siehe Material und Methoden „Western-Blot aus Zellkulturprotein“). Es wurden 10 µg Gesamtprotein auf das SDS Gel aufgetragen. Der Western-Blot ergab folgendes Bild:

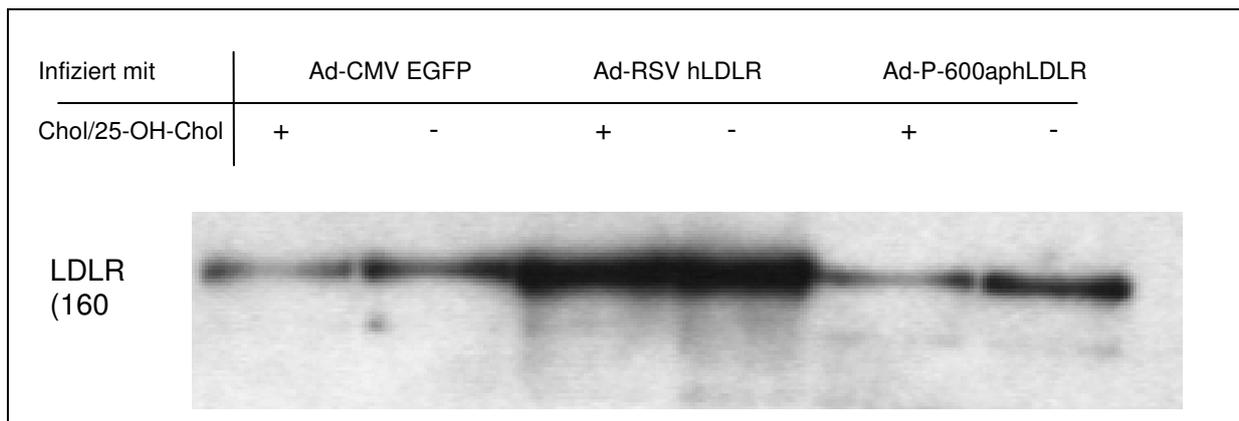


Abbildung 7 Western Blot der LDLR im Fütterungsexperiment.

Dargestellt sind die Banden der LDLR-Rezeptoren mit den verschiedenen Vektoren (Promotoren) infiziert, sowie mit Fütterung (+) und Ohne Fütterung (-) mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin. Der nicht LDLR wirksame Vektor GFP dient als Kontrolle. Deutliche Cholesterinunabhängige Herraufregulation der LDLR unter RSV-Promoter. Deutliche Herunterregulation unter humanen Promoter P_{-600ap}, allerdings keine deutliche Änderung gegenüber dem Kontrollvektor.

Methode: LDLR bei 160 kDa, Infizierte Huh7 Zellen, Vektoren: Ad-CMV EGFP, Ad-P_{-600ap}hLDLR, Ad-RSV hLDLR, jeweils MOI 200, Infektionszeit 4 h, Western-Blot: 1. Antikörper: Mab to human LDLR, 2. Antikörper: Donkey Anti-Chicken IgG.

Die Banden liegen laut Marker bei 160 kDa, was der Größe des reduzierten LDL-Rezeptors entspricht. Die obere Beschreibung zeigt den Vektor mit dem die Zellen infiziert wurden, wobei jeweils „+“ das mit Cholesterin gefütterte Zellprotein repräsentiert und „-“ das Zellprotein ohne Cholesterinzugabe. Ad-CMV EGFP zeigt im Vergleich zu Ad-RSV hLDLR eine geringere Signalstärke, was für eine Herunterregulation der LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche spricht. Dies entspricht dem erwarteten Bild einer normoregulativen Situation unter der überschüssigen Gabe von Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin. Ad-CMV EGFP ohne Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin zeigt die maximale LDL-Rezeptor-Expression unter LPDS von Huh 7 Zellen, die mit Ad-CMV EGFP infiziert sind, dieser hat allerdings keinen Einfluss auf die zelleigene Expression von LDL-Rezeptoren und somit zeigt sich nur der endogene Rezeptor der Zelllinie. Die folgenden Banden zeigen die durch den RSV-

Promoter kontrollierte Expression und ergeben kaum einen Unterschied zueinander, so dass hier von einer Entkoppelung der LDL-Rezeptoren-Produktion von dem die Zellen umgebenden Medium angenommen werden kann. Unter Zugabe von Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin findet keine Herunterregulation der LDL-Rezeptoren statt. Der verwendete Promoter scheint somit nach Infektion kontinuierlich zu arbeiten. Die letzten beiden Banden zeigen Ad-P_{-600ap}hLDLR als eingesetzten Vektor. Beim direkten Vergleich beider Banden zwischen nicht gefütterten und mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin gefütterten Zellen, zeigt sich, dass eine Herunterregulation des LDL-Rezeptors unter Fütterung zu erkennen ist. Allerdings fehlt eine deutliche Herraufregulation der Expression des LDL-Rezeptors unter LPDS. Der Vergleich zu den mit Ad-CMV EGFP infizierten Zellen, macht deutlich, dass die Signale nicht wesentlich über denen der normalen Expression der Huh 7 Zellen ohne LDL-Rezeptor kodierenden Vektoren liegt.

4.2.2 Immunzytologische Darstellung der Suppression des -600ap-Promoters

Das oben beschriebene Fütterungsexperiment wurde auch immunzytochemisch untersucht. Es wurden hier die Unterschiede der Expression des LDL-Rezeptors anhand einer indirekten Anfärbung des LDL-Rezeptors überprüft. Huh 7 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und nach Anzucht und Vorbereitung immunzytochemisch aufbereitet. Die Durchführung der Immunzytologie wird im Kapitel „Material und Methoden“ unter „Immunhistochemische Methoden“ beschrieben. Für das folgende Experiment wurde eine MOI von 200 verwendet. Die Fütterung und die Durchführung des Zell Experimentes entspricht der bereits in 4.2.1 beschriebenen Weise. Der zweite verwendete Antikörper trägt das Flourophor Cy3TM und kann mittels eines Farbfilters sichtbar gemacht werden. Die Intensität der Anfärbung gibt einen Eindruck über die Menge der auf der Zelloberfläche exprimierten LDL-Rezeptoren. Somit stellen die gezeigten Ausschnitte lediglich ein kleines repräsentatives Bild des gesamten Präparats dar. Zur Infektionskontrolle dient der Vektor Ad-CMV EGFP, dessen grün fluoreszierendes Protein gut durch den geeigneten Farbfilter des Fluoreszenzmikroskops sichtbar wird. Zur besseren Darstellung der Zellen, bzw. der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt und diese Bilder übereinander gelegt (so genanntes „Merge-Verfahren“).

Abb.8
Fütterungsexperiment mit und ohne Cholesterin /
25-Hydroxy-cholesterin in Huh7 Zellen (Immunhistologie)

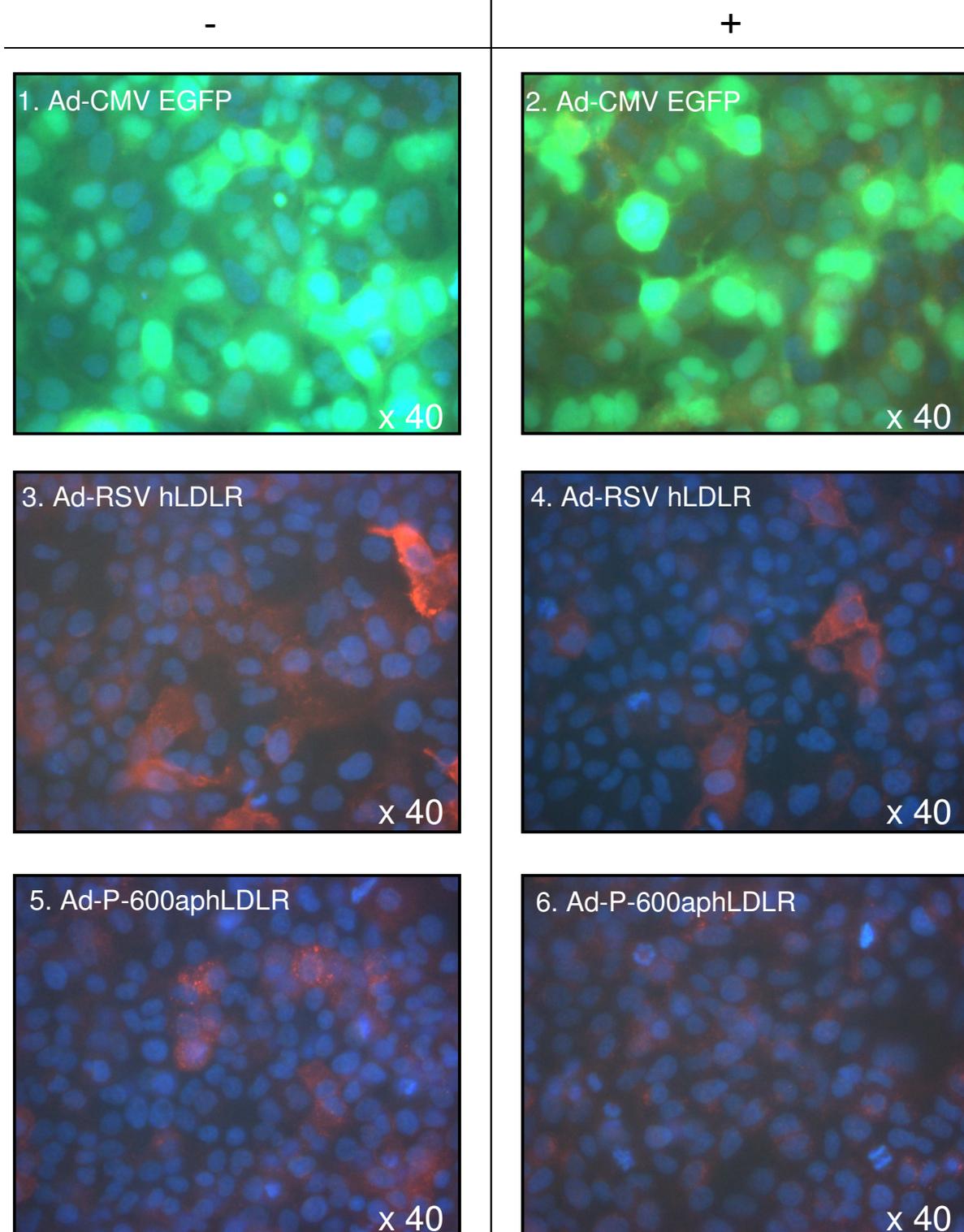


Abbildung 8**Immunzytologische Darstellung von GFP, Ad-RSV hLDLR und Ad-P_{600ap}hLDLR in Huh7 Zellen im Fütterungsexperiment mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin.**

Bild 1: Infektion von Huh7 Zellen mit Ad-CMV EGFP ohne Fütterung mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin.

Bild 2: Infektion von Huh7 Zellen mit Ad-CMV EGFP mit Fütterung mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin. Ein Unterschied stellt sich erwartungsgemäß nicht ein. Zusätzlich angefärbte LDL-Rezeptoren zeigten ebenfalls keinen Unterschied in der Expressionshöhe (Bild hier nicht gezeigt).

Bild 3: Infektion von Huh7 Zellen mit Ad-RSV hLDLR ohne Fütterung mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin mit deutlicher Herraufregulation von LDLR in den infizierten Zellen.

Bild 4: Infektion von Huh7 Zellen mit Ad-RSV hLDLR mit Fütterung mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin. Deutliche Herraufregulation von LDLR in den infizierten Zellen mit sichtbarer Herrunterregulation der LDLR Produktion in den umliegenden, nicht infizierten Zellen im Vergleich zum linken Bild.

Bild 5: Infektion von Huh7 Zellen mit Ad-P_{600ap}hLDLR ohne Fütterung mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin mit deutlicher Herraufregulation von LDLR in den infizierten Zellen.

Bild 6: Infektion von Huh7 Zellen mit Ad-P_{600ap}hLDLR mit Fütterung mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin. Deutliche Herrunterregulation der LDLR Produktion im gesamten Bereich im Vergleich zum linken Bild.

Methode: Huh7 Zellen, mit MOI 200 und Ad-RSV hLDLR infiziert. Links mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin gefüttert, rechts ohne Fütterung mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin. Bild: Zeiss® Axio Vert® mit der Software AxioVision Viewer® in der Version 3.0, Cy3™ gekoppelte LDL-Rezeptoren (rot) DAPI Zellkernfärbung (blau), Objektiv 40fach, Mergeverfahren.

Das in Abbildung 8 links gezeigte Bild 1 zeigt eine deutliche Infektion der Huh 7 Zellen mit dem Ad-CMV EGFP Vektor. Die dort gezeigten Zellen sind ohne Fütterung von Cholesterin / 25-hydroxy-cholesterin. Das Bild 2 auf der rechten Seite zeigt die gleiche Versuchsanordnung unter Fütterung mit Cholesterin / 25-hydroxy-cholesterin während der weitere Behandlungsverlauf exakt der oben genannten Präparation entsprach. Erwartungsgemäß unterscheiden sich die gezeigten Bilder nicht voneinander. Der Vektor Ad-CMV EGFP kann somit als Negativkontrolle in allen weiteren Versuchen verwertet werden.

Dargestellt in Bild 3 und 4 sind mit Ad-RSV hLDLR infizierte Huh 7 Zellen. Die Vorgehensweise zur Infektion und Fütterung entspricht der im vorigen Experiment genannten Vorgehensweise. Der mit Cy3™ gekoppelte LDL-Rezeptor erscheint im Bild als rötliche Färbung. Ebenfalls wurde auch hier DAPI zu Kernfärbung eingesetzt und dieses zur besseren Übersichtlichkeit übereinander projiziert (Merge-Verfahren).

Beide Aufnahmen zeigen eine rötliche Hintergrundfärbung, die die zelleigene LDL-Rezeptor Expression darstellt. Davon deutlich zu unterscheiden sind die Bereiche, in denen die Infektion durch Ad-RSV hLDLR zur deutlichen Überexpression geführt hat. In dem Bild 3 ist die Hintergrundfärbung der zelleigenen LDL-Rezeptoren der offensichtlich nicht infizierten Zellen auch deutlicher zu erkennen als in dem Bild 4. Dies bestätigt die im Western-Blot gefundene zelleigene Herunterregulation des LDL-Rezeptors. Die infizierten Huh 7 Zellen reagieren bei weitem geringer auf die Sättigung durch Cholesterin / 25-hydroxy-cholesterin, wobei die etwas geringere Ausprägung der Cy3TM Fluoreszenz durch die zelleigene Herunterregulation der LDL-Rezeptoren noch zu erklären ist, die auch trotz Infektion mit den Vektoren noch wirksam bleibt. Auch nach Fütterung sind deutlich Zellen zu erkennen, die den LDL-Rezeptor überexprimieren, wenn auch nicht in der erwarteten infizierten Zellzahl im Vergleich zu dem Bild 2, welches sich bei der Infektion mit dem Vektor Ad-CMV EGFP ergibt.

Die Bilder 5 und 6 zeigen nun die mit dem Ad-P_{-600ap}hLDLR Vektor infizierten Huh 7 Zellen. Das gleiche Procedere bezüglich der Fütterung mit Cholesterin / 25-hydroxy-cholesterol gilt auch bei diesem Teil des Experimentes.

Die Abbildungen zeigen auch hier vor allem in dem Bild 5 auf der linken Seite deutliche Zeichen der Überexpression des LDL-Rezeptors. Im Vergleich der beiden Bilder 5 und 6 ist deutlich zu erkennen, dass unter Zugabe von Cholesterin / 25-hydroxy-cholesterin die Signale des LDL-Rezeptors schwächer sind. Die Interpretation dieser Abbildung könnte der Schluss nahe liegen, dass die cholesterinregulierte Expression des LDL-Rezeptors mittels Ad-P_{-600ap}hLDLR möglich ist.

4.3 Testung der Funktionalität von Ad-P_{-600ap}hLDLR in der Maus

Im Zuge der Vortestungen des Ad-P_{-600ap}hLDLR Vektors wurde, damit begonnen, diesen auch in Mäusen zu applizieren. Als Testobjekt der Applikationsart und Menge dienten zwei männliche Wildtyp Mäuse, während für eine funktionelle Vortestung drei männliche LDL-Rezeptor knock-out Mäuse zur Verfügung standen. Die Vorgehensweise zur Behandlung der Mäuse wird im Kapitel Material und Methoden „Injektion von Viren in Mäuse“ beschrieben.

4.3.1 Dosisanpassung in Wild-Typ Mäusen

Die beiden Wild-Typ Mäuse unseres Pilotexperiments dienten zur Dosisermittlung und zur Überprüfung der Infektiösität bezogen auf das Zielorgan. Zur Überprüfung der Infektiösität diente der Vektor Ad-CMV EGFP, um dessen Expression später anhand von Leberschnitten durch die Produktion des grün fluoreszierenden Proteins sichtbar zu machen. Die Verträglichkeit des späteren Zielvektors Ad-P_{-600ap}hLDLR wird an der zweiten Maus getestet. Zur Infektionskontrolle wurden der ersten Maus $4 \cdot 10^7$ Viren (Ad-CMV EGFP) pro Gramm Körpergewicht verabreicht. Der zweiten Maus wurde eine circa zehnfach höhere Menge ($4 \cdot 10^8$ Viren pro Gramm Körpergewicht) an Ad-P_{-600ap}hLDLR verabreicht. Die Applikation erfolgte unter Betäubung mittels Injektion in die Schwanzvene. In den fünf Tagen Beobachtungszeit wurde kein außergewöhnliches Verhalten der Mäuse festgestellt. Innerhalb dieses Zeitraumes schienen die Mäuse, die ihnen verabreichten Dosierungen von Virus zu tolerieren. Nach fünf Tagen wurden die Mäuse nekroskopiert. Die Organe wurden in Tissue-Tek[®] eingebettet und bei -80°C eingefroren.

4.3.2 Immunhistologische Untersuchung der Wild-Typ Mäuse

Im Zuge des im 4.3.2 erwähnten Experimentes wurden die Lebern der beiden Wild-Typ Mäuse bei -80°C eingefroren und danach zur immunhistologischen Untersuchung aufbereitet. Es wurde nach dem im Kapitel Material und Methoden beschriebenen Verfahren „immunhistologische Aufarbeitung“ verfahren. Die Zellkerne wurden mit DAPI und der humane LDL-Rezeptor mit Cy3TM angefärbt. Eine Infektionskontrolle wurde mit dem Vektor Ad-CMV EGFP durchgeführt und zeigte durch die Expression des Green fluoreszierendes Protein eine erfolgreiche Infektion der Mäuse an. Die Anfärbung der LDL-Rezeptoren in den Mäuseleberzellen konnte ebenfalls erfolgreich nachgewiesen werden.

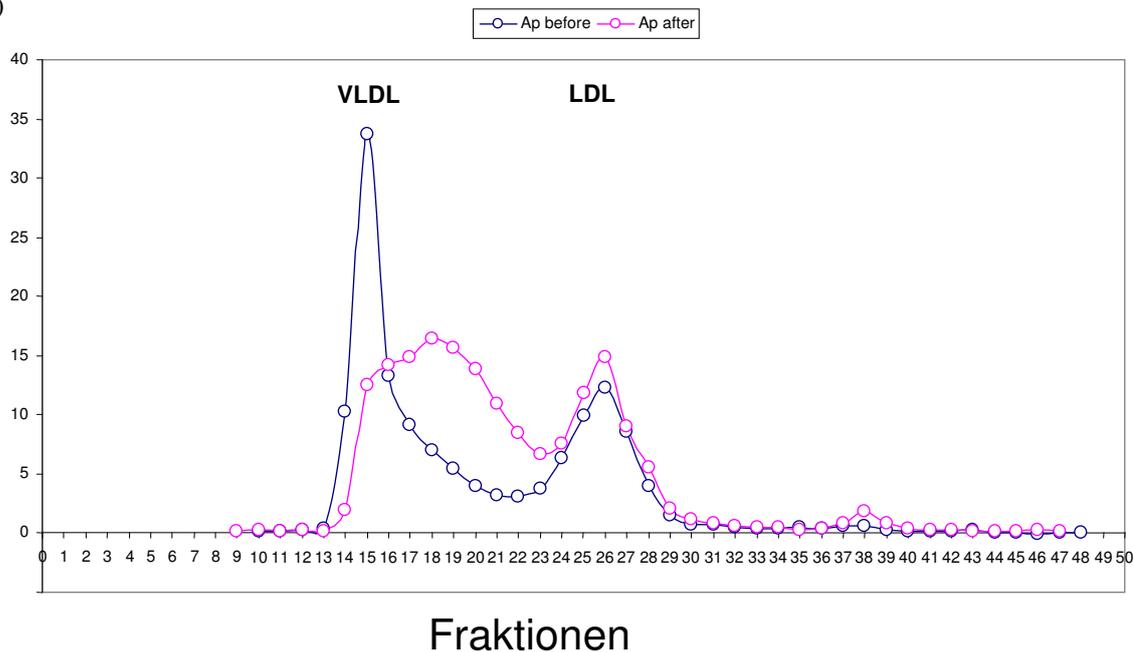
Ebenfalls wurde die mit Ad-P_{-600ap}hLDLR infizierte Maus mit einer zehnfach höheren Menge an Virus belastet, um die Verträglichkeit der Virenpräparation zu testen. Die Maus zeigte bis zum Tag 5 des Experimentes keine körperlichen Symptome, so dass von einer Verträglichkeit der applizierten Virenmenge ausgegangen werden kann. In der Immunhistologischen Untersuchung zeigte sich ein dichteres Fluoreszenzmuster der LDL-Rezeptoren in der mit Ad-P_{-600ap}hLDLR Vektor infizierten Maus, so dass die Vermutung nahe liegt, dass der neue Vektor eine Regulation der LDL-Rezeptoren bewirken kann. Da es sich aber nur um eine Vortestung bei zwei Versuchstieren handelt, hat diese Beobachtung keinen prädiktiven Wert. Die eingesetzten Mengen erscheinen also in folgenden Studien als sicher und geeignet die gesuchten Effekte zu untersuchen.

4.3.3 Serum-Lipoproteinprofile nach adenoviraler Expression des LDLR in LDLR knock-out Mäusen.

Die Vortestungen in den Wild-Typ Mäusen haben gezeigt, dass die Darstellung des LDL-Rezeptors mittels des LDL-Rezeptor Antikörpers in der Immunhistochemie möglich ist. Da aber die Injektion der Viren in den Wild-Typ Mäusen noch keiner gewichtsbezogenen Relation unterlag, ist die Quantifizierung mittels immunhistochemischer Schnitte nicht möglich. Dieser Tatsache sollte im folgenden Experiment Rechnung getragen werden, indem die Injektionsmenge der Viren gewichtsbezogen vorgenommen wurde. Nach dem Wiegen der knock-out Mäuse wurde die zu injizierende Menge des Virenstocks mittels des Virustiters aus der ersten TCID-Titerbestimmung errechnet und mit PBS auf 205 μ l aufgefüllt. Es erfolgte die Applikation von $1,5 \cdot 10^9$ Viren pro Gramm Körpergewicht.

Da die Menge des Ad-CMV EGFP die Gesamtmenge von 205 μ l um das Doppelte überschritten hätte, wurde für diesen Vektor nur die Hälfte der Virenmenge eingesetzt.

Um eine quantifizierbare Aussage über die Wirkung der eingesetzten Vektoren zu erhalten, wurde die Methode der Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) eingesetzt. Diese ermöglicht es aus den gewonnenen Mäuseseren die darin enthaltenen Lipidfraktionen zu trennen und zu bestimmen. Vor der Injektion der Viren wurde eine Blutprobe entnommen und das daraus gewonnene Serum der FPLC zugeführt. Diese Werte vor Behandlung dienen als Vergleichswerte bzw. Referenz. Am fünften Tag nach Injektion und unter Normalfütterung wurde den Mäusen ein weiteres Mal Blut entnommen. Dieses wurde zentrifugiert und das Serum ebenfalls durch FPLC aufgetrennt und das Lipoproteinprofil bestimmt. Die FPLC ergab folgende Bilder:

Ad-600ap^hLDLRCholesterinkonzentration
($\mu\text{g/ml}$)**Abbildung 9 Fast Performance Liquid Chromatography einer Wild Typ Maus vor / und nach Infektion mit Ad-P-600ap^hLDLR Viren.**

Infektion von Wild-Typ Maus mit Ad-P-600ap^hLDLR, $1,5 \cdot 10^9$ Viren pro Gramm Körpergewicht. Verringerte VLDL Fraktion nach Infektion, aber dennoch geringer Anstieg der LDL Fraktion nach Fütterung.

Methode: Wild-Typ Maus mit Ad-P-600ap^hLDLR, $1,5 \cdot 10^9$ Viren pro Gramm Körpergewicht infiziert. Fünf Tage Normalfutter. Serumentnahme durch Schwanzvene vor und fünf Tage nach Infektion. FPLC des Serums und Analyse der Fraktionen durch Cholesterinreagenz (Chol R1 Roche/Hitachi Roche Diagnostics GmbH) im Elisa-Reader (MRX Microplate reader Dynatech LaboratoriesTM).

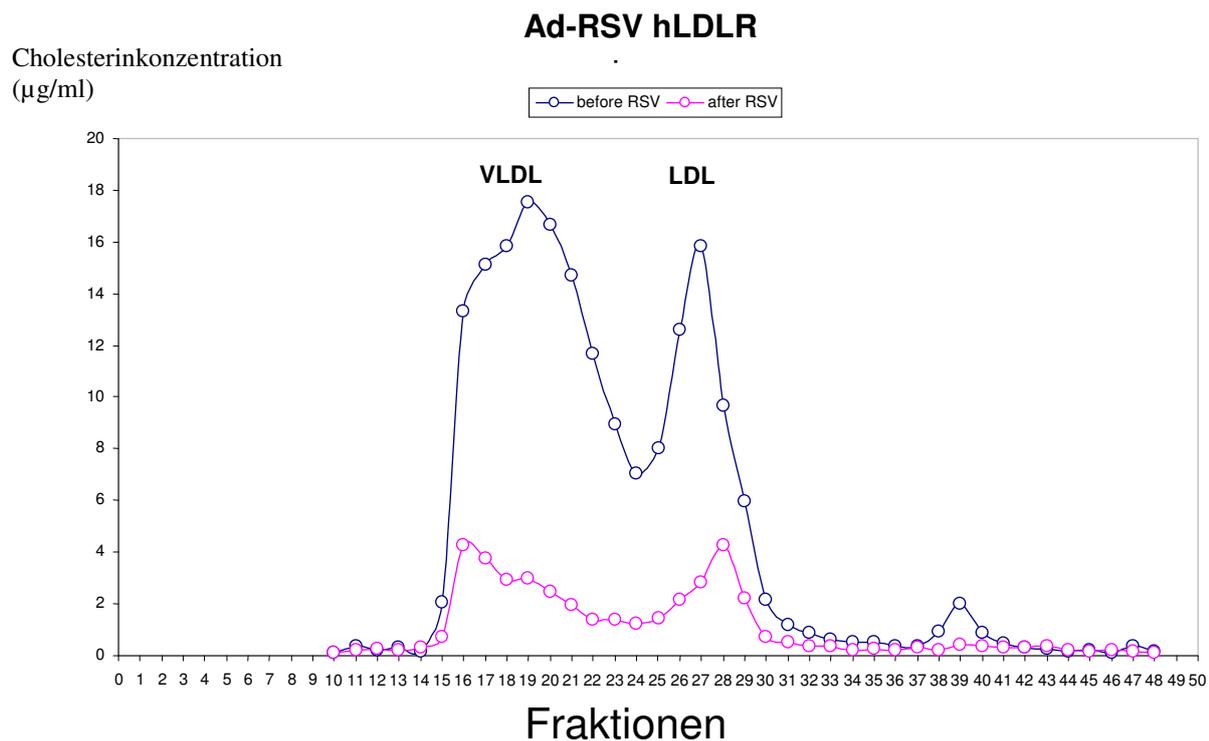


Abbildung 10 Fast Performance Liquid Chromatography einer Wild Typ Maus vor / und nach Infektion mit Ad-RSV hLDLR.

Infektion von Wild-Typ Maus mit Ad-RSV hLDLR, $1,5 \cdot 10^9$ Viren pro Gramm Körpergewicht. Verringerte VLDL Fraktion nach Infektion, sowie stark verringerte LDL Fraktion nach Fütterung.

Methode: Wild-Typ Maus mit Ad-RSV hLDLR, $1,5 \cdot 10^9$ Viren pro Gramm Körpergewicht infiziert. Fünf Tage Normalfutter. Serumentnahme durch Schwanzvene vor und fünf Tage nach Infektion. FPLC des Serums und Analyse der Fraktionen durch Cholesterinreagenz (Chol R1 Roche/Hitachi Roche Diagnostics GmbH) im Elisa-Reader (MRX Microplate reader Dynatech LaboratoriesTM).

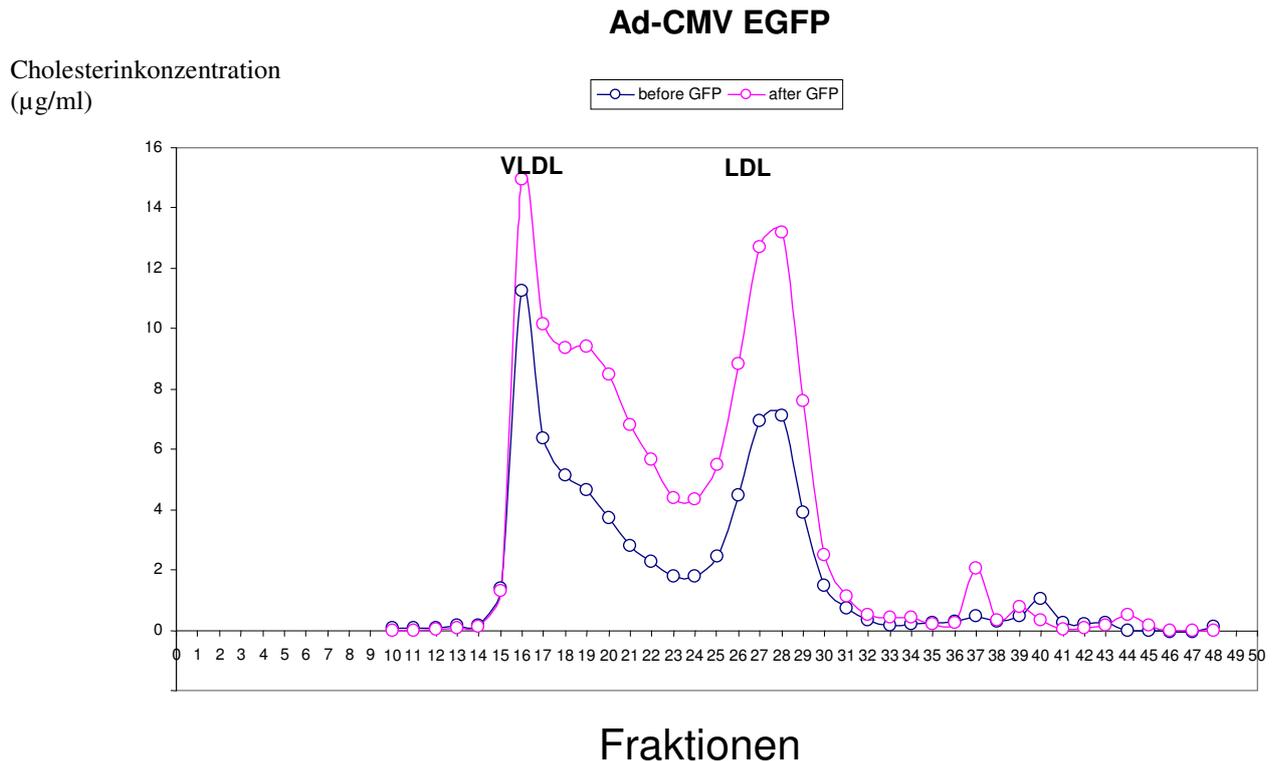


Abbildung 11 Fast Performance Liquid Chromatography einer Wild Typ Maus vor / und nach Infektion mit Ad-CMV EGFP.

Infektion von Wild-Typ Maus mit Ad-CMV EGFP, $7,5 \cdot 10^8$ Viren pro Gramm Körpergewicht. Verringerte VLDL Fraktion nach Infektion, aber dennoch geringer Anstieg der LDL Fraktion nach Fütterung.

Methode: Wild-Typ Maus mit Ad-CMV EGFP, $7,5 \cdot 10^8$ Viren pro Gramm Körpergewicht infiziert. Fünf Tage Normalfutter. Serumentnahme durch Schwanzvene vor und fünf Tage nach Infektion. FPLC des Serums und Analyse der Fraktionen durch Cholesterinreagenz (Chol R1 Roche/Hitachi Roche Diagnostics GmbH) im Elisa-Reader (MRX Microplate reader Dynatech LaboratoriesTM).

Die mit Ad-P_{-600ap}hLDLR infizierte Maus zeigt überraschenderweise im Gegensatz zur erwarteten Herunterregulation des LDLs eine leichte Erhöhung des gesamt Cholesterins. Bei der mit Ad-RSV hLDLR infizierten Maus ist ein deutlicher Abfall der Cholesterin Konzentration im Serum erkennbar. Die mit Ad-CMV EGFP infizierte Maus zeigt wiederum einen starken Anstieg an LDL. Lediglich die mit Ad-RSV hLDLR infizierte Maus zeigt die erwartete Reaktion innerhalb dieses Experimentes. Der Anstieg der LDL Fraktion in der mit Ad-P_{-600ap}hLDLR infizierten Maus ist nicht so stark ausgeprägt, wie der Effekt in der mit Ad-CMV EGFP infizierten Maus. Bei gleicher Behandlung der Mäuse müsste somit auch von einem Effekt des Vektors Ad-P_{-600ap}hLDLR auszugehen sein, wenngleich dieser nicht die eigentlich erwartete Reduktion der LDL Fraktion zeigt. Dieses Pilotexperiment zeigt, dass bei der eingesetzten Dosis mit Ad-P_{-600ap}hLDLR kein LDL-Cholesterin senkender Effekt erzielt

werden kann. Eine Hypothese die aus diesem Ergebnis abgeleitet werden kann, ist dass die durch TCID Methode ermittelten viralen Titer zu ungenau bestimmt sind, um bei dem Vergleich der beiden Vektoren aussagekräftige Werte zu erhalten. Es könnte somit nicht genügend Vektor in der Maus vorhanden gewesen sein um eine deutliche Expression von Ad-P_{600ap}hLDLR zu zeigen.

4.4 Titerbestimmung mittels quantitativer Real-Time PCR

Eine Frage die im Kapitel 4.2 bis 4.4 der Arbeit noch offen geblieben war, ist die Frage nach der Richtigkeit des ermittelten Titers mittels der TCID Methode, so dass hier eine unabhängige Methode mit potentiell geringerer Streuung entwickelt werden soll, die den Titer der Virenstocks bestimmen kann. Eine Methode mittels Southern-Blot Verfahren wurde getestet, doch wegen größerer technischer Vorbereitung, sowie lang dauernder Versuchsdurchführung wieder fallengelassen. Um hier eine möglichst genaue, schnelle und reproduzierbare Methode zu erhalten, wurde an einer Titrationsmethode mit Hilfe der Real-Time PCR gearbeitet und ein Konstrukt entwickelt, dass im Folgenden näher erläutert wird. Die Durchführung, soweit sie nicht von dem Standardverfahren abweicht, ist im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben.

4.4.1 Quantitative Real-Time PCR Bestimmung des Messbereichs in Verdünnungen präparierter Adenoviren

Ohne quantifizierendes Bezugssystem in der Real-Time PCR bleibt lediglich die Möglichkeit, die relativen Abweichungen der Virenstocks untereinander zu vergleichen. Wären die Konzentrationen der verschiedenen Virenpräparationen gleich, so müssten sich in der Real-Time PCR bei gleicher MOI auch gleiche Kurvenverläufe für die verschiedenen Virenpräparationen ergeben. Durch die Verschiebung dieser Kurvenverläufe, ergibt sich ein Multiplikationsfaktor. Zur relativen Quantifizierung wurde das in Material und Methoden beschriebene System der Hexon-Sonde mit den Primern Hexon-F, sowie Hexon-R bei einer Annealingtemperatur von 60°C verwendet. Das Temperaturschema und Zyklusschema der PCR kann der Abbildung 12 entnommen werden.

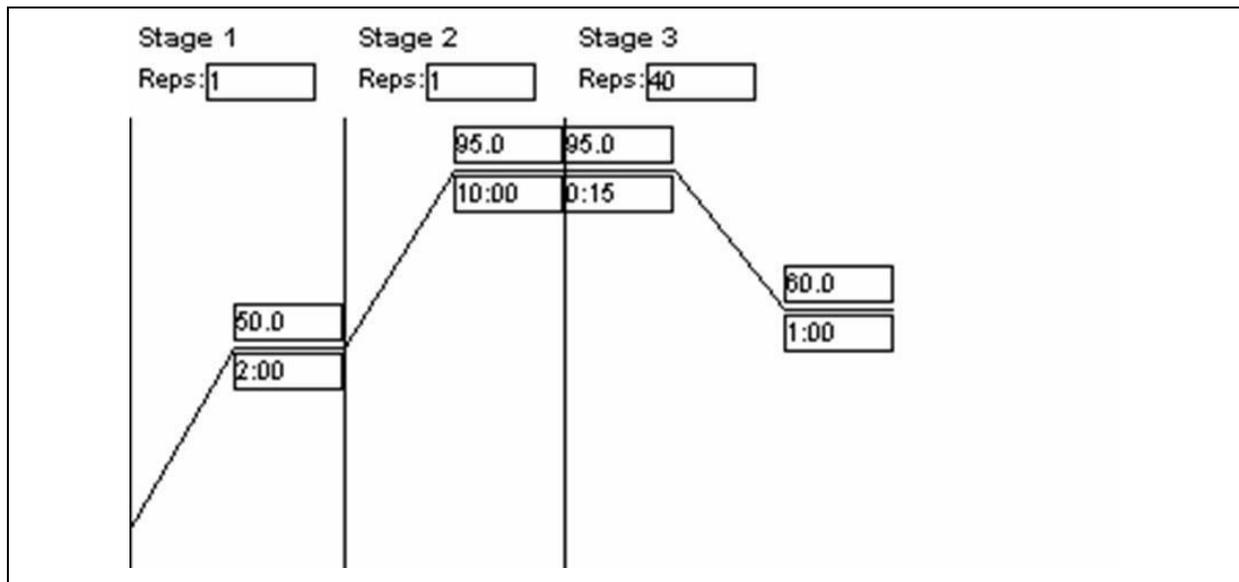


Abbildung 12 Bildliche Darstellung des verwendeten PCR Schemas für die Läufe in der Real-Time PCR.

Anwärmphase mit 50 °C für 2 min, Erreichen der Annealing Temperatur von 60 °C bis 95 °C für 10 min, danach 40 Zyklen mit 15 sek 95 °C und jeweils einer Minute Annealingtemperatur.

Methode: Real-PCR Maschine (Firma Stratagene® mit der Typbezeichnung MX 4000™), Primer und Probes siehe Kapitel „Real-Time PCR „Primer und Probes“.

Die Virenstocks wurden in Zehnerpotenzen mit Aqua tridest. verdünnt. Es wurde bis zu einer Verdünnung von 10^6 der Ausgangslösung getestet. Die Kurvenverläufe im Real-Time PCR Lauf entsprachen dem erwarteten Ergebnis. Der Abstand zwischen den Kurven der einzelnen Verdünnungen entsprach genau 3,3 Zyklen, was einen Faktor von 10 entspricht. Die Real-Time PCR bietet somit eine genaue Methode, um die Verdünnungsreihe nachzuvollziehen.

In Abbildung 13 sieht man ein Real-Time PCR Lauf der die Verdünnungsreihe des Ad-P_{-600ap}hLDLR Virenstocks darstellt. Die Verdünnungen sind durch graue Pfeile gekennzeichnet während die schwarzen Pfeile die Punkte markieren an denen die Kurven den C_t -Wert schneiden und damit den Zyklus kennzeichnen, an dem die Fluoreszenz gemessen wurde. Wichtig ist es den Threshold in circa einem Drittel des Kurvenverlaufes anzusetzen, da die Varianz in der Anfangsphase der Fluoreszenzkurve am höchsten ist.

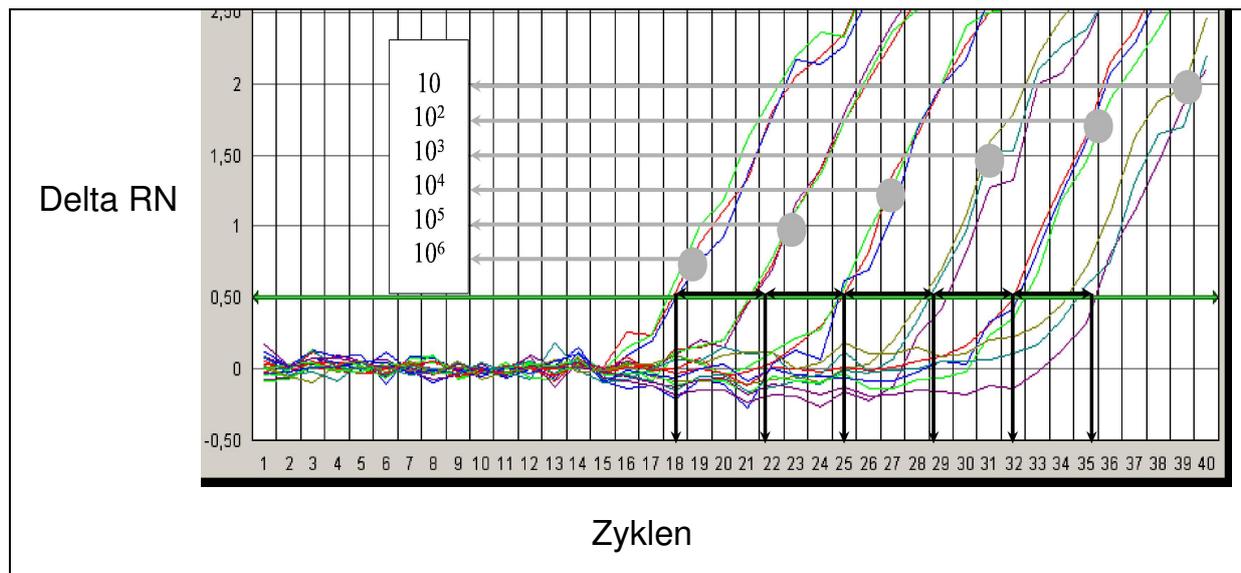


Abbildung 13 Kurvenverlauf eines Real Time PCR Laufs mit kontinuierlicher Verdünnungsreihe eines Virenstocks (relative Quantifizierung).

Bildliche Darstellung einer kontinuierlichen Verdünnungsreihe einer Virenproduktion (Ad-RSV hLDLR). Die jeweiligen Proben wurden in Triplets gemessen. Die Triplets zeigen eine sehr geringe interexperimentelle Varianz. Die Schnittpunkte der Verdünnungsreihen liegen genau 3,3 Einheiten auseinander, dies entspricht genau einer Verzehnfachung in der logarithmischen Skala. Es handelt sich hier um eine relative Quantifizierung.

Methode: Real-Time PCR Gerät der Firma Abiprism 7000™ der Firma Applied Biosystems® sowie deren Analyseprogramm.

In der folgenden Abbildung 14 ist ein Vergleich der Vektoren Ad-P-_{600ap}hLDLR, Ad-RSV hLDLR und Ad-CMV EGFP dargestellt. Es wurden Zellen mit einer MOI 10 nach CPE-Titer infiziert und für die Real-Time PCR aufgearbeitet. Der PCR Lauf erfolgte nach dem bereits oben erwähnten Schema. Zur Infektion wurden ebenfalls Huh7 Zellen verwendet.

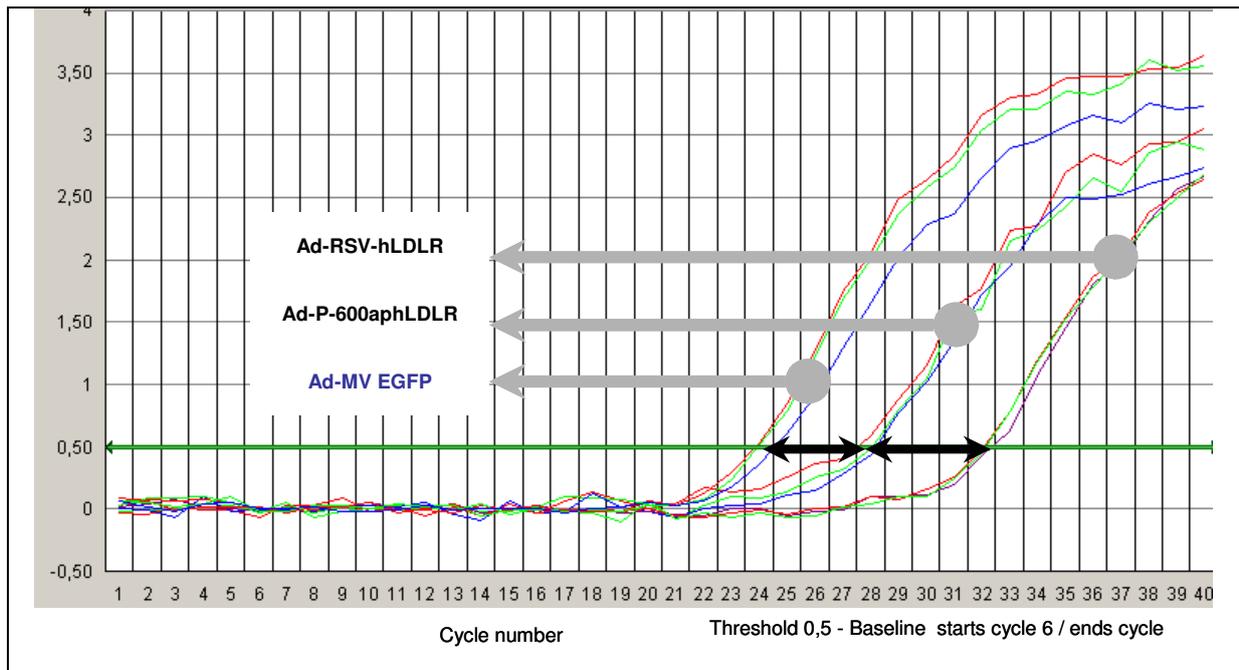


Abbildung 14 Relative Quantifizierung zwischen verschiedenen Virenstocks (Ad-P-_{600ap}hLDLR, Ad-RSV hLDLR und Ad-CMV EGFP).

Die schwarzen Pfeile markieren den Zyklusabstand zwischen den Messungen. Unterschiede von 3 bis 8 Zyklen zwischen den verschiedenen Virenstocks bedeutet Faktoren von 10- bis 24fach Varianz zwischen den verschiedenen Virenpräparationen.

Methode: Kurvenverlauf eines Real Time PCR Laufs mit verschiedenen Virenstocks. Infizierte Huh7 Zellen mit einer MOI von 10. (Ad-P-_{600ap}hLDLR, Ad-RSV hLDLR und Ad-CMV EGFP). DNA Aufbereitung der Zellen. Die jeweiligen Proben wurden in Triplets gemessen. Die Triplets zeigen eine sehr geringe interexperimentelle Varianz. Real-Time PCR Gerät der Firma Abiprism 7000TM der Firma Applied Biosystems[®] sowie deren Analyseprogramm.

In der Abbildung 14 erkennt man den Abstand der einzelnen Kurven in Höhe des Threshold. Dies bedeutet, dass bei verschiedenen Virenstocks, gleichen CPE Titer, in der Real-Time PCR verschiedene Titer gemessen wurden. Diese können zwar noch nicht absolut angegeben werden, doch relativ zueinander betrachtet, weisen sie Unterschiede von 3 bis 8 Zyklen auf. Dies entspricht Faktoren von circa 10- bis 24-fachen Unterschieden. Die Variationen innerhalb der Triplets einer Virenverdünnung sind gering.

4.4.2 Etablierung einer Standardreihe für die absolute Quantifizierung der Titer.

Zur Testung des Primer / Probe Systems sollte der lineare Zusammenhang von Verdünnungsreihen der Virenstocks getestet werden. Es wurde ein Plasmid des adenoviralen Vektors erstellt. Das Plasmid wurde durch Restriktionsenzyme geschnitten, wodurch eine Größe von 35,35 kpb erreicht wurde. Eine Aufreinigung durch Agarosegelelektrophorese folgte. Nach Ausschneiden der gewünschten Bande und Rückführung in Lösung, erfolgte die Konzentrationsbestimmung des isolierten DNA-Fragmentes photometrisch. Nach der Berechnung der Konzentration folgte eine Verdünnung der Lösung zu einer Arbeitslösung die eine Konzentration von 10^6 Molekülen / μl enthält. Eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen wurde erstellt. Der Bereich von 10^6 bis 10 Molekülen pro μl wurde somit abgedeckt. Eine photometrische Kontrolle der Arbeitskonzentrationen erfolgte. Die Plasmidstandardreihe (Bezeichnung) wurde zur Erstellung der Standardkurve in den Real-Time PCR Läufen benutzt. Eine absolute Quantifizierung der eingesetzten Proben wird dadurch möglich.

Durch gezielte „Kontamination“ der Plasmidstandardreihe mit genomischer DNA aus Huh7 wurde in einem getrennten Real-Time PCR Lauf sichergestellt, dass das nachgewiesene Real-Time PCR Produkt spezifisch für virale DNA ist und gleiche Reaktionsbedingungen wie bei den zellulären Proben herrschen.

In den folgenden PCR Läufen wurden jeweils Annealingtemperaturen von 60°C verwendet. In einem PCR Lauf wurden vierzig Zyklen durchlaufen. Die verwendeten Mastermixe zur Erstellung der PCR Ansätze sind in Material und Methoden aufgeführt.

Abbildung 15 zeigt die ermittelte und in den folgenden Experimenten verwendete Standardkurve. Die genaue Messmethodik der Real-Time PCR wird schon in der Ermittlung der Standardkurve deutlich, bei einer guten Korrelation von 0,995.

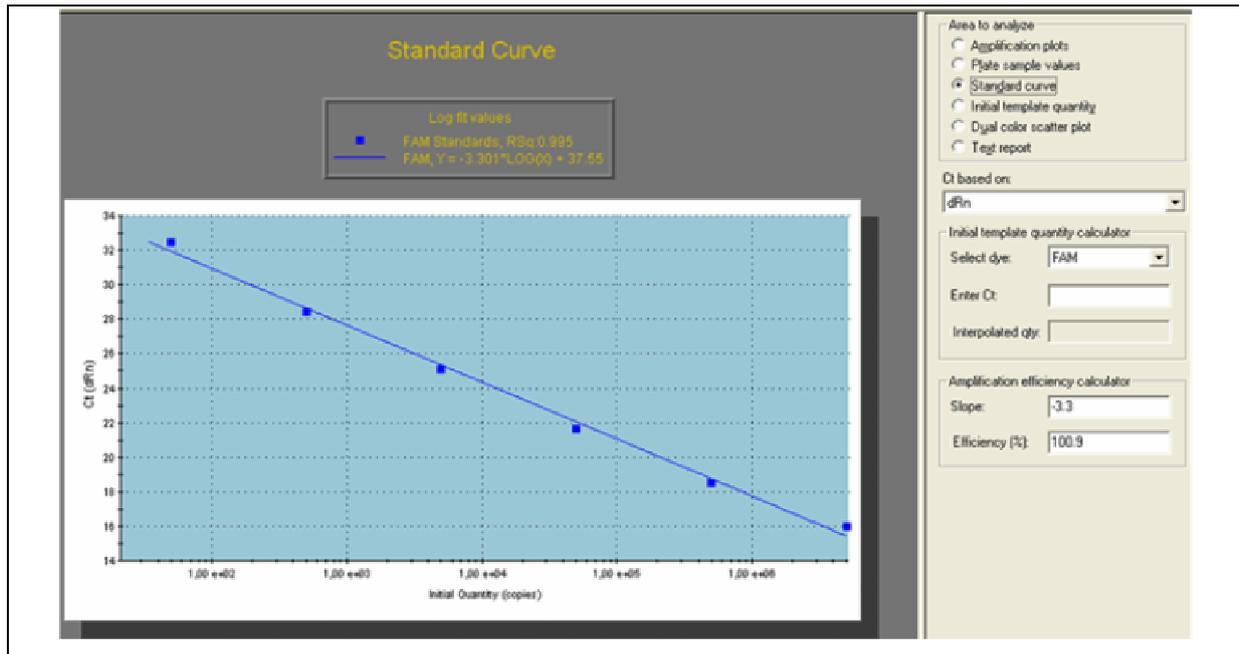


Abbildung 15 Darstellung einer Plasmidstandardkurve. Ermittelt zur Quantitativkation von Adenoviren. Erstellt mit Hilfe eines angefertigten Plasmids in der Real-Time PCR

Die ermittelten Messpunkte der Plasmidkonzentrationen zeigen in der Kurve eine sehr geringe Abweichung zur logarithmisch angelegten Steigungskurve.

Methode: Ein Plasmid mit dem adenoviralen Vektor wurde mittels Restriktionsenzymen auf die Größe von 35,35 kbp geschnitten und die Konzentration photometrisch bestimmt. Nach Anfertigen einer Verdünnungsreihe, konnte die Standardkurve in der Real-Time PCR mit dem integrierten Programm erstellt werden. Real-PCR Maschine (Firma Stratagene® mit der Typbezeichnung MX 4000™ und der zugehörigen Software), Primer und Probes siehe Kapitel „Real-Time PCR „Primer und Probes“.

4.4.3 Absolute Quantifizierung anhand der Standardreihe

Prinzip:

Huh7 Zellen werden mit bestimmten Volumen des Virenstocks infiziert ($V_{\text{Infection}}$). Das Medium wird nach vier Stunden gewechselt. Die Zellen werden nach 24 Stunden geerntet, mit PBS gewaschen und lysiert. Die Proben werden einem Proteinase K Verdau unterzogen. Die insgesamt enthaltene DNA wird mit dem Marchery & Nagel® Kit aufgereinigt. Ein Volumenäquivalent ($V_{\text{PCR_Template}}$) des gesamten DNA Eluats ($V_{\text{total_Eluat}}$) wird in der Real-Time PCR gemessen und mit der Standardkurve der Gehalt an viraler DNA abgelesen. Hieraus ergibt sich eine Kopienanzahl der in der Probe gemessenen viralen DNA Kopien ($V_{\text{copies_from_qPCR}}$). Die Verdünnungen des DNA Eluats (D_1) zum Einsatz in die Real-Time PCR bzw. die Verdünnungen des Virenstocks zur Infektion (D_2), bezogen auf einen Mikroliter gehen als Verdünnungsfaktor D_g , wobei $D_1 * D_2 = D_g$ ist, in die Rechnung mit ein. Um nun einen Virentiter ($T_{\text{viral_Stock}}$) der Stocklösung zu erhalten, geht man nach folgender Rechnung vor:

$$\frac{V_{copies_from_qPCR} * D_g * V_{total_Eluat}}{V_{infection} * V_{PCR_Template}} \approx T_{viral_Stock} \left[\frac{Viren}{\mu l} \right]$$

Das PCR Profil besteht aus einer Schmelztemperatur von 95°C über 10 min als erster Schritt und danach 45 Zyklen a 30 sek bei 95°C und 90 sek bei 60°C. DNA nicht infizierter Huh7 Zellen aus dem gleichen Versuchsansatz dienen der Negativkontrolle. Die Messungen werden in Triplets durchgeführt. Für die Durchführung der PCR, sowie die Herstellung der Mastermixe wird nach den Vorgaben der Hersteller (Stratagene®) vorgegangen.

4.4.4 Berechnung der absoluten Titer

Getestet wurden die Virenstocks der Virenpräparation von Ad-P-600ap hLDLR und Ad-RSV hLDLR. Es wurden jeweils drei Verdünnungen in 10'er Schritten der Virenstocks verwendet. Die eingesetzten Volumina der Stocklösung, die Endzahl der Huh7 Zellen zum Zeitpunkt der Infektion, die Eluatmenge nach der DNA Präparation sowie die in der Real-Time PCR eingesetzten Menge des DNA Eluats sind in Tabelle 2 bis 5 des Anhangs einzusehen. Darunter sind die durch die Standardreihe ermittelte Kopienzahl der in der PCR eingesetzten Probenmenge und die jeweiligen Verdünnungsfaktoren. Das Resultat der einzelnen Messungen ist in der Zeile T_{viral_Stock} ersichtlich. Es wurden drei verschiedene Infektionsvolumina benutzt die in der Rechnung durch den Verdünnungsfaktor D miteinander verglichen werden können. Aus der Rechnung ergaben sich folgende Titer:

$$\text{Ad-P-600ap hLDLR (AP DNA)} = 9,2 * 10^7 \text{ Viren/ } \mu\text{l}$$

$$\text{Ad-RSV hLDLR (RSV DNA)} = 1,5 * 10^7 \text{ Viren/ } \mu\text{l}$$

Der Ad-P-600ap hLDLR Titer der Real-Time PCR DNA Präparation ist mit $9,2 * 10^7$ (Viren/ μl) 17,23 Fach niedriger als der mit TCID Methode gemessene Titer. Bei Ad-RSV hLDLR ist der Titer mit $1,5 * 10^7$ (Viren/ μl) 21,1 Fach niedriger als der ermittelte TCID-Titer.

4.5 Aufnahme von Viren in die Zelle

4.5.1 Untersuchung der Korrelation der mittels Real-Time PCR bestimmten Vektorkopienzahlen mit dem infektiösen Titer

Bei der Anwendung der Real-Time PCR Methode handelt es sich um ein hochsensitives System. Damit ergibt sich immer die Frage, ob alle Signale, die gemessen werden, auch den durch den viralen Infektionsprozeß aufgenommenen Viruspartikeln entsprechen. Da in den oben beschriebenen Experiment jegliche virale DNA gemessen wird, die sich nach den Waschschritten noch in den Proben befinden, ergibt sich die Frage, ob nicht eventuell die Adenoviren oder Teile der Viren in der Lage sind sich an der Oberfläche der Huh7 Zellen zu binden, dort in die DNA Präparation zu gelangen und das Bild eines verfälschten Titers zu erzeugen, der nicht der tatsächlichen Anzahl an infektiösen Viren entspricht. Um das potentielle Problem unspezifischer Signale durch Bindungen oder Aufnahmen von Viren an und in die Zelle zu untersuchen, wurde eine Zellkernpräparation vor die Isolation der DNA geschaltet. Die Durchführung der Zellkernpräparation ist unter „Material und Methoden“ beschrieben. Abbildung 16 zeigt die erfolgreiche Zellkernpräparation nach dem ersten Waschschritt in CaCl_2 Puffer. Nach der Isolation der Zellkerne erfolgte die DNA Aufreinigung wie bereits im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die in der Real-Time PCR nachgewiesene virale DNA kann somit nur noch aus dem Zellkern stammen und kann somit der tatsächlichen Anzahl an infektiösen viralen Vektorpartikeln gleichgesetzt werden.

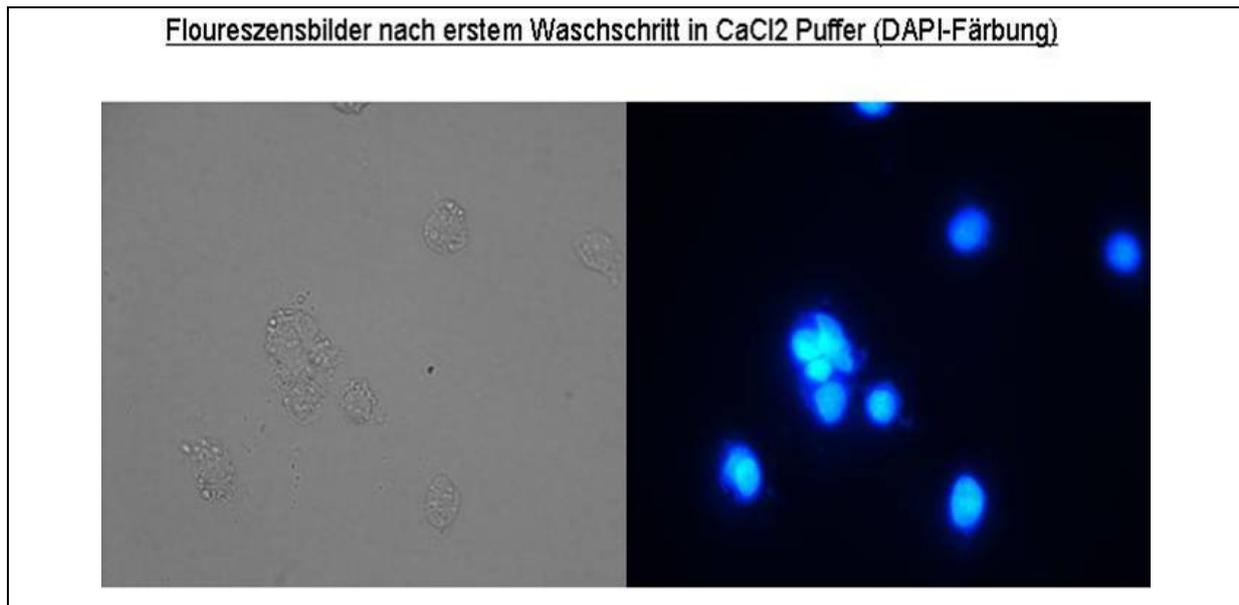


Abbildung 16 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Zellkernen nach der Zellkernpräparation zur viralen DNA-Aufbereitung

Linke Seite: Lichtmikroskopische Darstellung der Zellkerne infizierter Huh7 Zellen nach dem ersten Waschschrift in CsCl Puffer.

Rechte Seite: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zellkerne infizierter Huh7 Zellen nach dem ersten Waschschrift in CsCl Puffer und DAPI Färbung. Keine Hinweise für intakte Zellen oder Zellmembranen, die das Ergebnis der Real-Time PCR stören könnten.

Methode: Huh7 Zellen, mit MOI 200 und Ad-RSV hLDLR infiziert. Nukleäre Zellkernpräparation nach erstem CsCl Waschschrift. Bild: Zeiss® Axio Vert® mit der Software AxioVision Viewer® in der Version 3.0, DAPI Zellkernfärbung, Objektiv 63fach.

4.5.2 Zelluläre DNA Präparation versus nukleäre DNA Präparation

Im folgenden Experiment wurde genauso wie im Experiment aus 4.4.5 vorgegangen. Es wurde vor der DNA Aufreinigung noch eine Zellkernpräparation durchgeführt. Es wurde hier der Vergleich der Titer berechnet aus dem Experiment „ohne“ und „mit“ Zellkernpräparation. Es kann gezeigt werden, dass sich die ermittelten Titer durchaus voneinander unterscheiden. Der Tabelle 4 des Anhangs sind die Eluatmenge nach Zellkernpräparation, sowie die daraus in der Real-Time PCR eingesetzte Menge, Zellzahl zum Zeitpunkt der DNA Präparation und zur Infektion eingesetzte Menge aus dem Virenstock zu entnehmen. Folgende Titer der Viren wurden nach der Zellkernpräparation bestimmt:

Ad-P_{-600ap}hLDLR (AP NUC) = $1,9 \cdot 10^8$ Viren/ μ l

Ad-RSV hLDLR (RSV NUC) = $3,2 \cdot 10^7$ Viren/ μ l

In Tabelle 5 des Anhangs sind die weiteren Werte zur Ermittlung der viralen Titer mit Hilfe der Real-Time PCR angegeben. Darunter die durch die Standardreihe ermittelte Kopienzahl der in der PCR eingesetzten Probenmenge und die jeweiligen Verdünnungsfaktoren. Es wurden drei verschiedene Infektionsvolumina benutzt die in der Rechnung durch den Verdünnungsfaktor D miteinander korreliert werden können.

Der Real-Time PCR Titer der nukleären Präparation von Ad-P_{-600ap}hLDLR liegt um das 8,4 fache niedriger, als der durch die TCID Methode ermittelte Titer. Bei der nukleären Präparation von Ad-RSV hLDLR ist der durch Real-Time PCR ermittelte Titer 9,9 Fach niedriger als der durch die TCID Methode ermittelte Titer. Der Titer der nukleären DNA Präparation von Ad-P_{-600ap}hLDLR liegt 2,05 fach höher als der Titer, der gesamten DNA aus der Zellaufbereitung. Für Ad-RSV hLDLR liegt der Titer der nukleären DNA Präparation 2,14 fach höher als der der gesamten DNA aus der Zellaufbereitung. Es spielt für die Ermittlung der Titer also eine Rolle, ob die gesamte infizierte Zelle aufbereitet wird, oder nur deren Zellkerne.

4.5.3 Vergleich der Titer aus Photometrie, TCID, DNA- und nukleärer DNA Präparation

Es wurden nun die durch verschiedene Methoden ermittelten Titer miteinander verglichen. Die höchsten Titer wurden durch eine photometrische Messung der viralen Stocklösung ermittelt. Hierbei wurde anhand der oben bereits erwähnten Plasmidstandardkurve die Absorption (bei 260nm) der Virenpräparationen und der daraus resultierende „physikalischen“ Titer ermittelt. Hier ergaben die Messungen einen physikalischen Titer für Ad-P_{-600ap}hLDLR von 10^{10} Viren pro μl . Für Ad-RSV hLDLR lag der ermittelte physikalische Titer bei $1,8 \cdot 10^9$ Viren pro μl .

Die TCID-Titerbestimmung ergab $1,585 \cdot 10^9$ Viren pro μl für Ad-P_{-600ap}hLDLR und $3,162 \cdot 10^8$ Viren pro μl für Ad-RSV hLDLR. Die mit der TCID Methode ermittelten Werte liegen somit bei Ad-P_{-600ap}hLDLR um den Faktor 6,31 und bei Ad-RSV hLDLR um den Faktor 5,7 niedriger als bei der Messung des „physikalischen“ Titers.

Bei der nukleären DNA Aufbereitung und der nachfolgenden Ermittlung des Titers mittels Real-Time PCR wurde für Ad-P_{-600ap}hLDLR ein Titer von $1,89 \cdot 10^8$ Viren pro μl gemessen. Für Ad-RSV hLDLR wurde ein Titer von $3,21 \cdot 10^7$ Viren pro μl ermittelt. Für Ad-P_{-600ap}hLDLR bedeutet dies einen Faktor von 52,9 kleiner als der physikalische Titer und einen Faktor von 8,39 kleiner als der TCID-Titer. Der Ad-RSV hLDLR Titer der nukleären DNA Aufbereitung liegt um den Faktor 56,07 niedriger als der physikalische Titer und um den Faktor 9,84 niedriger als der Titer der TCID Methode.

Der niedrigste ermittelte Titer liegt in der DNA Präparation der infizierten Zellen mit anschließender Messung mittels Real-Time PCR. Der Titer von Ad-P_{-600ap}hLDLR liegt bei $9,2 \cdot 10^7$ Viren pro μl und der Titer von Ad-RSV hLDLR liegt bei $1,5 \cdot 10^7$ Viren pro μl . Damit ergibt sich für Ad-P_{-600ap}hLDLR ein Faktor von 108,7 Fach niedriger als der physikalische Titer, 17,2 Fach niedriger als der TCID Titer und 2,05 Fach niedriger als der Titer der nukleären DNA Aufbereitung. Für Ad-RSV hLDLR liegt der ermittelte Titer um den Faktor 120 Fach niedriger als der physikalische Titer, er liegt weiterhin um den Faktor 21,07 Fach niedriger als der durch TCID Methode ermittelte Titer. Gegenüber der nukleären DNA Aufbereitung liegt der Titer der DNA Aufbereitung um den Faktor 2,14 niedriger.

In der nachfolgenden Tabelle sind die ermittelten Titer der jeweiligen Methoden noch einmal zur besseren Übersicht zusammengestellt.

	Ad-P _{600ap} hLDLR	Ad-RSV hLDLR
Physikalischer Titer	$1 \cdot 10^{10}$	$1,8 \cdot 10^9$
TCID Titer	$1,59 \cdot 10^9$	$3,16 \cdot 10^8$
Nukleäre DNA in Real-Time PCR	$1,89 \cdot 10^8$	$3,21 \cdot 10^7$
Gesamte DNA in Real-Time PCR	$9,2 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$

Angaben der Titer in Viren / μ l

Tabelle 1 Tabellarische Auflistung der ermittelten viralen Titer bei verschiedenen Titrationmethoden aber jeweils gleicher Virenpräparation.

4.5.4 Visueller Nachweis der Adenoviren

Um eine zelluläre Infektion zu visualisieren, wurde der Ad-CMV EGFP Vektor kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3TM markiert. Nach Infektion von Huh 7 Zellen mit dem markierten Virus wurden Bilder unter dem konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 510 und der Software Zeiss LSM Image Browser[®] Version 3.1.0.99) aufgenommen. Hierbei wurden verschiedene Zeitpunkte nach Infektion untersucht. Die Zielzelle produziert nach erfolgreicher Infektion mit dem Ad-CMV EGFP Vektor das grün fluoreszierende Protein (GFP). Somit ist im konfokalen Mikroskop eine Infektionskontrolle möglich.

In Abbildung 17 sind Huh7 Zellen 30 min nach Infektion mit Cy3TM markierten Ad-CMV EGFP Vektor mit einer MOI 100 (nach TCID Titer) dargestellt.

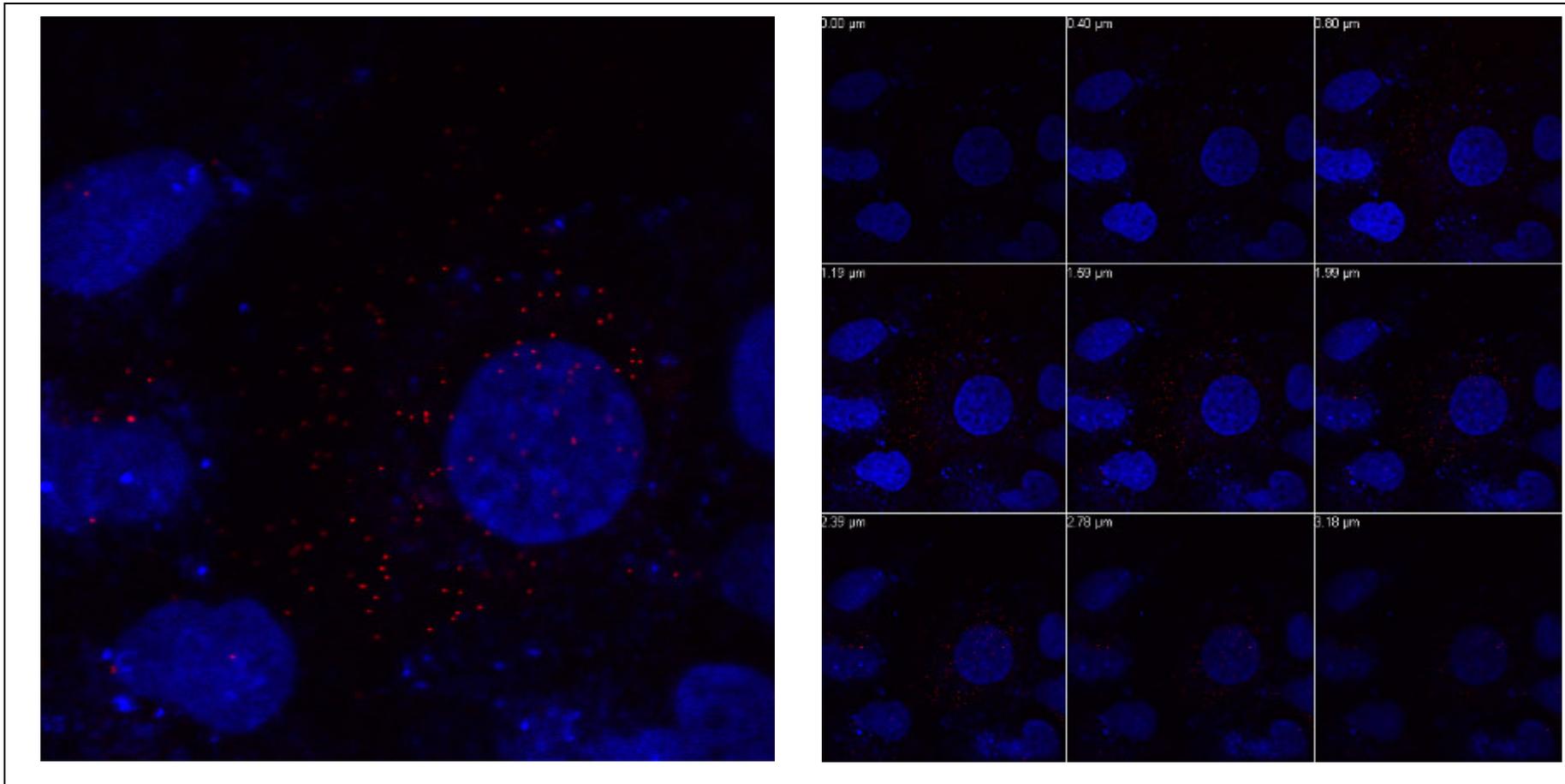


Abbildung 17 Darstellung mit Cy3TM markierter Ad-CMV EGFP Vektor mit infizierten Huh7 Zellen in der konvokalen Mikroskopie.

Linke Seite: DAPI angefärbte Zellkerne von Huh7 Zellen mit deutlich Cy3TM markierten Viren.

Rechte Seite: Schnitte durch das mikroskopische Bild mit Angabe der Schnitthöhe ausgehend vom Ausgangsbild der konvokalen Mikroskopie mit Angabe der Schnitttiefe. Die Lage der markierten Viren lässt auf eine Anlagerung an die Zellmembran bzw. Kernmembran schließen.

Methode: Huh7 Zellen, mit MOI 100 und Cy3TM markiertem Ad-CMV EGFP für 30 min infiziert. DAPI Zellkernfärbung. Bild: Konfokales Mikroskop der Firma Zeiss[®] mit der Typenbezeichnung LSM 510 und der Software Zeiss LSM Image Browser[®] Version 3.1.0. Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil, Scan Zoom 1,7.

Deutlich sind die markierten Viren erkennbar. In der Schnittebene 3,58 μm kann man eine Penetration der Viren in Richtung Zellkern vermuten. In den oberen Schichten handelt es sich vermutlich um Anlagerungen von Viren an die Zellmembran.

Abbildung 18 zeigt den gleichen Versuchsansatz nach 20 Stunden Inkubation mit dem Cy3TM markierten Ad-CMV EGFP Virus. Eine Expression des grün fluoreszierenden Proteins zeigt eine erfolgreiche Infektion der Zielzellen mit dem Vektor Ad-CMV EGFP an. Die kovalente Modifikation der Viruskapside durch die Markierung mit Cy3TM blockiert demzufolge den Prozess der Anlagerung und Aufnahme nicht. Die Funktion der markierten Viren bleibt erhalten.

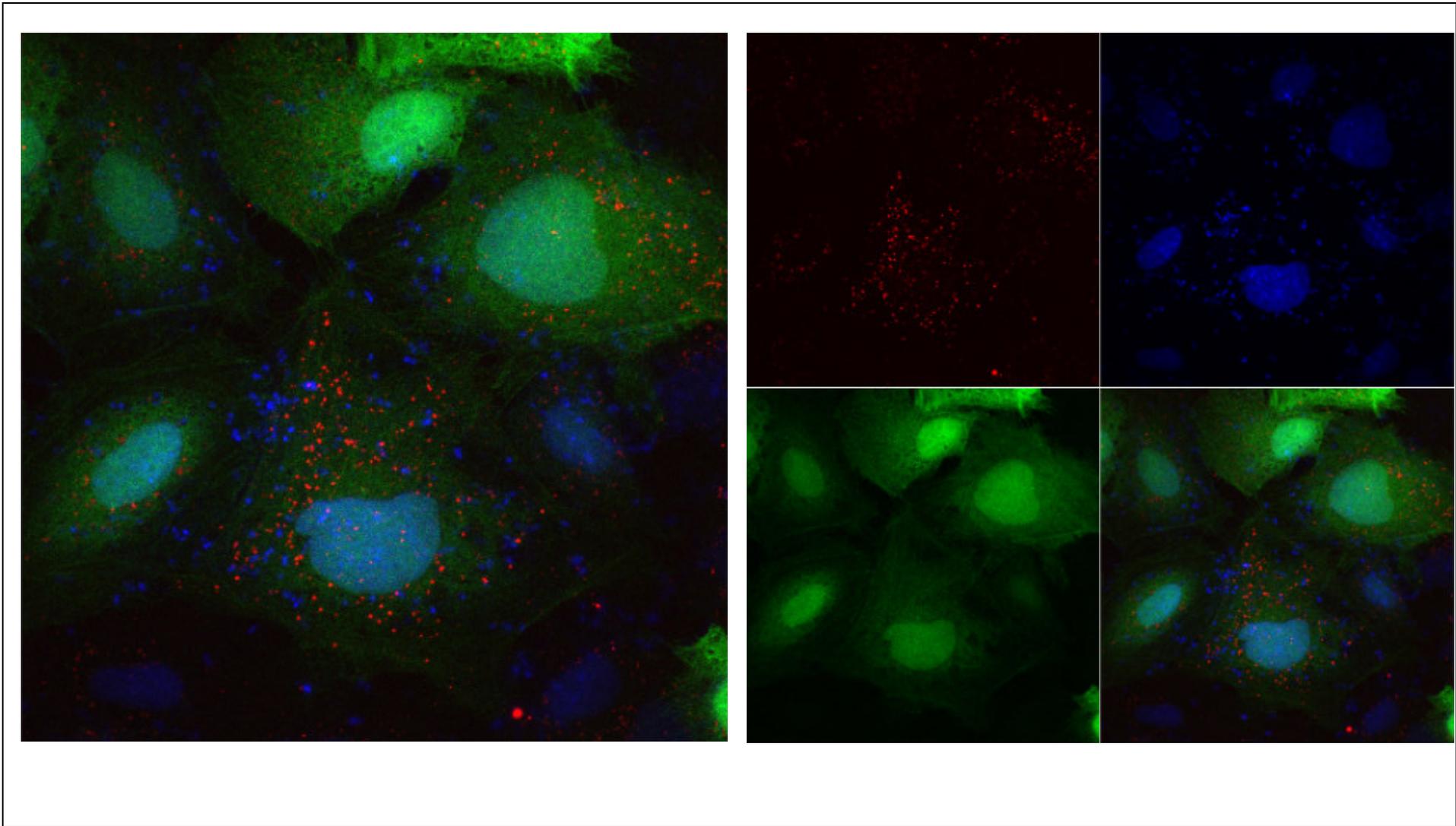


Abbildung 18 Darstellung der erfolgreichen Infektion mit Cy3TM markierten Ad-CMV EGFP Vektoren.

DAPI angefärbte Zellkerne von Huh7 Zellen mit deutlich Cy3TM markierten Viren und GFP produzierenden Zellen. Rechte Seite Darstellung Farbkanäle: Rot = Cy3TM-markierte Viren, Blau = DAPI-Färbung der Zellkerne, Grün = produziertes GFP. Die Lage der markierten Viren lässt auf eine Anlagerung an die Kernmembran schließen. Die GFP produzierenden Zellen zeigen eindeutig eine Infektion trotz Markierung der Viren

Methode: Huh7 Zellen, mit MOI 100 und Cy3TM markiertem Ad-CMV EGFP nach 20 h. DAPI Zellkernfärbung. Bild: Konfokales Mikroskop der Firma Zeiss[®] mit der Typenbezeichnung LSM 510 und der Software Zeiss LSM Image Browser[®] Version 3.1.0. Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil, Scan Zoom 1,0.

Deutlich ist hier die Expression des grün fluoreszierenden Proteins erkennbar, wenngleich am unteren Bildrand auch Zellen zu erkennen sind, die kein GFP produzieren. Deutlich sind immer noch Cy3TM fluoreszierende Partikel erkennbar, die sich besonders um den Zellkern der im Bild zentral gelegenen Zelle anordnen.

Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Huh7 Zellen die nach 20 Stunden keine Veränderung zeigten, wie in Abbildung 19 zu sehen ist.

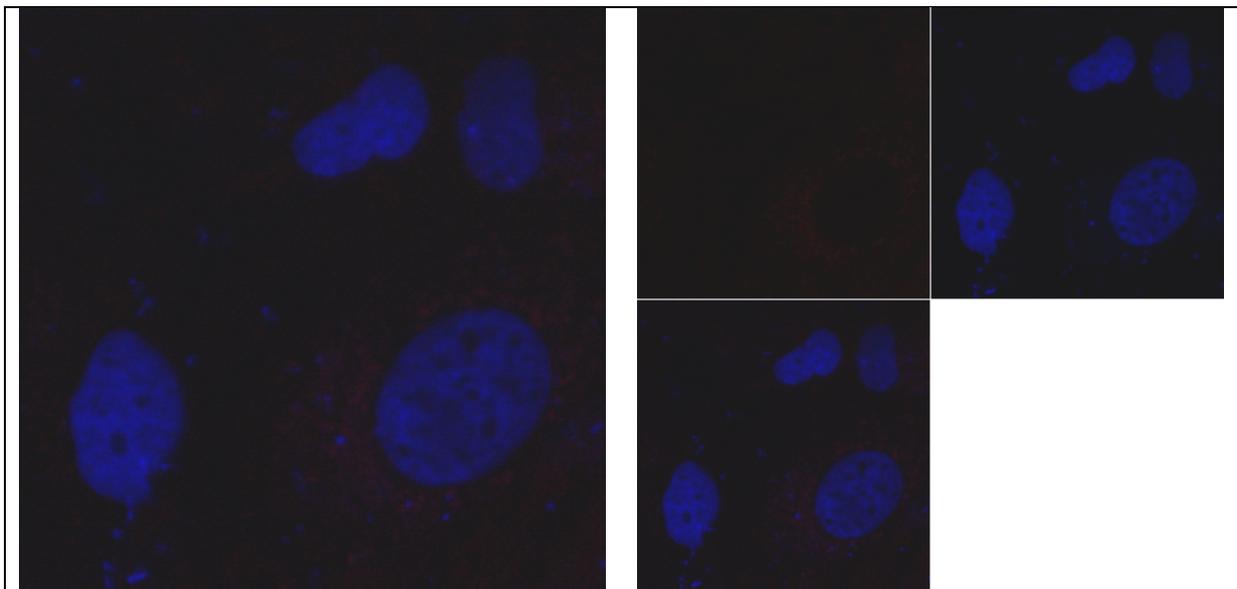


Abbildung 19 Darstellung der Negativkontrolle. Bei Infektion mit Cy3TM markierten Ad-CMV EGFP Vektoren.

DAPI angefärbte Zellkerne von Huh7 Zellen Schnitte durch das mikroskopische Bild mit Angabe der Schnitthöhe ausgehend vom Ausgangsbild der konfokalen Mikroskopie.

Methode: Huh7 Zellen, nach 20 h. DAPI Zellkernfärbung. Bild: Konfokales Mikroskop der Firma Zeiss[®] mit der Typenbezeichnung LSM 510 und der Software Zeiss LSM Image Browser[®] Version 3.1.0. Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil, Scan Zoom 2,0.

36 Stunden nach Infektion ist in Abbildung 20 eine deutliche Produktion von GFP in den Zellen erkennbar. Erstaunlicherweise sind zellkernnah viele Cy3TM fluoreszierende Partikel sichtbar. Ob es sich hier um vollständige markierte Viren handelt, oder nur um die viralen Hüllproteine, die zellkernnah zurückgeblieben sind, ist alleinig mit dieser verwendeten Methodik noch nicht eindeutig zu klären. Die Zusammenschau der nukleären DNA-Aufbereitung und Messung des Titers mittels Real-Time PCR deutet darauf hin, dass es sich größtenteils um aufgenommene Viren handeln muss.

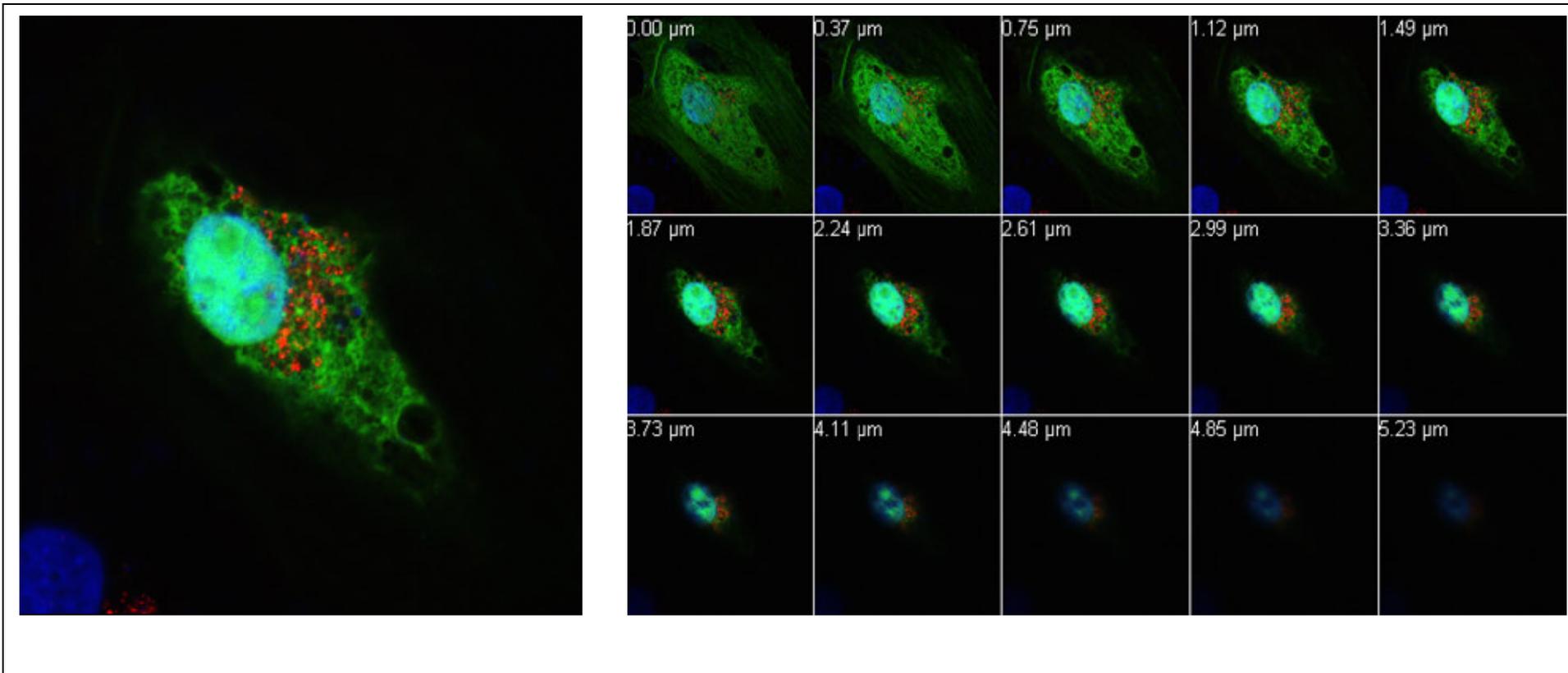


Abbildung 20 Darstellung einer Huh7 Zelle mit Cy3TM markierter Ad-CMV EGFP Infektion nach 36 h.

Linke Seite: DAPI angefärbter Zellkerne von Huh7 Zellen mit deutlich Cy3TM markierten Viren und GFP Produktion.

Rechte Seite: Schnitte durch das mikroskopische Bild mit Angabe der Schnitthöhe ausgehend vom Ausgangsbild der konvokalen Mikroskopie mit Angabe der Schnitttiefe. Anlagerung der markierten Viren um die Kernmembran.

Methode: Huh7 Zellen, mit MOI 100 und Cy3TM markiertem Ad-CMV EGFP für 36 h infiziert. DAPI Zellkernfärbung. Bild: Konfokales Mikroskop der Firma Zeiss[®] mit der Typenbezeichnung LSM 510 und der Software Zeiss LSM Image Browser[®] Version 3.1.0. Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil, Scan Zoom 2,2.

4.5.5 Nachweis der Größenverteilung Fluoreszenz markierter Viren mittels dynamischer Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering)

Unterschiede von viralen Titern könnten auch durch Bildung von Aggregaten bzw. Konglomeraten erklärt sein. In der CPE Titerbestimmung oder im Plaque Assay würden mehrere zusammenhängende Viren nur zu einer infizierten Zelle führen und den ermittelten Titer zu gering erscheinen lassen. Ebenfalls sollte die Funktionalität der Viren durch das Markieren mit Cy3TM nicht beeinflusst werden. Durch Konglomerate und durch die damit verbundene erhebliche Größenzunahme könnte es zu Schwierigkeiten bei der Anhaftung an den Car-Rezeptor der Zelle kommen. Die Aufnahme in die Zielzelle oder der Transfer der viralen DNA in den Zellkern könnte dadurch behindert werden. Um diese Möglichkeit auszuschließen galt es zu zeigen, wie die Größenverteilung der mit Cy3TM markierten Viren aussah. Dies geschah durch die Methode des Dynamic Light Scattering. Die Theorie des Dynamic Light Scattering ist im Kapitel Methoden unter 3.1.12 beschrieben. Eine Darstellung der ermittelten hydrodynamischen Durchmesser der verwendeten markierten Viren findet sich in Abbildung 21 auf der folgenden Seite.

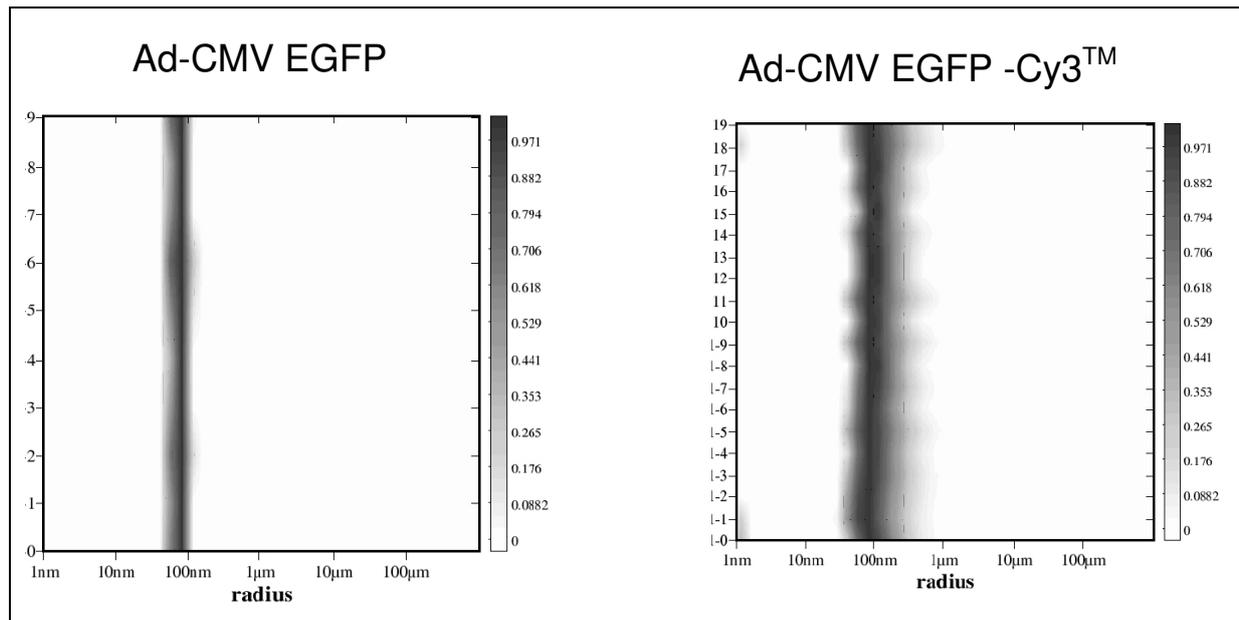


Abbildung 21 Auswertung der Messungen von markierten Viren mittels Dynamic Light Scattering.

Die beiden Abbildungen zeigt sich die graphische Darstellung der gemessenen hydrodynamischen Durchmesser der Viren. Rechter grauer Balken verdeutlicht durch die Grauschattierungen das Messergebnis wobei 1 die deutlichsten Signale darstellt.

Linke Seite: Messung von nicht markierten Ad-CMV EGFP Viren. Durchgehende Bande bei einer Größe von ca. 90 nm, genau der Virengröße entsprechend. (10 Messungen dargestellt)

Rechte Seite: Messung von Cy3TM markiertem Ad-CMV EGFP. Es zeigt sich eine etwas größere Varianz der Einzelmessungen, erkennbar an der etwas breiteren Bande. Dennoch dunkelste Bande bei ca 90 nm und damit Ausschluß von Konglomeraten. Es handelt sich um einzeln markierte Viren. (20 Messungen)

Methode: Messung von nicht markierten und markierten Ad-CMV EGFP im Laser-Spectroscatter, 201RiNA GmbH Netzwerk, RNA-Technologien

Die Messung mittels Dynamic Light Scattering verdeutlicht, dass die nicht markierten Viren ein einheitliches Band nahe der 100 nm Linie zeigen und damit dem hydrodynamischen Durchmesser des Adenovirus von circa 88 nm entsprechen. Abbildung 21 rechte Seite zeigt den Cy3TM markierten Virus. Die Bande ist hier diffuser, allerdings sind die Mittelwerte (angezeigt durch die dunklere Färbung) weiterhin im Bereich kurz vor 100nm, was eine Zusammenlagerung von Viren durch das Markieren mit Cy3TM ausschließt. Eine Verteilung in der Mehrfachanheftung von Cy3TM Molekülen an einzelne Viren ist somit ausgeschlossen.

Der Nachweis, dass das Markieren erfolgreich durchgeführt wurde, ist aus der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung nach Infektion von Zellen zu ziehen, wobei sich das assoziierte Fluoreszenzsignal „virentypisch“ erst an die Zellmembran anlagert und dann Richtung Nukleus wandert. Die fluoreszierenden Partikel verbleiben am Zellkernrand. Dies entspricht dem Infektionsmechanismus des Adenovirus, der seine DNA in den Zellkern einschleust und das Kapsid an der Kernhülle zurücklässt. Das markierte Kapsid muss somit auch an der Kernhülle verbleiben und dort seine Fluoreszenz abgeben, während die virale DNA in den Nukleus geschleust wird, was hier nicht verfolgt werden konnte.

4.5.6 Real-Time PCR ist wichtiger Qualitätsfaktor einer Virenpräparation

In den vorigen Experimenten wird klar, dass eine standardisierte Messmethode zur Titerbestimmung von Viren benötigt wird. Um möglichst nahe am realen Geschehen bezüglich der Infektiosität von Viren zu sein bietet sich die Methode der Titerbestimmung mittels Real-Time PCR an. Sie bietet die Möglichkeit schnell, quantitativ und reproduzierbar zu sein. Wenn in der Aufbereitung der Proben die nukleäre DNA Aufreinigung integriert wird, erhält man einen Titer, der dem biologisch wirksamen Titer am ehesten entspricht. Es lässt sich eine Aussage treffen inwiefern die präparierten Virenstocks auch im Zellsystem eingreifen und zur Expression ihrer Inserts fähig sind. Somit ist eine Methode entwickelt, die nicht nur Auskunft über die Anzahl der Viren oder deren Partikel gibt, sondern darüber hinaus eine Aussage über die Wirksamkeit im eingesetzten System gibt. In Zusammenschau mit dem physikalischen Titer (z.B. durch photometrische Messung) erhält man ferner eine Auskunft über die Qualität der Virenpräparation. Ein wichtiger Hinweis, wenn man beabsichtigt in komplexere Zellsysteme, Tierversuche oder sogar am Menschen zu arbeiten. Hier spielen zunehmend auch immunmodulatorische Mechanismen in der organismuseigenen Abwehr eine Rolle. Eine schlechte Virenpräparation würde somit eine Abwehrreaktion aufgrund von multiplen Haptenen, bestehend aus viralen Bestandteilen, hervorrufen. Dies kann bei guter Präparation der Viren mit einem kleinen Quotienten aus physikalischen Titer und Real-Time PCR gemessenen Titer vermieden oder zumindest reduziert werden. Die Messung mittels Real-Time PCR stellt somit einen wichtigen Qualitätsfaktor einer Virenpräparation dar.

4.6. Testung der Funktionalität von Ad-P_{600ap}hLDLR in der LDLR defizienten

Maus mit dem aus der quantitativen Real-Time PCR ermittelten Titer

Unter Verwendung des durch die quantitative Real-Time PCR der nukleären Aufbereitung ermittelten Titers wurde das virale Konstrukt Ad-P_{600ap}hLDLR in vivo getestet. In einem Pilotexperiment wurden drei für den LDL-Rezeptor homozygot defizienten Mäusen eine Virenmenge von 5×10^9 Viren/Tier verabreicht. Vor Beginn der Injektion wurde jeweils Blut der Mäuse gewonnen. Aus dem gewonnenen Serum wurde mittels FPLC ein Gradient der

Serumlipide gewonnen (siehe Kapitel Material und Methoden). Sechs Tage nach der Infektion wurde den Mäusen wiederum Blut entnommen, das Serum aufbereitet und mittels FPLC analysiert. Zum Zeitpunkt der Blutentnahmen waren die Mäuse jeweils nüchtern. Die folgende Graphik zeigt den Verlauf der Gradienten vor und nach der Infektion (gemittelte Werte aus $n=3$). Es ist zu sehen, dass nach sechs Tagen die Serumlipide dieser Mäuse gesunken sind. Das Serum LDL fiel von 10 mg/dl auf 6 mg/dl und das Serum HDL fiel von ebenfalls 10 mg/dl auf 7 mg/dl.

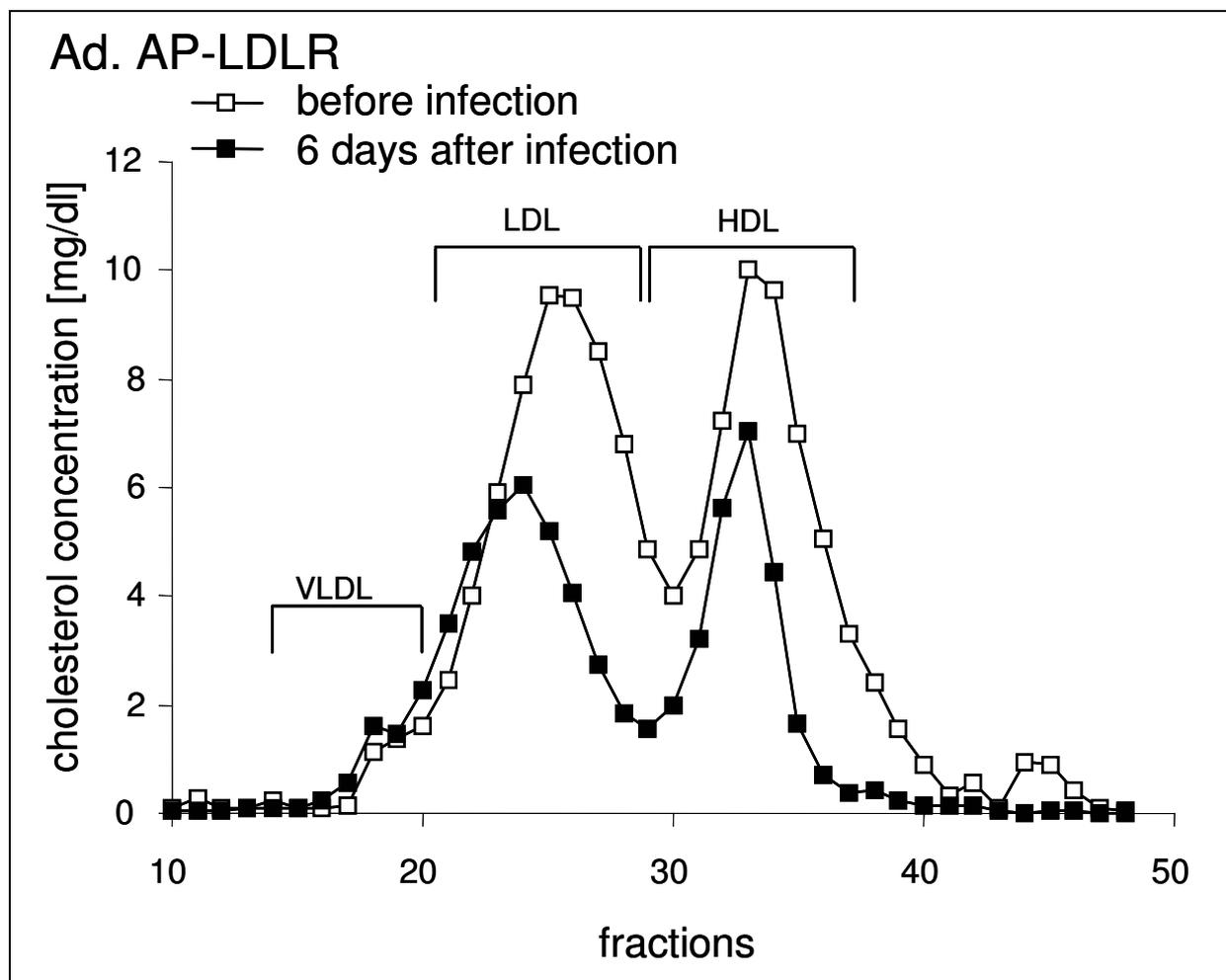


Abbildung 26 Fast Performance Liquid Chromatography dreier LDLR defizienten Mäuse vor / und nach Infektion mit Ad-P_{-600ap}hLDLR Viren.

Infektion von drei LDLR defizienten Mäusen mit Ad-P_{-600ap}hLDLR, 5×10^9 Viren/Tier. Deutliche Reduktion der Peaks von LDL und HDL 6 Tage nach Infektion. Dargestellt sind die gemittelten Werte der drei Tiere.

Methode: LDLR defiziente Mäuse mit Ad-P_{-600ap}hLDLR, 5×10^9 Viren/Tier. Sechs Tage cholesterinreiches Futter. Serumentnahme durch Schwanzvene vor und sechs Tage nach Infektion. FPLC des Serums und Analyse der Fraktionen durch Cholesterinreagenz (Chol R1 Roche/Hitachi Roche Diagnostics GmbH) im Elisa-Reader (MRX Microplate reader Dynatech Laboratories™).

5. Diskussion

5.1. Fragen des gentherapeutischen Einsatzes des Vektors Ad-P_{-600ap}hLDLR.

Die Hauptfrage, die innerhalb dieser Arbeit geklärt werden sollte, ist die mögliche gentherapeutische Verwendung eines neuen adenoviralen Vektors. Das Vektorkonstrukt soll durch seine cholesterinregulierte LDL-Rezeptor Expression mittels humanen Promoters für die Behandlung der homozygoten familiären Hypercholesterinämie getestet werden. Dieser soll nach erfolgreichem Gentransfer seine Expressionstärke an das im Serum befindliche Cholesterin anpassen und die Zelle vor Überladung und Kristallbildung schützen. Frühere publizierte gentherapeutische Ansätze zeigten, dass ein viraler Transfer von LDL-Rezeptor produzierender DNA in den Zellkern möglich ist (83. Herz et Gerard 1992 sowie siehe Einleitung), allerdings ergaben sich dabei Schwierigkeiten in der Stabilität und der daraus resultierenden Expressionstärke. Nelson et Kay zeigten, dass die Effizienz abhängig ist vom verwendeten Vektorkonstrukt und der infizierten Zelllinie (80. Nelson et Kay 1997) und Korrelation der Titer und Wirksamkeit von Vektoren Harui et al. zeigten, dass die zeitliche Stabilität der Vektorexpression ebenfalls von der Wahl der Zelllinie abhängig ist (81. Harui et al. 1999). In unserer Arbeitsgruppe wurde der Versuch, LDL-Rezeptoren in menschlichen Zelllinien mittels Gentransfer zu exprimieren schon mehrfach erfolgreich durchgeführt, allerdings stellten sich dabei auch nicht gewünschte Effekte ein. Heeren et al. zeigten, dass virale konstitutive Promotoren (z.B. des Rous sarcoma Virus und Cytomegalievirus) zu einer Kumulation von Cholesterin und folgender Auskristallisierung in der Zelle führt (82. Heeren et al. 1999). Um diese Kumulation zu vermeiden, wurde für dieses Projekt von Frank Schnieders ein Vektor konstruiert, der ein Fragment des humanen LDL-Rezeptorpromoters mit allen bekannten Steuerelementen zur Regulation durch zelluläres Cholesterin enthält. Zur Prüfung dieses Konstruktes *in vitro* wurden hier humane Hepatomazellen (Huh7) zur Infektion benutzt. Um die Regulation in Abhängigkeit vom verfügbaren Cholesterin zu überprüfen, wurde ein Fütterungsexperiment mit und ohne 25-Hydroxycholesterin entwickelt und anhand des LDL-Rezeptorproteins im Western-blot dargestellt. Als Kontrolle wird diese Zelllinie mit einem Vektor infiziert, der das Grün-fluoreszierende Protein exprimiert, das und auf die LDL-Rezeptorproduktion keinen Einfluss nimmt. Das Ergebnis des Westernblottes zeigte

die angestrebte Herunterregulation der LDL-Rezeptoren in dem mit Ad-P_{-600ap}hLDLR infizierten Zellen unter Fütterung im Vergleich zum Referenzsystem. Die Expression war jedoch nur geringfügig höher als nach Infektion mit dem Kontrollvirus und erreichte nicht das Niveau des unregulierten RSV-Promoters. Zur weiteren Illustration der Expressionsstärke wurde eine immunhistochemische Anfärbung der LDL-Rezeptoren in der Zellkultur unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt, die dieses Ergebnis unterstreicht. Allerdings ist auch hier keine Quantifizierung der Überexpression möglich. Aufgrund des hier beobachteten Expressionsniveaus ergibt sich folgende Frage:

5.2. Faktoren, die die Expressionshöhe von Ad-P_{-600ap}hLDLR bestimmen.

Welche Parameter bestimmen die Expressionshöhe eines Vektors im verwendeten Zellkulturexperiment? Um eine einheitliche Basis zur Vergleichbarkeit zu schaffen, müssen die Parameter Zellsystem (81 Harui et al. 1999), Virenpräparation (84. Park et al. 2004), Lagerung (85. Ugai et al. 2002) und Versuchsbedingungen einheitlich gestaltet sein. Diese wurden wie in Material und Methoden beschrieben weitestgehend konstant gehalten. Gibt es außer diesen Bedingungen noch weitere Faktoren, die eine Genauigkeit der Messungen beeinflussen können? In weiteren Überlegungen und in Rückschau auf den initialen, in dieser Arbeit durchgeführten Western-Blot, stellte sich die Frage nach der Genauigkeit der Quantifikation von Viruspräparationen. Die Ungenauigkeit der bei der Titerbestimmung verwendeten Methode geht als Fehler in die genannten Infektions-/Expressionsversuche mit ein. Eine der am häufigsten eingesetzten Methoden zur Titerbestimmung stellt die Messung der Plaque forming units (Pfu) dar. Die Standardabweichung einzelner Messungen konnte in der Untersuchung von Bewig und Schmidt mit 1×10^9 bezogen auf den bestimmten Titer von $3,6 \times 10^9$ angegeben werden (47. Bewig et Schmidt 2000). In dieser Arbeit wurde für eine weitere Methode, dem Spotassay eine Standardabweichung von $3,9 \times 10^8$ bei einem bestimmten Titer von $3,3 \times 10^9$ ermittelt. Für die Methode der Pfu-Bestimmung bedeutet dies einen relativen Variationskoeffizienten von fast 10 Prozent. Eine weitere Methode stellt die Messung der Tissue Culture Infectious Dose (TCID) dar, die auch als Vergleichsgrundlage in den meisten Experimenten dieser Arbeit herangezogen wurde (86. LaBarre and Lowy 2001). In unserem Protokoll sind acht- bis zehnfache Bestimmungen in einer Titerplatte üblich,

aus denen sich eine Variationsbreite von ca. 1 – 2 Größenordnungen zwischen den Einzelbestimmungen ablesen lassen. Beim Vergleich der Titerbestimmungen zweier unabhängiger Viruspräparationen, wie hier zwischen RSV- und P_{-600ap}hLDLR-Vektoren ist eine Bestimmung des Expressionsniveaus sehr ungenau und damit nur wenig aussagekräftig und machen einen Vergleich der Expressionshöhen zweier Vektoren unmöglich. Eine Möglichkeit um dieses Problem zu umgehen ist die Entwicklung einer neuen quantifizierenden Messmethode von viralen Titern.

5.3. Lösungswege zur Bestimmung eines viralen Titters zum Vergleich von Vektoren. Die Methode der quantitativen Real-Time PCR (qPCR).

Als Methode mit potenziell geringerer Varianz zwischen den Einzelmessungen und damit höherer Genauigkeit zur Bestimmung der Virustiter bietet sich die Real-Time PCR an. Da das zu infizierende Zellsystem, zur Konstanz der Versuchsbedingungen festgelegt sein muss (81. Harui et al. 1999), wurden Huh 7 Zellen als Bezugssystem ausgewählt. Diese stellen aufgrund ihres Ursprungs aus Leberzellen und der LDL-Rezeptordichte ein geeignetes Zellsystem dar. Zur weiteren Vorbereitung der quantitativen Real-Time PCR wurden Primer entwickelt, die Genabschnitte des viralen Kapsidproteins Hexon in der DNA des Adenovirus erfassen. Diese wurden somit als Hexon-Primer bezeichnet. 2005 wurde von Banik et al. eine ähnliche Methodik entwickelt, um pathogene Adenoviren im Augensekret nachzuweisen (87. Banik et al. 2005). Zur genauen Quantifikation wurde ein Plasmid mit dem oben genannten DNA Abschnitt hergestellt. Aus diesem Plasmid wurde eine Standardreihe erstellt, die in den späteren Real-Time PCR Experimenten als Referenz dient. Erstmals wurde diese Technik 1999 von Sanburn and Cornetta beschrieben (88. Sanburn and Cornetta 1999). 2001 folgte eine weitere Beschreibung von Ma et al. und 2003 zeigte Gu et al. die Möglichkeit mit der Multiplex Technik in Patientenserum nicht nur quantitativ sondern auch selektiv verschiedene Serotypen der Adenoviren zu bestimmen (89 Ma et al. 2001 und 90. Gu et al. 2003). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Titer der Virenpräparationen mit der Real-Time PCR gemessen. Die durch Real-Time PCR ermittelten Titer lagen zwischen dem 21fachen (Ad-RSV hLDLR) und 17fachen (Ad-P_{-600ap}hLDLR) niedriger als die mit der TCID Methode festgestellten. Auch in wiederholten Messungen, wobei die Einzelwerte in Dreifachmessungen gemessen

wurden, zeigte sich diese Tendenz. Dass verschiedene Methoden zur Ermittlung des Titers von Viren verschiedene Ergebnisse liefern können, zeigten Mittereder et al. bereits 1996, indem sie die durch Plaque Assay ermittelten Titer mit denen durch Gentransfer ermittelten verglichen und signifikante Unterschiede (bis zu einem Faktor von >100) feststellten (91. Mittereder et al 1996).

Eine detaillierte statistische Auswertung konnte im zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit nicht erhoben werden, dennoch lässt sich vermuten, dass die in den initialen Experimenten eingesetzte Virenmenge an Ad-P-_{600ap}hLDLR niedriger war als bei Ad-RSV hLDLR und damit die schwache Expression erklärbar wäre.

5.4 Nachweis infektiöser Viren via Real-Time PCR

Eine weitere Frage war, ob der per Real Time PCR gemessene Titer wirklich die infektiösen Viren erfasst, da die PCR auf der Basis von Gesamtzell-DNA auch solche DNA erfasst, die von assoziierten Viruspartikeln stammt, die nicht in die Zelle eingedrungen sind. Da die adenovirale DNA im Zellkern transkribiert wird, sollten nur die nukleären DNAs für die Bestimmung eines Titers infektiöser Viren herangezogen werden. Dies sollte auf der Basis der nach Infektion von Huh7 Zellen extrahierten viralen DNA im Zellkern erfolgen, um damit sicherzustellen, dass nur die infektiösen Anteile der Viren gemessen werden. In der Theorie der Infektion von Adenoviren und deren Einschleusung der viralen DNA Bestandteile in den Zellkern spielen eine Vielzahl von Voraussetzungen eine Rolle. Nach Herauswaschen der nicht infizierenden „freien“ Viren wird nur noch der infektiöse und damit intakte Anteil an Viren gemessen, sofern dieser Waschvorgang quantitativ verläuft.

Untersuchungen zum Infektionsweg und der Einschleusung der viralen DNA wurden unter anderem von Matthias et al. 1994, Suomalainen et al. 1999 und 2001 und Varghese et al. 2004 durchgeführt (92. Matthias et al. 1994, 93. und 94. Suomalainen et al. 1999 und 2001, 95. Varghese et al. 2004). Um den Infektionsweg der Viren in den Experimenten dieser Arbeit auch zu visualisieren und damit deutlich zu machen, dass die in der Real-Time PCR gemessenen Anteile auch der infektiösen Virenanzahl entsprechen, bzw. der

Waschvorgang erfolgreicher war, wurden die Viren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3TM markiert. In diesem Experiment sah man deutlich die Anlagerung von Fluoreszenz markierten viralen Bestandteilen an der Kernhülle. Hierbei handelt es sich um die zurückgebliebenen viralen Hüllproteine, die bei dem Eintritt in den Kern an dessen Membran verbleiben. Die Arbeitsgruppe um Glotzer konnte 2001 zeigen, dass markierte virale DNA in den Kern wandert, wobei die Bewegung in den Zellkern im Gegensatz zu dem Transport der kompletten Viren im Zytosol scheinbar nicht vom mikrotubulären System abhängig ist (96. Glotzer et al. 2001). Einen ähnlichen Ansatz zur Quantifizierung von Viren zeigte Nakano und Greber 2000 (101. Nakano und Greber 2000) durch Auszählen der fluoreszenzmarkierten intrazellulären Viren.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den markierten Viren um Einzelpartikel und nicht um Viruskomplexe handelt, wurden unmarkierte und markierte Viren mit Hilfe der Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) in ihrem Durchmesser verglichen. Die durchgeführte Untersuchung zeigte nur einen Durchmesser von ca. 80 nm, der dem singulärer Viren entspricht und eine Komplexbildung ausschließt. Untersuchungen zu dieser Frage bezüglich der Virengröße finden sich bei Bondoc et Fitzpatrick 1998 mit Hilfe der Größenauftrennung durch Zentrifugation (100. Bondoc et Fitzpatrick 1998).

Die konfokale mikroskopische Darstellung der fluoreszenz-markierten Viren zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion zeigt in unseren Experimenten eine Anreicherung von markierten viralen Anteilen an der Kernmembran infizierter Zellen. Da sich aber mehrere markierte Viren an der Kernmembran befinden gehen diese in die Quantifikation des infektiösen Titers mit ein. Da aber der größte Teil eben nicht infektiös ist sollte eine Methode entwickelt werden, diese Viren nicht in die Quantifikation einzubeziehen. Hierzu stellt sich die Frage, ob alle diese Viren auch infektiös sind, dass heißt ihre DNA in den Zellkern verbracht haben. Um dieser Frage Rechnung zu tragen, wurde ein weiterer Aufbereitungsschritt eingeführt. Vor Messung der viralen DNA Anteile wurden die infizierten Zellen einer Zellkernpräparation unterzogen. Damit wurde erreicht, dass nur die viralen DNA-Anteile, die im Zellkern enthalten sind, bei der Titration erfasst werden. Die hier erhaltenen Titer sind um den Faktor 2 höher als die aus der gesamten Zelle ermittelten Titer. Dies begründet sich wahrscheinlich in der Streuung der CT-Werte und damit in der Ungenauigkeit der Methode, allerdings übertrifft diese Genauigkeit bei weitem die Streuung der TCID-Methode. Die gemittelte SD der

Einzelmessungen beträgt 0,16 Zyklen, was einem Faktor von 0,048 entspricht. Die gemessenen Unterschiede zwischen gesamter DNA Aufbereitung und nuklärer DNA Aufbereitung sind somit als relevant zu bezeichnen. Aus dieser Relevanz lässt sich schließen, dass sich offensichtlich die gesamte virale DNA im Zellkern befindet, während die Kapside der Adenoviren ausserhalb des Zellkerns befindet. Unsere mikroskopische Untersuchung fluoreszenzmarkierter Viren würde diese Untersuchung stützen, indem die markierten viralen Anteile (Proteine des Kapsids) nur ausserhalb des Zellkerns zu finden sind.

Unter den Versuchsbedingungen der Experimente dieser Arbeit kann also davon ausgegangen werden, dass eine fast vollständige Aufnahme der viralen DNA in den Zellkern erfolgte. Adenovirale DNA im Zellkern ist per definitionem auch infektiös. Der Titer, der aus der Zellkernaufbereitung ermittelt wurde, repräsentiert somit den infektiösen Titer.

Zum Vergleich wurde noch der physikalische Titer aus der Virenpräparation durch eine Messung der Absorbtion der DNA bei einer OD_{260nm} bestimmt. In den Ergebnissen dieser Arbeit konnten wir analog zu der Arbeit von Ma et al. (89. Ma et al. 2001) eine Korrelation zwischen den mit der Real-Time PCR ermittelten Titer und den physikalischen Titer finden. Dieser lag um ein circa hundertfaches höher. Das Verhältnis zwischen infektiösem Titern und dem physikalischen Virustiter wird gerne als Referenz in Bezug auf die Virenqualität herangezogen. Unsere Versuche zeigen, dass dieses Verhältnis einen variablen Wert darstellt und damit die Infektiösität einer Virenpräparation nicht vollständig beschreiben kann.

5.5 Korrelation der Titer und Wirksamkeit von Vektoren

Welcher der Titer spiegelt nun den wirklichen infektiösen Titer wieder? Die TCID-Methode, wie auch die neu entwickelte Methode der quantitativen Real-Time PCR sollen den infektiösen Titer ermitteln. In der Korrelation dieser beiden Methoden zeigt jeweils der in der quantifizierenden Real-Time PCR ermittelte Titer niedrigere Werte. Differenziert man noch die beiden Methoden der quantifizierenden Real-Time PCR, ergeben sich folgende Faktoren. In der gesamt aufbereiteten DNA findet sich ein circa 20fach niedrigerer Titer und in der Messung der aufbereiteten nukleären DNA des

infizierten Systems findet sich ein circa 10fach niedrigeren Titer. im Vergleich zur TCID Methode. Für eine genaue statistische Korrelation beider Methoden müssten allerdings noch Vergleiche mit einer weit aus höheren Zahl von Titerbestimmungen durchgeführt werden, die im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr zu leisten waren. Die interindividuelle Varianz der Messergebnisse in der quantitativen Real-Time PCR ist bei Erhebung der Einzelmessungen in Triplets sehr gering. Somit ergibt sich natürlich, dass mehrere Bestimmungen des Titers einer Virenpräparation den Wert valider erscheinen lassen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass die quantitative Real-Time PCR eine gute Methode mit geringer Varianz zur Bestimmung eines viralen Titers darstellt. Sie besitzt eine hohe Empfindlichkeit bei schon geringer DNA Menge. Aufgrund der Injektionseffizienz, die spezifisch ist für das zur Titration zur Verfügung stehende Zellsystem, lassen sich nur Titer vergleichen, die in derselben Linie bestimmt wurden. In neueren Untersuchungen zur Verwendung der Real-Time PCR zur Bestimmung von viralen Titern bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit. Zu erwähnen wären hier die Arbeiten von Rohr et al 2002 und El Hassan et al. 2005 (102. Rohr et al. 2002 und 103. El Hassan et al. 2005) Rohr et al. vergleichen Titer anhand von adeno assoziierten Viren durch die Methodik des FACS und der quantitativen Real-Time PCR. Die Quantifizierung erfolgt nach Infektion von Zielzellen durch die Quantifizierung des benutzten viralen Promoters (CMV-Promoter), hierbei wird vorausgesetzt das nach Infektion auch der infektiöse Titer gemessen wurde. Hassan et al. benutzten die Methode der Real-Time PCR, um die Expression in Tumorzellen bestimmen zu können. Hier stellt die Real-Time PCR trotz der Möglichkeit zur Quantifikation, lediglich ein Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Experimenten dar und ist genau genommen nur eine vergleichende Methodik. Die Durchführung dieser Titerungsmethode ist schnell und erfordert nach Anfertigen einer Standardreihe lediglich die Infektionszeit der benutzten Zelllinie und die DNA-Präparation. Im weiteren Verlauf müsste die quantitative Real-Time PCR gegenüber herkömmlichen Titerungsmethoden statistisch abgewogen werden. Wie zum Beispiel Bewig und Schmidt 2000 im Vergleich der Methode des Plaque forming unit und dem Spot Assay zeigte (47. Bewig und Schmidt 2000), oder gegenüber anderen Methoden, wie die der Firma Clontech mit ihrem System des Adeno-X™ Rapid Titer Kits (105. Pdf-Dateien der Firma Clontech zur Handhabung des Adeno-X™ Rapid Titer Kit). Durch die Definition, dass nur die in den Zellkern gelangten viralen DNA Anteile infektiös sind, stellt die Messung der DNA nach Zellkernaufbereitung den Stand einer echten durch den Adenovirus hervorgerufenen Infektion dar (106. Puvion-Dutilleul

et al. 1994). Somit wird postuliert, dass es sich bei dieser Methode um die Ermittlung des infektiösen Titers handelt. Durch die Vorteile der genauen Titerbestimmung mittels der quantitativen Real-Time PCR bietet diese Methode auch Potenzial für Promotervergleiche.

5.6 Betrachtung der Experimente mit dem aus der Real-Time PCR erhaltenen Titer.

Unter Berücksichtigung der nun erhobenen Titer auf Basis der nukleären DNA Aufbereitung sind die Ausgangswerte der beiden im Western Blot eingesetzten und zu vergleichenden Vektoren Ad-P-_{600ap}hLDLR und Ad-RSV hLDLR um circa den Faktor 10 zu niedrig dosiert. Dies bedeutet, dass statt der eingesetzten Infektionsmenge entsprechend einer MOI von 200, lediglich eine MOI von 20 eingesetzt wurde. Diese Infektionsmenge wäre zur vollständigen Bewertung der Promotoren auf Proteinebene nicht vollständig ausreichend. Bei einer MOI von 20 ist davon auszugehen, dass nicht alle Zellen infiziert sind, wie die immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit auch zeigen. Die Bande der mit Ad-P-_{600ap}hLDLR infizierten Zellen zeigt sich nicht deutlich gegenüber dem mit dem Vergleichsvektor Ad-MV EGFP infizierten Zellen. Für den Vektor Ad-RSV hLDLR reicht allerdings diese Infektionsmenge aus um eine deutliche Steigerung der Produktion von LDL-Rezeptorproteine zu erzielen. Bei dem RSV-Promoter handelt es sich um einen unregulierten viralen Promoter des Rous sarcoma Virus mit hoher Potenz, er zeigt deshalb schon bei geringer Infektionsrate hohe Expressionsraten. Der humane Promoter in dem neuen Vektorkonstrukt dagegen müsste höher dosiert werden um die gewünschten adaptiven Effekte zu erzielen. Dies deckt sich mit der Erfahrung, dass Infektionsmengen eingesetzt werden, die einer MOI von 100 bis 200 entsprechen um eine vollständige Infektionsrate der Zielzellen zu gewährleisten und eine entsprechende Expression zu gewährleisten (107. Website der ATCC with Reference Material und 91. Mittereder et al. 1996). Als Conclusio müsste der Vektor Ad-P-_{600ap}hLDLR höher dosiert werden.

5.7 Abschliessende Betrachtungen über die Wirksamkeit des Vektors

Ad-P_{-600ap}hLDLR.

In dem abschließenden Tierexperiment wurde mit dem korrigierten Titer der nukleären DNA Aufbereitung gearbeitet. Die für LDL-Rezeptorprotein homozygot defizienten Mäuse (LDL-Rezeptor knock out Mäuse) wurden mit einer Virenanzahl von 5×10^9 Viren/Tier infiziert. Die Messung der Serumcholesterinwerte erfolgte vor Beginn des Experiments, wobei sich hohe Serumcholesterinwerte der Mäuse zu Beginn des Experimentes zeigten und somit als Ausgangswert dienen, sowie sechs Tage nach Infektion mit dem Vektor Ad-P_{-600ap}hLDLR. Die Mäuse wurden in der Nacht vor dem Experiment nicht gefüttert, so dass die Belastung mit cholesterinreicher Nahrung erst nach der Injektion der Viren stattfand. Die FPLC zeigte nun die erwarteten Werte in Form von sinkenden Cholesterinwerten im den Seren der infizierten Mäuse sechs Tage nach Infektion. Hierbei wird deutlich, dass trotz Belastung mit cholesterinreichem Futter die Serumcholesterinwerte sinken. Es wird ein normalisierter Serumcholesterinpegel erreicht. Dies zeigt, dass der injizierte Vektor seine Funktion in Form von Senkung des Serumcholesterins erreicht. Dies spiegelt die Fähigkeit der infizierten Zellen wieder das Serumcholesterin aufzunehmen, allerdings nur bis zu dem Punkt an dem ein normaler Serumcholesteringehalt erreicht wurde. Dies kann offenbar bei regulierender Wirkung des humanen Promoters entstehen. Das heißt, dass hier in diesem Zeitfenster und beim pathologischen Anfangswert im Serum-Cholesterin im steady-state (also im Mittel, bzw. als Nettoeffekt) ein Serumcholesterindauerhaft herunterreguliert ist, denn sonst lägen die Serumcholesterinwerte nach sechs Tagen weit unterhalb des Normalwertes. Somit zeigt sich eine deutliche Potenz des Vektors für gentherapeutische Anwendung in vivo.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte ein cholesterinregulierter Promoter in einem adenoviralen Vektor für eine gentherapeutische Anwendung der familiären Hypercholesterinämie überprüft werden. Aufgrund der humanen Herkunft des Promoters, sowie der Eigenschaft durch seinen codierenden DNA-Abschnitt LDL-Rezeptoren produzieren zu können, erhielt er den Namen Ad-P_{-600ap}hLDLR. In den Fütterungsexperimenten konnte ein Funktionieren der Regulation gezeigt werden, allerdings war der Effekt nicht so stark ausgeprägt, wie zuerst erhofft. Zur Bestimmung der Virusmenge wurde die allgemein anerkannte TCID-Titerbestimmung durchgeführt. Es stellte sich die Frage, ob die geringe Expression der LDL-Rezeptoren, überprüft durch einen Westernblot, eventuell durch unterschiedlich eingesetzte Virusmengen aufgrund zu großer Schwankungen in der TCID-Titerbestimmung hervorgerufen sein könnten. Um dies zu überprüfen, verglichen wir die Vektoren mittels der quantitativen Real-Time PCR. In der relativen Quantifizierung durch Vergleich angeblich gleicher Infektionsmengen, ergaben sich erhebliche Schwankungen in den Konzentrationen der Virenmengen. Um nun eine genaue Quantifizierung durchführen zu können, wurde auf Basis der Real-Time PCR eine Methode zur Quantifizierung von Adenoviren entworfen. Anhand einer erstellten Standardreihe konnte die quantitative Bestimmung der Virenanzahl erfolgen. Dies erfolgte anhand einer Zellkultur, um den Anteil der Viren zu erfassen, der biologische Wirkung besitzt. Bei der Messung der Titer fielen erhebliche Unterschiede zu der Titerbestimmung mit der TCID-Methode auf. Die ermittelten Virenmengen waren im Durchschnitt geringer. Da die Transkription der infektiösen viralen DNA im Zellkern stattfindet, wurde, um noch näher am biologischen System zu sein, vor der DNA Aufbereitung für die quantitative Real-Time PCR noch eine Zellkernpräparation vorgeschaltet, um den realen infektiösen Teil der Viren erfassen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass die Real-Time PCR ein gutes und genaues Mittel zur Titerbestimmung von Adenoviren darstellt. In dem abschließenden Tierexperiment mit LDL-Rezeptor Knock out Mäusen und korrigiertem Titer, konnte gezeigt werden, dass der neu entwickelte cholesterinregulierte Vektor Ad-P_{-600ap}hLDLR Serumcholesterinsenkende Wirkung besitzt und somit als gentherapeutisch wirksamer Vektor eingesetzt werden könnte.

7. Anhang

DNA Präparation	Virusmenge aus	Huh7 Endzellzahl bei	Eluat	In Real-Time PCR
	Stock in μl	Infektion		eingesetzte Menge des
	$V_{\text{PCR_Template}}$		$V_{\text{total_Eluat}}$	Eluats
				$V_{\text{PCR_Template}}$
Ap3	0,00650347	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
Ap30	0,0650347	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
Ap300	0,650347	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
RSV3	0,03259962	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
RSV30	0,3259962	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
RSV300	3,259962	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl

Tabelle 2

Threshold	ct	Im PCR Lauf ermittelte	Verdünnungs-	Kopien in	Verdünnungs-	Durchschnitt
		Kopienzahl	faktor	100 μl	faktor	
		$V_{\text{copies_from_qPCR}}$	D_1	Eluat	zu 1 μl des Stocks	in 1 μl Stock
					D_2	$T_{\text{viral_Stock}}$
0.023	28.4	$6,141 \cdot 10^2$	1000	614100.0	154.000	$9.46 \cdot 10^7$
0.023	24.91	$6.986 \cdot 10^3$	1000	6986000.0	15.400	$1.08 \cdot 10^8$
0.023	22.17	$4.729 \cdot 10^4$	1000	47290000.0	1.540	$7.28 \cdot 10^7$
0.023	28.61	$5.287 \cdot 10^2$	1000	528700.0	30.700	$1.62 \cdot 10^7$
0.023	25.48	$4.703 \cdot 10^3$	1000	4703000.0	3.070	$1.44 \cdot 10^7$
0.023	22.18	$4.705 \cdot 10^4$	1000	47050000.0	0.307	$1.44 \cdot 10^7$

AP DNA

$9.2 \cdot 10^7$

RSV DNA

$1.5 \cdot 10^7$

Tabelle 3

Nucleus Präparation	Virusmenge aus Stock in μl $V_{\text{PCR_Template}}$	Huh7 Endzellzahl bei	Eluat $V_{\text{total_Eluat}}$	In Real-Time PCR
		Infektion		eingesetzte Menge des Eluats $V_{\text{PCR_Template}}$
Ap3	0,00650347	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
Ap30	0,0650347	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
Ap300	0,650347	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
RSV3	0,03259962	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
RSV30	0,3259962	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl
RSV300	3,259962	$3.43 \cdot 10^6$	100 μl	5 μl

Tabelle 4

Threshold	ct	Im PCR Lauf ermittelte	Dilutionfaktor	Kopien in	Verdünnungsfaktor	in 1 μl Stock	Durchschnitt
		Kopienzahl		100 μl Eluat			
		$V_{\text{copies_from_qPCR}}$	D_1			$T_{\text{viral_Stock}}$	
0.023	27.44	$1.2 \cdot 10^3$	1000	1200000.0	154.000	$1.85 \cdot 10^8$	
0.023	24.06	$1.269 \cdot 10^4$	1000	12690000.0	15.400	$1.95 \cdot 10^8$	
0.023	20.82	$1.208 \cdot 10^5$	1000	120800000.0	1.540	$1.86 \cdot 10^8$	$1.89 \cdot 10^8$
0.023	27.36	$1.267 \cdot 10^3$	1000	1267000.0	30.700	$3.89 \cdot 10^7$	
0.023	24.24	$1.117 \cdot 10^4$	1000	11170000.0	3.070	$3.43 \cdot 10^7$	
0.023	21.5	$7.512 \cdot 10^4$	1000	75120000.0	0.307	$2.31 \cdot 10^7$	$3.21 \cdot 10^7$

Tabelle 5

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1a	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Adenovirus.
Abbildung 1b	Struktureller Aufbau des LDL-Rezeptorproteins.
Abbildung 2	Darstellung eines CsCl-Gradienten nach erster Ultrazentrifugation.
Abbildung 3	Schematische Darstellung einer 96-Well Platte mit Darstellung der Verdünnungsreihen der Virenausgangslösung.
Abbildung 4	Schematische Darstellung einer 96-Well Platte mit Darstellung eines möglichen Ableseergebnisses.
Abbildung 5	Schematische Darstellung eines Real-Time PCR Kurvenverlaufs.
Abbildung 6	Darstellung des Adenovirusgenoms mit für den Gentransfer wichtigen Regionen.
Abbildung 7	Western Blot der LDLR im Fütterungsexperiment.
Abbildung 8	Immunzytologische Darstellung von GFP, Ad-RSV hLDLR und Ad-P_{-600ap}hLDLR in Huh7 Zellen im Fütterungsexperiment mit Cholesterin / 25-Hydroxy-cholesterin.
Abbildung 9	Fast Performance Liquid Chromatography einer Wild Typ Maus vor / und nach Infektion mit Ad-P_{-600ap}hLDLR Viren.
Abbildung 10	Fast Performance Liquid Chromatography einer Wild Typ Maus vor / und nach Infektion mit Ad-RSV hLDLR.
Abbildung 11	Fast Performance Liquid Chromatography einer Wild Typ Maus vor / und nach Infektion mit Ad-CMV EGFP.
Abbildung 12	Bildliche Darstellung des verwendeten PCR Schemas für die Läufe in der Real-Time PCR.
Abbildung 13	Kurvenverlauf eines Real Time PCR Laufs mit kontinuierlicher Verdünnungsreihe eines Virenstocks (relative Quantifizierung).
Abbildung 14	Relative Quantifizierung zwischen verschiedenen Virenstocks (Ad-P_{-600ap}hLDLR, Ad-RSV hLDLR und Ad-CMV EGFP).
Abbildung 15	Darstellung einer Plasmidstandardkurve. Ermittelt zur Quantitativkation von Adenoviren. Erstellt mit Hilfe eines angefertigten Plasmids in der Real-Time PCR.
Abbildung 16	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Zellkernen nach der Zellkernpräparation zur viralen DNA-Aufbereitung.
Abbildung 17	Darstellung mit Cy3TM markierter Ad-CMV EGFP Vektor mit infizierten Huh7 Zellen in der konvokalen Mikroskopie.

Abbildung 18	Darstellung der erfolgreichen Infektion mit Cy3TM markierten Ad-CMV EGFP Vektoren.
Abbildung 19	Darstellung der Negativkontrolle. Bei Infektion mit Cy3TM markierten Ad-CMV EGFP Vektoren.
Abbildung 20	Darstellung einer Huh7 Zelle mit Cy3TM markierter Ad-CMV EGFP Infektion nach 36 h.
Abbildung 21	Auswertung der Messungen von markierten Viren mittels Dynamic Light Scattering.
Abbildung 22	Fast Performance Liquid Chromatography dreier LDLR defizienten Mäuse vor / und nach Infektion mit Ad-P_{.600ap}hLDLR Viren.

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1	Tabellarische Auflistung der ermittelten viralen Titer bei verschiedenen Titrationsmethoden aber jeweils gleicher Virenpräparation.
Tabelle 2	Messwerte zur Ermittlung der viralen Titer durch Real-Time PCR und DNA-Aufbereitung der Proben. Teil 1
Tabelle 3	Messwerte zur Ermittlung der viralen Titer durch Real-Time PCR und DNA-Aufbereitung der Proben Teil 2
Tabelle 4	Messwerte zur Ermittlung der viralen Titer durch Real-Time PCR und nukleäre DNA-Aufbereitung der Proben. Teil 1
Tabelle 5	Messwerte zur Ermittlung der viralen Titer durch Real-Time PCR und nukleäre DNA-Aufbereitung der Proben Teil 2

9. Literaturverzeichnis

1. Goldstein, J., Hobbs, H., and Brown, M. 2001. Familial Hypercholesterolemia. *In the metabolic and molecular bases of inherited disease*. C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, and D. Valle, editors. McGraw-Hill. New York, New York, USA. 2863-2913
2. Sun, X.M., et al 1994. Familial hypercholesterolemia in China. Identification of mutations in the LDL-receptor gene that result in a receptor-negative phenotype. *Arterioscler. Thromb.* 14:85-94.
3. Hill, J.S., Hayden, M.R., Frohlich, J., and Pritchard, P.H. 1991. Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb* 11:290-297
4. The low density lipoprotein receptor (LDLR) gene in familial hypercholesterolemia. www.Ucl.ac.uk/fh. Website of the University college London.
5. Rudenko, G., et al. 2002. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. 298:2353-2358.
6. Jeon, H., et al. 2001. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat. Struct. Biol.* 8:499-504.
7. Miettinen, T.A., and Gylling, H. 1999. Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Curr. Opin. Lipidol.* 10:9-14.
8. Van Heck, M., et al. 1997. In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283:157-163.
9. Gagne, C., Gaudet, D. and Bruckert, E. 2002. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 105:2469-2475.
10. Thompson, G.R. 2003. LDL apheresis. *Atherosclerosis*. 167:1-13.
11. Hegele, R.A. 2002. Environmental modulation of atherosclerosis end points in familial hypercholesterolemia. *Artheroscler. Suppl.* 2:5-7.
12. Wilson, J.M., Chowdhury, N.R., Grossmann, M., Wajsmann, R., Epstein, A., Mulligan, R.C., and Chudhury, J.R. 1990. Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8437-8441.
13. Chodhury, J.R., Grossmann, M., Gupta, S., Chodhury, N.R., Baker, Jr J.R., and Wilson, J.M. 1991. Long-term improvement of hypercholesterolemia after *ex vivo* gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 254:1802-1805.
14. Raper, S.E., Wilson, J.M., and Grossmann, M. 1992. Retroviral-mediated gene transfer in human hepatocytes. *Surgery* 112:333-339.

15. Grossmann, M., Raper, SE., Kozarsky, K., Stein, EA., Stein EA., Engelhardt, JF., Muller, D., Lupien, PJ., and Wilson, JM. 1994. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 6:335-341.
16. Grossmann, M., Rader, DJ., Muller, DW, Kolansky, DM, Kozarsky, K. Clark, BJI., Stein, EA., Lupien, PJ., Brewer, HB, Jr., Raper, SE., and Wilson, JM. 1995. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nat.Med.* 1:1148-1154.
17. Ylä-Herttuala, S. and Martin, JF. 2000. Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 355:213-222.
18. Kuriyama S., Mitoro A., Tsujinoue. H., Nakatani T., Yoshiji H., Tsujimoto T., Yamazaki M. and Fukui (2000). Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene. *Gene Ther.* 7:1132-1136.
19. Chen SJ., Rader DJ., Tazelaar J., Kawashiri M., Gao G. and Wilson JM. (2000). Prolonged correction of hyperlipidemia in mice with familial hypercholesterolemia using an adeno-associated viral vector expressing very-low-density lipoprotein receptor. *Mol. Ther.* 2:256-261.
20. Raper SE., Yudkoff M., Chirmule N., Gao GP. et al. (2002). A pilot study of in liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum. Gene. Ther.* 13:163-175.
21. Kozarsky KF., McKinley DR., Austin LL., Raper SE., Stratford-Perricaudet LD. and Wilson JM. (1994). In vivo correction of low density lipoprotein receptor deficiency in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit with recombinant adenovirus. *J. Biol. Chem.* 269:13695-13702.
22. Pakkanen TM., Laitinen M., Hippeläinen M., Kallionpää H., Lehtolainen P., Leppänen P., Luoma JS., Tarvainen R., Alhava E. and Ylä-Herttuala S. (1999). Enhanced plasma cholesterol lowering effect of retrovirus-mediated LDL receptor gene transfer to WHHL rabbit liver after improved surgical technique and stimulation of hepatocyte proliferation by combined partial liver resection and thymidine kinase ganciclovir treatment. *Gene. Ther.* 6:34-41.
23. Watanabe Y. 1980. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Artherosclerosis* 36:261-268.
24. Goldstein JL., Kita T. and Brown MS. 1983. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 309:288-296.
25. Ishibashi S., Brown MS., Goldstein JL., Gerard RD., Hammer RE. and Herz J. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knock out mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* 92:883-893.
26. Greeve J., Altkemper I., Dieterich JH., Greten H. and Windler E. 1993. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J. Lipid Res.* 34:1367-1383.

27. Martins IJ., Hone E., Chi C., Seydel U., Martins RN. and Redgrave TG. 2000. Relative roles of LDLr and LRP in the metabolism of chylomicron remnants in genetically manipulated mice. *J. Lipid Res.* 41:205-213.
28. Powell-Braxton L., Veniant M., Latvala RD., Hirano KI., Won WB., Ross J., Dybdal N., Zlot CH., Young SG. and Davidson NO. 1998. A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on low-fat chow diet. *Nat. Med.* 4:934-938.
29. Yabe Y, Trentin JJ, Taylor G. 1962. Cancer induction in hamsters by human type 12 adenovirus. Effect of age and of virus dose. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962 Nov;111:343-4
30. Ali M, Lemoine NR, Ring CJ. 1994. The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 1994 Nov;1(6):367-84.
31. Lundstrom K. 2003. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trend Biotechnol.* 21: 117-122.
32. Wilson JM., Grossman M., Wu CH., Chowdhury NR., Wu GY and Cowdhury JR. 1992. Hepatocyte-directed gene transfer in vivo leads to transient improvement of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits. *J. Biol. Chem.* 267: 963-967.
33. Parise F., Simone L., Croce MA., Ghibellini M., Battini R., Borghi S., Tiozzo R., Ferrari S. and Calandra S. 1999. Construction and in vitro functional evaluation of a low-density lipoprotein receptor/transferrin fusion protein as a therapeutic tool for familial hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther.* 10: 1219-1228.
34. Li J, Fang B, Eisensmith RC, Li XH, Nasonkin I, Lin-Lee YC, Mims MP, Hughes A, Montgomery CD, Roberts JD, et al. 1995. In vivo gene therapy for hyperlipidemia: phenotypic correction in Watanabe rabbits by hepatic delivery of the rabbit LDL receptor gene. *J Clin Invest.* 1995 Feb;95(2):768-73.
35. Cichon G, Willnow T, Herwig S, Uckert W, Loser P, Schmidt HH, Benhidjeb T, Schlag PM, Schnieders F, Niedzielska D, Heeren J. 2004. Non-physiological overexpression of the low density lipoprotein receptor (LDLr) gene in the liver induces pathological intracellular lipid and cholesterol storage. *J Gene Med.* 2004 Feb;6(2):166-75.
36. Kobayashi K, Oka K, Forte T, Ishida B, Teng B, Ishimura-Oka K, Nakamuta M, Chan L. 1996. Reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice by adenovirus-mediated gene transfer of the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1996 Mar 22;271(12):6852-60.
37. Kozarsky KF, Jooss K, Donahee M, Strauss JF 3rd, Wilson JM. 1996. Effective treatment of familial hypercholesterolemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nat Genet.* 1996 May;13(1):54-62. Erratum in: *Nat Genet* 1996 Jul;13(3):374.
38. Oka K, Pastore L, Kim IH, Merched A, Nomura S, Lee HJ, Merched-Sauvage M, Arden-Riley C, Lee B, Finegold M, Beaudet A, Chan L 2001. Long-term stable correction of low-

- density lipoprotein receptor-deficient mice with a helper-dependent adenoviral vector expressing the very low-density lipoprotein receptor. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1274-81.
39. Sally Lehrman 1999. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 401, 517-518 (07 Oct 1999) News.
40. Marshall E. 1999. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 1999 Dec 17; 286(5448):2244-5.
41. Lebherz C, Gao G, Louboutin JP, Millar J, Rader D, Wilson JM 2004. Gene therapy with novel adeno-associated virus vectors substantially diminishes atherosclerosis in a murine model of familial hypercholesterolemia. *J Gene Med*. 2004 Jun;6(6):663-72.
42. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM 2001. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet*. 1997 Nov;17(3):314-7.
43. Kafri T 1997. Lentivirus vectors: difficulties and hopes before clinical trials. *Curr Opin Mol Ther*. 2001 Aug;3(4):316-26.
44. PHILIPSON L.1961. Adenovirus assay by the fluorescent cell-counting procedure. *Virology*. 1961 Nov;15:263-8.
45. Thiel JF, Smith KO 1967. Fluorescent focus assay of viruses on cell monolayers in plastic Petri plates. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967 Jul;125(3):892-5.
46. Smith KO, Thiel JF 1967. Adeno-associated virus studies employing a fluorescent focus assay technique. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967 Jul;125(3):887-92.
47. Bewig B, Schmidt WE. 2000. Accelerated titering of adenoviruses. *Biotechniques*. 2000 May;28(5):870-3.
48. Grimm D, Kern A, Pawlita M, Ferrari F, Samulski R, Kleinschmidt J.1999. Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Ther*. 1999 Jul;6(7):1322-30.
49. Veldwijk MR, Topaly J, Laufs S, Hengge UR, Wenz F, Zeller WJ, Fruehauf S. 2002. Development and optimization of a real-time quantitative PCR-based method for the titration of AAV-2 vector stocks. *Mol Ther*. 2002 Aug;6(2):272-8.
50. Chroboczek J, Bieber F, Jacrot B 1992. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology*. 1992 Jan;186(1):280-5.
51. Hilleman, M. R. & Werner, J. R. (1954). Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 85, 183–188.
52. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrot, R. H. & Ward, T. G. (1953). Isolation of a cytopathic agent from human adenoids undergoing spontaneous degradation in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 84, 570–573.

53. Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Francis T Jr, Hilleman MR, Huebner RJ, Payne AM. 1956. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*. 1956 Jul 20;124(3212):119-20.
54. Matthews, D. A. & Russell, W. C. (1994). Adenovirus protein–protein interactions: hexon and protein VI. *Journal of General Virology* 75, 3365–3374.
55. Matthews, D. A. & Russell, W. C. (1995). Adenovirus protein–protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *Journal of General Virology* 76, 1959–1969.
56. Matthews, D. A. & Russell, W. C. (1998 a). Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli. *Journal of General Virology* 79, 1671–1675.
57. Matthews, D. A. & Russell, W. C. (1998 b). Adenovirus core protein V interacts with p32 – a protein which is associated with both the mitochondria and the nucleus. *Journal of General Virology* 79, 1677–1685.
58. Matthews, D. A., Cummings, D., Eveleigh, C., Graham, F. L. & Prevec, L. (1999). Development and use of a 293 cell line expressing *lac* repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein. *Journal of General Virology* 80, 345–353.
59. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997 Feb 28;275(5304):1320-3.
60. Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ 2002. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):789-99.
61. Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel DT, Boulanger PA 1997. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J*. 1997 May 1;16(9):2294-306.
62. Doronin K, Toth K, Kuppaswamy M, Krajcsi P, Tollefson AE, Wold WS 2003. Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus. *Virology*. 2003 Jan 20;305(2):378-87.
63. Krajcsi P, Dimitrov T, Hermiston TW, Tollefson AE, Ranheim TS, Vande Pol SB, Stephenson AH, Wold WS 1996. The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid. *J Virol*. 1996 Aug;70(8):4904-13.
64. Flint J, Shenk T 1997. Viral transactivating proteins. *Annu Rev Genet*. 1997;31:177-212.
65. Hehir KM, Armentano D, Cardoza LM, Choquette TL, Berthelette PB, White GA, Couture LA, Everton MB, Keegan J, Martin JM, Pratt DA, Smith MP, Smith AE, Wadsworth SC 1997.

- Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J Virol.* 1996 Dec;70(12):8459-67.
66. Zhu J, Grace M, Casale J, Chang AT, Musco ML, Bordens R, Greenberg R, Schaefer E, Indelicato SR 1999. Characterization of replication-competent adenovirus isolates from large-scale production of a recombinant adenoviral vector. *Hum Gene Ther.* 1999 Jan 1;10(1):113-21.
67. Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL 1996. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):13565-70.
68. Parks RJ, Graham FL 1997. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J Virol.* 1997 Apr;71(4):3293-8.
69. Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, Gao GP, Nunes F, Haskal ZJ, Furth EE, Propert KJ, Robinson MB, Magosin S, Simoes H, Speicher L, Hughes J, Tazelaar J, Wivel NA, Wilson JM, Batshaw ML 2002. A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther.* 2002 Jan 1;13(1):163-75.
70. Thompson GR, Grundy SM 2005. History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. *Am J Cardiol.* 2005 Jul 4;96(1A):3D-9D.
71. Gorziglia, M. I., Lapcevich, C., Roy, S., Kang, Q., Kadan, M., Wu, V., Pechan, P. & Kaleko, M. (1999). Generation of an adenovirus vector lacking E1, E2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3. *Journal of Virology* 73, 6048–6055.
72. Hobbs, H. H.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* 1: 445-466, 1992.
73. Summers, R. M.; Andrasko-Bourgeois, J.; Feuerstein, I. M.; Hill, S. C.; Jones, E. C.; Busse, M. K.; Wise, B.; Bove, K. E.; Rishforth, B. A.; Tucker, E.; Spray, T. L.; Hoeg, J. M. 1998. Evaluation of the aortic root by MRI: insights from patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* 98: 509-518, 1998.
74. Goldstein, J. L.; Brown, M. S. 1987. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 76: 504-507, 1987.
75. Brorholt-Petersen, J. U.; Jensen, H. K.; Raungaard, B.; Gregersen, N.; Faergeman, O. 2001. LDL-receptor gene mutations and the hypocholesterolemic response to statin therapy. *Clin. Genet.* 59: 397-405, 2001.
76. Henry, I.; Humphries, S. E.; Tata, F.; Barichard, F.; Holm, M.; Williamson, R.; Junien, C. 1985. The gene for HMG CoA reductase (HMGCR) is on human chromosome 5. *Cytogenet. Cell Genet.* 40: 649-650, 1985.
77. Istvan, E. S.; Deisenhofer, J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292: 1160-1164, 2001.

78. Nishimura S, Sekiguchi M, Kano T, Ishiwata S, Nagasaki F, Nishide T, Okimoto T, Kutsumi Y, Kuwabara Y, Takatsu F, Nishikawa H, Daida H, Yamaguchi H. 1999. Effects of intensive lipid lowering by LDL-apheresis on regression of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterinemia: Japan LDL Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (L-CAPS). *Atherosclerosis* 144(2): 409-417 (1999).
79. Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF 2001. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterinemia (ASAP): a prospective, randomized, double-blind trial. *Lancet* 357, 577-581 (2001).
80. Nelson JE, Kay MA. Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not dependent on vector DNA replication. *J Virol.* 1997 Nov;71(11):8902-7.
81. Harui A, Suzuki S, Kochanek S, Mitani K. Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J Virol.* 1999 Jul;73(7):6141-6.
82. Heeren J, Steinwaerder DS, Schnieders F, Cichon G, Strauss M, Beisiegel U. Nonphysiological overexpression of low-density lipoprotein receptors causes pathological intracellular lipid accumulation and the formation of cholesterol and cholesteryl ester crystals in vitro. *J Mol Med.* 1999 Oct;77(10):735-43.
83. Herz J, Gerard RD. Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 1;90(7):2812-6
84. Park MT, Lee MS, Kim SH, Jo EC, Lee GM. Influence of culture passages on growth kinetics and adenovirus vector production for gene therapy in monolayer and suspension cultures of HEK 293 cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004 Oct;65(5):553-8. Epub 2004 May 27.
85. Ugai H, Watanabe S, Suzuki E, Tsutsui-Nakata H, Yokoyama KK, Murata T. Stability of a recombinant adenoviral vector: optimization of conditions for storage, transport and delivery. *Jpn J Cancer Res.* 2002 May;93(5):598-603.
86. LaBarre DD, Lowy RJ. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays. *J Virol Methods.* 2001 Aug;96(2):107-26.
87. Banik U, Adhikary AK, Suzuki E, Inada T, Okabe N. Multiplex PCR assay for rapid identification of oculopathogenic adenoviruses by amplification of the fiber and hexon genes. *J Clin Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1064-8.
88. Sanburn N, Cornetta K. Rapid titer determination using quantitative real-time PCR. *Gene Ther.* 1999 Jul;6(7):1340-5.
89. Ma L, Bluysen HA, De Raeymaeker M, Laurysens V, van der Beek N, Pavliska H, van Zonneveld AJ, Tomme P, van Es HH. Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR. *J Virol Methods.* 2001 Apr;93(1-2):181-8.
90. Gu Z, Belzer SW, Gibson CS, Bankowski MJ, Hayden RT. Multiplexed, real-time PCR for quantitative detection of human adenovirus. *J Clin Microbiol.* 2003 Oct;41(10):4636-41.

91. Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol.* 1996 Nov;70(11):7498-509.
92. Mathias P, Wickham T, Moore M, Nemerow G. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol.* 1994 Oct;68(10):6811-4.
93. Suomalainen M, Nakano MY, Keller S, Boucke K, Stidwill RP, Greber UF. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol.* 1999 Feb 22;144(4):657-72.
94. Suomalainen M, Nakano MY, Boucke K, Keller S, Greber UF. Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *EMBO J.* 2001 Mar 15;20(6):1310-9.
95. Varghese R, Mikyias Y, Stewart PL, Ralston R. Postentry neutralization of adenovirus type 5 by an antihexon antibody. *J Virol.* 2004 Nov;78(22):12320-32.
96. Glotzer JB, Michou AI, Baker A, Saltik M, Cotten M. Microtubule-independent motility and nuclear targeting of adenoviruses with fluorescently labeled genomes. *J Virol.* 2001 Mar;75(5):2421-34.
97. Dzakpasu R, Axelrod D. Dynamic light scattering microscopy. A novel optical technique to image submicroscopic motions. I: theory. *Biophys J.* 2004 Aug;87(2):1279-87.
98. Dzakpasu R, Axelrod D. Dynamic light scattering microscopy. A novel optical technique to image submicroscopic motions. II: Experimental applications. *Biophys J.* 2004 Aug;87(2):1288-97.
99. <http://www.phys.ufl.edu/courses/phy4803L/dls/dls.pdf>.
100. Bondoc LL Jr., Fitzpatrick S. Size distribution analysis of recombinant adenovirus using disc centrifugation. *J. of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1998) 20, 317-322.
101. Nakano MY, Greber UF. Quantitative microscopy of fluorescent adenovirus entry. *J Struct Biol.* 2000 Feb;129(1):57-68.
102. Rohr UP, Wulf MA, Stahn S, Steidl U, Haas R, Kronenwett R. Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time PCR. *J Virol Methods.* 2002 Oct;106(1):81-8.
103. Abou El Hassan MA, Braam SR, Kruyt FA. A real-time RT-PCR assay for the quantitative determination of adenoviral gene expression in tumor cells. *J Virol Methods.* 2005 Nov 18; [Epub ahead of print]
104. Referenz des Adenomanual der Firma Qbiogene.
105. <http://www.clontech.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT3414-1.pdf> und <http://www.clontech.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT3651-1.pdf>

106. Puvion-Dutilleul F, Bachellerie JP, Visa N, Puvion E. Rearrangements of intranuclear structures involved in RNA processing in response to adenovirus infection. *J Cell Sci.* 1994 Jun;107 (Pt 6):1457-68.

107. <http://www.atcc.org/documents/pdf/VR-1516text2.pdf>. Adenovirus Type 5 Reference Material (1)

10. Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für ihre Unterstützung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Dr. rer. Nat. Frank Schnieders für die exzellente Betreuung dieser Arbeit, sowie die konstruktive Kritik und Förderung weit über das Maß des Üblichen.

Ganz besonders danke ich Sergej Ragozine für die Hilfsbereitschaft und aufopfernde Einführung in die Laborarbeit und den Anspruch aus einem Mediziner auch einen Naturwissenschaftler zu machen.

Ferner Alexander Laatsch, der mir mit Rat und vor allen Dingen auch Tat zur Seite stand.

Ich möchte ebenfalls dem Rest der Laborgruppe danken für das besonders gute Arbeitsklima und ein paar unvergessene Feiern.

Ich danke ganz besonders Dir Dagmar, die mir in vielen Momenten immer wieder helfend zur Seite stand.

Ebenfalls danke ich meinen Eltern, die mir den eingeschlagenen Weg überhaupt erst ermöglichten.

11. Curriculum vitae

Persönliche Informationen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Geburtsdatum: 23.06.1971 ▪ Geburtsort: Hamburg ▪ Nationalität: deutsch ▪ Familienstand: ledig
Aktueller Werdegang	
<i>September 2004 bis dato</i>	Assistenzarzt der Klinik für allgemeine innere Medizin des UK S-H Direktor Prof. Dr. U.R. Fölsch
<i>März 2003 bis August 2004</i>	Arzt im Praktikum (teilweise wissenschaftlich tätig) im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Allgemeine Innere Medizin, sowie im Rezeptor- und Hormonlabor, PD. Dr. Karlheinz Kiehne
<i>Januar 2001 bis Februar 2003</i>	Anfertigen der Dissertation im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Zellbiologie, Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel
<i>Juni 2001 bis Dezember 2001</i>	Mitglied des Graduiertenkollegs 336: „Molekulare Endokrinologie – Molekularer Stoffwechsel“ Teilprojekt 13 des Sonderforschungsbereichs 617: „Ätiologie und epitheliale Abwehrmechanismen chronisch analer Fisteln.“ Mit Unterstützung durch die Hensel Stiftung.
Aktuelle Projekte	
Ausbildung	
<i>01.10.1994</i>	Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Hamburg
<i>06.12.2001</i>	Abschluss des Studiums mit Ablegen des dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung Posterpräsentation Wiesbaden, DGIM 2004:
Publikationen	<p>Defensinregulation und Zytokinexpression bei Soorösophagitis</p> <p>*Lange T. 1, Brunke G. 1, Meyer D. 1, Herzig K.H. 2, Kiehne K. 1 1 Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel, 2 A.I.Virtanen Institut, Universität Kuipio, Finnland Abstract unter: http://www.dgim2004.de/pdf/posterdatei.pdf Projekt 96</p> <p>Posterpräsentation Stuttgart : Endorsed by the European Crohn`s and Colitis Organisation 2005: Antimicrobial peptide expression by the epithelia of chronic anal fistulas prevents systemic infection K.Kiehne1, T.Lange1, A. Finke1, G. Brunke1, U.R. Fölsch1, K.H. Herzig1,2. 1Department of internal medicine, University of Kiel, Germany. 2A.I.Virtanen Institut, Universität Kuipio, Finnland Abstract in "colorectal diseases" Springer Verlag: Volume 20, Number 6 November 2005. Seite 564 Nr.24</p>

12. Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

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 nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes 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.

Unterschrift: