

Aus dem  
Zentrum für Innere Medizin  
Des  
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Ärztlicher Leiter: Professor Dr. Ansgar W. Lohse

Wege zur persistierenden Genexpression bei der experimentalen  
adenoviralen Gentherapie  
mittels  
immunmodulatorischer Proteine des Cytomegalievirus

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt  
von

Henning Lange  
aus Bielefeld  
Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

Der Universität Hamburg am: 17.11.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende: PD Dr. A. Block

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. B. Fehse

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. T. Brümmendorf

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

### 1.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

### 1.2 Gentherapie

1.2.1 Physikalische und virale Gentransfer-Methoden

1.2.2 Vor- und Nachteile verschiedener Vektoren

### 1.3 Adenoviren in der Gentherapie

1.3.1 Allgemeine Einführung

1.3.2 Aufbau und Lebenszyklus

1.3.3 Adenovirale Vektoren

1.3.4 Immunantwort auf adenovirale Infektion

### 1.4 Immunmodulatorische Proteine des Cytomegalievirus

1.4.1 Allgemeine Einführung

1.4.2 Funktion des MHC-Klasse 1 Homologon m144

1.4.3 Funktion des CC-Chemokin Homologon m131/129

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

2.1.2 Enzyme

2.1.3 Molekulargewichtsstandarts, dNTP und Proteine

2.1.4 Labormaterialien

2.1.5 Verwendete Plasmide

2.1.6 Medien und Zusätze für die Zellkultur

2.1.7 Verwendete Zelllinien

2.1.8 Hergestellte Medien, Lösungen und Puffer

2.1.9 Geräte

## **2.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeitsmethoden**

- 2.2.1 Sterilisation
- 2.2.2 Wasser
- 2.2.3 Restriktionsverdau
- 2.2.4 Aufreinigen von DNA nach enzymatischen Reaktionen
- 2.2.5 Blunten
- 2.2.6 Dephosphorylieren des 5´Endes eines DNA –Fragmentes
- 2.2.7 Ligation von DNA -Fragmenten mit „sticky-ends“
- 2.2.8 Ligation von DNA –Fragmenten mit „blunt-ends
- 2.2.9 Transformation in kompetente Escherichia coli-Bakterien
- 2.2.10 Kryokonservierung von Bakterien
- 2.2.11 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse
- 2.2.12 Agarosegelelektrophorese
- 2.2.13 Isolierung einzelner DNA -Fragmente aus Agarose-Gelen
- 2.2.14 Endotoxinaufreinigung
- 2.2.15 Absorptionsmessungen

## **2.3 Arbeiten mit Zellkulturen**

- 2.3.1 Kultivierung von 293-, cos-, und HepG2-Zellen
- 2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien
- 2.3.3 Zellzählung

## **2.4 Spezielle molekularbiologische Arbeitsmethoden**

- 2.4.1 Klonierung des adenoviralen Expressionsplasmids  
pAd.CMV.luc.IRES.m131/129
- 2.4.2 Transfektion und Lyse von cos-Zellen
- 2.4.3 Luciferaseexpressionstest der transfizierten Zellen

## **2.5 Arbeiten mit Adenovirus Ad.CMV.luc.IRES.m144/Ad.CMV.luc**

- 2.5.1 Vermehrung und Aufreinigung  
des rekombinanten Adenovirus Ad.CMV.luc.IRES.m144
- 2.5.2 Titration (Plaque Assay)
- 2.5.3 Luciferaseexpressionstest in der Zelllinien Hep2

## **2.6 *in vivo*-Experimente**

- 2.6.1 Versuchstiere
- 2.6.2 Virale Applikation
- 2.6.3 Terminierung der Mäuse
- 2.6.4 Fixation der Lebergewebe und Herstellung eines Leberhomogenisats zur Luciferaseexpressionsmessung

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Klonierung des adenoviralen Expressionsplasmids**

**pAd.CMV.luc.IRES.m131/129**

### **3.2 Versuch der Generierung des Adenovirus**

**pAd.CMV.luc.IRES.m131/129**

### **3.3 Präparation der adenoviralen Vektoren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc für die *in vitro* und *in vivo*- Versuche**

### **3.4 Ergebnisse der *in vitro* Versuche**

- 3.4.1 Luciferaseexpression des adenoviralen Expressionsplasmids pAd.CMV.luc.IRES.m131/129 in cos-Zellen
- 3.4.2 Luciferaseexpressions Assay der rekombinanten Adenoviren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc in HepG2 Zellen

### **3.5 Ergebnisse der *in vivo* Versuche**

- 3.5.1 Luciferaseexpressionsassay aus den Leberhomogenisaten des dreizeitigen Tiermodells
- 3.5.2 Auswertung der Leberhistologie des dreizeitigen Tiermodells
- 3.5.3 Auswertung der Leberhistologie nach zehnfacher Virusapplikation

## **4 Diskussion**

### **4.1 Funktionsüberprüfung des Expressionsplasmids**

**pAd.luc.IRES.m131/129 und der Versuch der Generierung des rekombinanten Adenovirus Ad.CMV.luc.IRES.m131/129**

- 4.2 ***In vitro* Luciferaseexpressionsvergleich der rekombinanten Adenoviren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc in 293 Zellen**
- 4.3 ***In vivo* Charakterisierung der rekombinanten Adenoviren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc in 293 Zellen**
- 4.4 **Ausblick auf Folgeversuche mit dem Chemokin-Homologon m131/129**
  
- 5 **Zusammenfassung**
  
- 6 **Literaturverzeichnis**
  
- 7 **Anhang**
  - 7.1 **Abbildungsverzeichnis**
  - 7.2 **Tabellenverzeichnis**
  
- 8 **Lebenslauf**
  
- 9 **Danksagung**

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Bei der Gentherapie handelt es sich um das Einbringen von normalen Genen in Zellen, um defekte Gene zu ersetzen oder mit Hilfe der Genprodukte Tumorzellen abzutöten, eine Immunreaktion auszulösen oder diese zu verhindern (Kay et al., 1997). Sie umfasst vielfältige Techniken für den Austausch genetischer Elemente *in vivo* und *ex vivo*, die der Behandlung von hereditären, malignen, infektiösen und degenerativen Erkrankungen dienen. Die Möglichkeit der Nutzung adenoviraler Vektoren für die Therapie metabolischer Erkrankungen bildet den Ansatz der genterapeutischen Überlegungen dieser Arbeit. In den letzten Jahren sind unter anderem bedingt durch die Entschlüsselung des humanen Genoms, der zunehmenden Funktionsanalyse verschiedener Gene und deren Interaktion große Erwartungen in die Gentherapie als neuartigen Ansatz in der Behandlung von einerseits malignen Tumorerkrankungen, als auch andererseits in der Therapie metabolischer Erkrankungen gesetzt worden (Mountain et al., 2000). Um die genterapeutischen Strategien erfolgreich umsetzen zu können, wurden verschiedene Vektorssysteme viralen und nicht-viralen Ursprungs erprobt. Die in dieser Arbeit verwendeten replikationsdefizienten adenoviralen Vektoren bieten im Vergleich zu anderen Vektorsystemen mehrere Vorteile und spielen daher eine zentrale Rolle als Vektoren für den Transfer therapeutischer Gene. Ein bisher ungelöstes Problem ist dabei die zeitlich begrenzte Expression, da das episomal vorliegende adenovirale Genom bei der Zellteilung nicht weitergegeben wird. Zudem wird frühzeitig durch Expression viraler Proteine eine Immunantwort gegen die transfizierten Zellen ausgelöst, die die Expression der therapeutischen Gene innerhalb weniger Wochen signifikant abfallen lässt (Davidson et al., 1993; Yang et al., 1994). So haben Tests mit dem Reporter gen LacZ gezeigt, dass bereits nach 14 Tagen keine nennenswerten Mengen exprimiert werden (Kurata et al., 1999). Versuche an Balb/c-Mäusen von Bloom et al. (2001) zeigten nach systemischer Virusapplikation ein Maximum der konstitutiven, adenoviralen Genexpression nach 5 Tagen und ebenfalls einen signifikanten Abfall nach 14 Tagen. Eine wesentliche Rolle bei der humoralen und zellulären Immunantwort

spielen dabei die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in Interaktion mit verschiedenen Chemokinen und Zytokinen sowie zytotoxische T-Zellen. Durch die Eliminierung der transfizierten Zellen wurde so bislang eine persistierende Transgenexpression bei der Therapie metabolischer Erkrankungen verhindert. Um dieses Problem zu lösen wurden bislang vor Allem drei Wege beschritten. Zum einen wurden „gutless vectors“ entwickelt, bei denen das adenovirale Gerüst auf ein Minimum reduziert ist. Die Replikation ist jedoch aufwendig und auch die Herstellung der Konstrukte technisch anspruchsvoll. Darüber hinaus sind die Effizienz der Transfektion und die Genexpression zum gegenwärtigen Zeitpunkt für therapeutische Applikationen unbefriedigend. Eine andere Möglichkeit bestand in der systemischen Supprimierung der Immunantwort unter Beibehaltung und Nutzung der Vorteile der adenoviralen Vektoren. Unter Betrachtung der vielfältigen Nebenwirkungen der Immunsuppression scheint dieses Verfahren gerade hinsichtlich klinischer Studien problematisch. Ein neuerer Ansatz, die Immunantwort nach adenoviraler Infektion zu umgehen, ist die Modifikation des viralen Kapsides. Die mit verschiedenen synthetischen Polymeren, am Gebräuchlichsten poly-N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (poly-HPMA) und polyethylene glycol (PEG) modifizierten adenoviralen Vektoren können die frühe immunologische Antwort signifikant reduzieren und zudem die Problematik bereits existierender Antikörper umgehen (Kreppel und Kochanek, 2008). Ziel dieser Arbeit ist es, die Immunantwort lediglich auf lokaler Ebene zu unterdrücken um so systemische Nebenwirkungen auszuschließen. Dabei ist die Kenntnis verschiedener Abwehrstrategien von Viren, die eine persistierende Infektion verursachen, wegweisend. Durch lokale Beeinflussung des komplexen immunologischen Netzwerkes aus NK-Zellen, Zytokinen, Chemokinen und T-Lymphozyten haben diese Viren Wege gefunden sich der Immunantwort zu entziehen. Interessant sind dabei zwei Gene aus dem murinen Cytomegalievirus, das m131/129, welches für ein CC-Chemokin-Homologon codiert, und das m144, einem MHC Klasse I-Homologon. Diese Arbeit soll die interessante Frage beantworten, ob durch Koexpression des immunmodulatorischen m144-Gen mit einem Markergen in einem adenoviralen Vektor eine prolongierte Genexpression *in vivo* erzielt werden kann. Die Gensequenzen des Markergens und des m144-Gens sind dabei über eine „internal ribosomal entry site“ (IRES) verbunden, eine komplexe Formation, die das Anlagern der RNA direkt an die Ribosomen



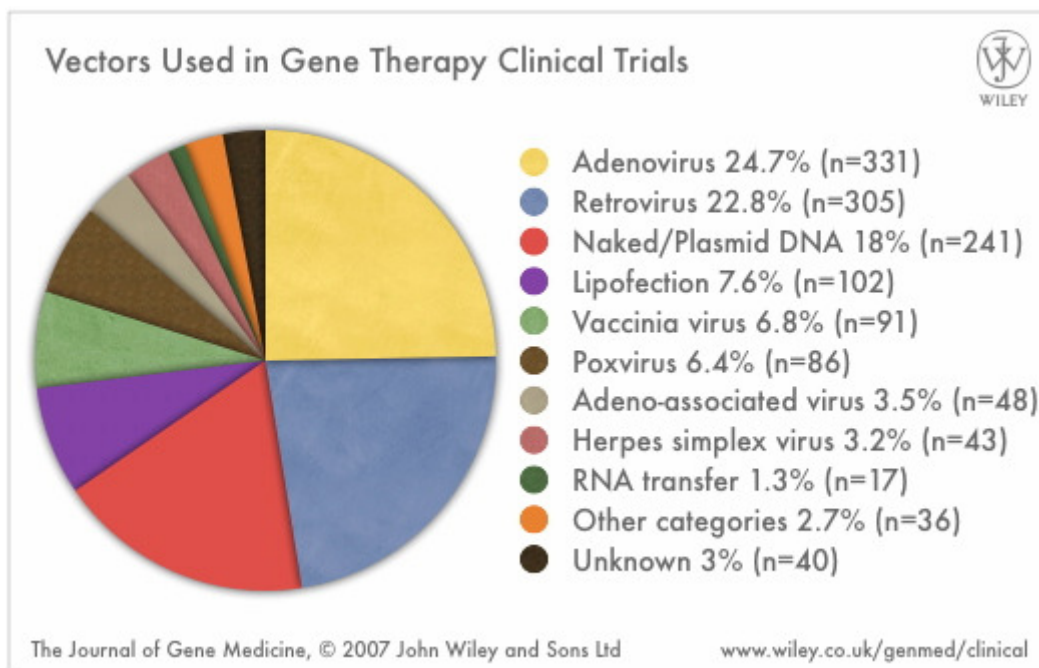
ermöglicht, ohne Mitwirkung von Cap-Strukturen. Zum Vergleich wurde dazu im Tierversuch mit balb/c-Mäusen der im Labor etablierte Vektor Ad.CMV.luc, mit dem Markergen Luciferase ausgestattet, aber ohne zusätzliche immunmodulatorische Gensequenzen, dem Adenovirus Ad.CMV.luc.IRES.m144 gegenübergestellt. Die mit dem jeweils gleichen Virus infizierten Mäuse werden in drei Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt und nach 7, 14 und 20 Tagen nach Virusapplikation terminiert. Nach Aufbereitung des Lebergewebes wird die Transgenexpression mittels des Luciferaseexpressionsassays quantifiziert. Den Weg zur Generierung eines adenoviralen Vektors wird dabei anhand der Klonierung des adenoviralen Expressionsplasmids pAd.CMV.luc.IRES.m131/129 dargestellt, welches nach beschriebener Funktionalitätsüberprüfung für spätere Arbeiten zur Verfügung steht und ebenfalls durch Immunmodulation und Interferenz mit NK-Zellen und T-Lymphozyten zu einer verlängerten Genexpression führen soll.

## **1.2 Gentherapie**

### **1.2.1 Physikalische und virale Gentransfer-Methoden**

Um Fremd-DNA in Zellen einzuschleusen wurden mehrere Verfahren entwickelt, die bezüglich ihrer Durchführbarkeit und Effizienz große Unterschiede aufweisen. Am Etabliertesten sind dabei die evolutionär sehr alten, aber effektiven viralen Gentransfermethoden, die den viralen Infektionsmodus nutzen. Demgegenüber stehen physikalische Gentransfer-Methoden mittels derer versucht wird, die Nachteile der Virus-Applikation zu vermeiden, die aber gerade hinsichtlich ihrer Effizienz der viralen Gentherapie unterlegen sind. Bei der Elektroporation wird durch ein Spannungsfeld die Permeabilität der Zellmembran in einem Umfang gesteigert, dass Makro-Moleküle wie DNA in das Zellinnere aufgenommen werden können (Andreason und Evans, 1988). Weitere Verfahren stellen die Einschleusung von DNA mittels Liposomen, die mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran fusionieren (Mannino und Gould-Fogerite, 1988) und die direkte Injektion von DNA dar. Alle physikalischen Methoden weisen eine ineffiziente Transduktion der Zielzellen auf, so dass für die moderne Gentherapie fast

ausschließlich virale Vektoren wie Adenoviren, Retroviren, adenoassoziierte Viren, Lentiviren und Herpes-simplex Viren verwendet werden. Eine Auflistung der derzeit experimentell in klinischen Studien verwendeten Viren gibt folgende Übersicht:



**Abbildung 1: Anteile verschiedener Vektoren an gentherapeutischen klinischen Studien**

Quelle: [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)

### 1.2.2 Vor- und Nachteile viraler Vektoren

Der optimale virale Vektor sollte Eigenschaften besitzen, die derzeit nur zum Teil auf die gängigen viralen Vektoren zutreffen. So sollte ein Vektor in hohen Konzentrationen leicht, reproduzierbar und kostengünstig hergestellt werden. Die Zielzelle sollte effizient und selektiv infiziert werden, die Genexpression sollte regulierbar sein und eine Immunantwort gegen den Vektor ausbleiben. Dabei bieten die verschiedenen zur Anwendung kommenden Vektoren verschiedene Vorteile, aber auch Nachteile. Im Bereich der Gentherapie maligner Erkrankungen sind die Adenoviren die am Häufigsten verwendeten Transduktionsvektoren (Christ et al., 1997; Romano et al., 2000). Insgesamt sind sie auch mit 25% (Stand 2007) die am Häufigsten in klinischen Studien eingesetzten Vektoren und

haben diesbezüglich mittlerweile die Retroviren, die in ihrer Popularität sanken, aber mit 23% immer noch den zweiten Platz in dieser Kategorie belegen, überholt. Einen Überblick über die Vor- und Nachteile viraler Vektoren enthält die folgende Tabelle:

	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
<b>Adenovirus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Transfektions-Effizienz <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i></li> <li>• Infiziert teilende und ruhende Zellen</li> <li>• Hohe Genexpression</li> <li>• Herstellung hoher Titer möglich bis <math>10^{12}</math> pfu/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunantwort gegen virale Partikel</li> <li>• Hohes Entzündungspotential</li> <li>• Genexpression nur transient</li> <li>• Limitierte Insertionskapazität bis 7,5kb bei der 2.Generation</li> </ul>
<b>Retrovirus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Immunantwort</li> <li>• Integration in das Genom der Wirtszelle mit stabiler Expression</li> <li>• Hohe Transfektions-Effizienz <i>ex vivo</i></li> <li>• Breiter Zelltropismus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiziert nur teilende Zellen</li> <li>• Limitierte Insertionskapazität bis 8kb</li> <li>• Potentielle Gefahr der Insertionsmutagenese mit maligner Transformation</li> </ul>
<b>Vacciniaviral</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insertionskapazität bis 25kb</li> <li>• Sehr breiter Zelltropismus</li> <li>• Geringe Nebenwirkungen bei Immunkompetenten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genexpression nur transient</li> <li>• Immunantwort gegen bis zu 100 virale Proteine</li> </ul>
<b>Adenoassoziierte</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiziert teilende und ruhende Zellen</li> <li>• Geringe Immunogenität</li> <li>• Stabile Genexpression durch Integration in das Wirtsgenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitierte Insertionskapazität bis 4,5kb</li> <li>• Ineffiziente Virusproduktion</li> </ul>
<b>Herpes simplex Virus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insertionskapazität bis 30kb</li> <li>• Geringe Toxizität</li> <li>• Breiter Zelltropismus</li> <li>• Kann neuronale Zellen infizieren</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sicherheitsbedenken durch beschriebene Encephalitiden</li> </ul>

Tabelle 1: Vor- und Nachteile viraler Vektoren

### 1.3 Adenoviren in der Gentherapie

#### 1.3.1 Allgemeine Einführung

Adenoviren wurden 1953 erstmals kultiviert und als distinkte Viren beschrieben (Rowe et al., 1953). Die Unterteilung der Adenoviren, die die Familie der Adenoviridae begründen, erfolgt in zwei Gattungen, den Mastadenoviren, die Säugetiere infizieren können und den Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten endemisch sind und ausschließlich diese infizieren können. Es sind derzeit über 100 verschiedene Serotypen bekannt. Beim Menschen sind 47 Serotypen beschrieben, die in die Gruppen A-F eingeteilt werden. Diese Eingruppierung besagt, ob die Virustypen in hohem, mittlerem oder geringem Ausmaß Tumoren in Nagetieren erzeugen können (Shenk, 1996; Madrow und Falke, 1997).

Aufgrund des fehlenden onkogenen Potentials werden für die Gentherapie überwiegend Viren des Serotyps 5 verwendet.

Genus	Mensch	Tier
Mastadenovirus	Subgenera A-F Adenovirus Typ 1 - 47	Adenovirus des Hundes Typ 1, 2 Mausadenovirus Typ 1, 2 Equines Adenovirus Affenadenoviren Typ 1-27 Rinderadenoviren Typ 1 - 9 Adenoviren der Schweine
Aviadenovirus		Geflügeladenoviren Typ 1 - 12 Adenoviren der Gänse Typ 1 - 3 Adenoviren der Enten Typ 1, 2

**Tabelle 2: Übersicht der adenoviralen Serotypen**

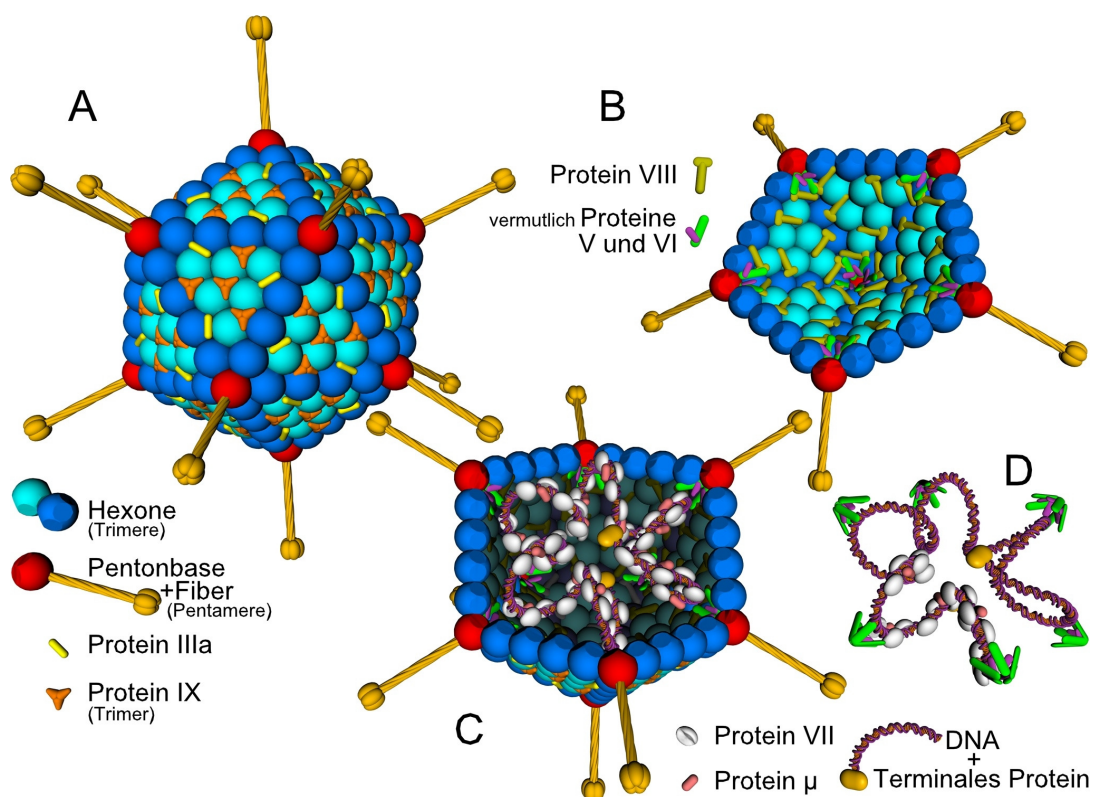
Adenoviren haben ein sehr breites Wirtsspektrum. Sie können sich teilende, ruhende wie auch bereits ausdifferenzierte Zellen, zum Beispiel Neuronen oder Hepatozyten, infizieren. Im Allgemeinen befallen Adenoviren jedoch vor allem das Epithel der Atemwege; sie verursachen etwa 5 - 15% aller Erkältungskrankheiten (akute febrile Pharyngitis). Obwohl sie hauptsächlich harmlose Erkrankungen

auslösen, die bei Immunkompetenten meist selbstlimitierend sind, treten sie auch als Erreger von gravierenderen Krankheiten wie Keratokonjunktivitis, Gastroenteritis, Pneumonie, Bronchitis und Hepatitis auf. In sehr seltenen Fällen können Adenovirusinfektionen auch zum Tode führen. Dies ist möglich, wenn die Viren immunsupprimierte Patienten oder Organe und Gewebe, die außerhalb des normalen Wirtsspektrums liegen, befallen.

### 1.3.2 Aufbau und Lebenszyklus

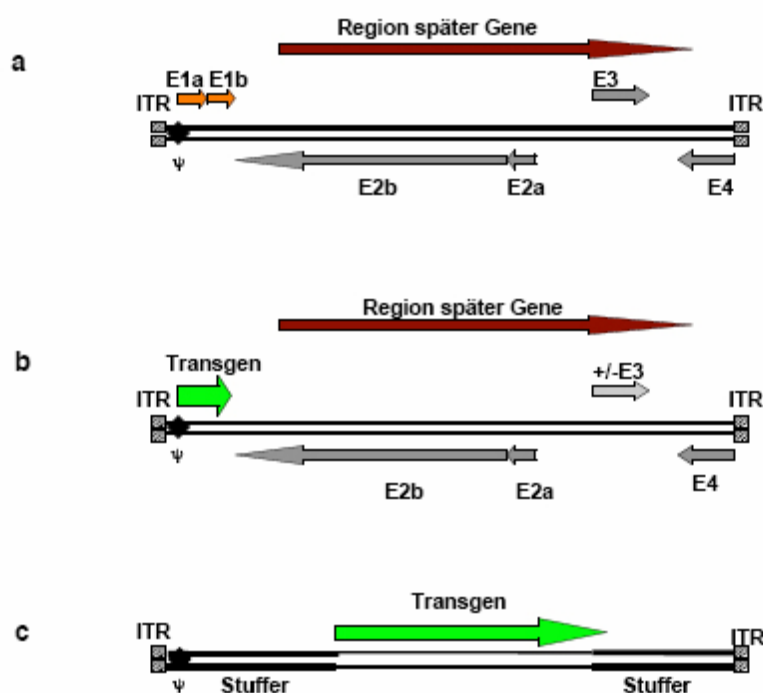
Ein typisches Adenovirus hat einen Durchmesser von 60 - 90 nm, Fibern und einen ikosaedrischen Aufbau. Das Kapsid besteht aus 252 Untereinheiten (Capsomeren) und setzt sich aus drei Hauptproteinen zusammen: Hexonproteine (240), bestehend aus einem Trimer der großen Hexonproteine II, Pentonproteine (12), bestehend aus fünf Pentonproteinen und Fiberproteine (Stewart et al., 1993), sowie einigen kleineren Proteinen: VI, VIII, IX, IIIa und IVa2. Pentone und Hexone definieren sich durch die Zahl der umgebenden Strukturen, die den Aufbau des Kapsids bestimmen, so sind Hexone von sechs und Pentone von fünf benachbarten Strukturen umgeben. Ein Verbund von Hexonen wird durch weitere Proteine VI, VIII und IX stabilisiert. Jedes Penton enthält eine Basis, die einen Teil der Oberfläche des Kapsids bildet; von hier nehmen die Fiber-Proteine ihren Ursprung. Insgesamt sind sieben verschiedene virale Proteine am Aufbau der Pentone und Hexone und somit am Aufbau des Kapsids beteiligt. Das trimere Fiber-Protein zusammen mit der Penton-Basis wird als Penton-Capsomer bezeichnet. Die Fiber-Struktur formt die initiale Bindung an die Zielzelle über den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR), ein 46 kDa großes Membran-Protein, welches zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor gliedert sich in eine transmembranöse, eine zytoplasmatische Domäne (Kirby et al., 2000; Tomko et al., 2000) und eine für die Infektion essentielle extrazelluläre Domäne (Wang und Bergelson, 1999). Eine Ausnahme bilden hier nur Adenoviren der Gruppe B (Bergelson et al., 1997; Bergelson et al., 1998; Bergelson et al., 1999). Von dem in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Serotyp 5 ist zudem bekannt, dass die Fiber-Struktur zusätzlich an MHC Klasse-I Rezeptoren binden kann (Hong et al., 1997). Protein V stellt über das Protein VI

eine Verbindung zwischen Kern und Kapsel her und besitzt außerdem eine Proteasefunktion, welche für die Prozessierung struktureller Proteine bei der Bildung infektiöser Partikel notwendig ist (Matthews und Russell, 1995; Webster et al., 1989). Das adenovirale Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA von ungefähr 36 kb Länge, die in 100 Kartierungseinheiten (map units, (mu)) unterteilt wird und an den Enden von kurzen inverted terminal repeats (ITR), bzw. zusätzlich am 5' Ende von einem terminalen Protein flankiert wird, welche für die Verpackung und Replikation des Virusgenoms in Virionen bedeutsam sind (Schmid und Hearing, 1998).



### Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines adenoviralen Partikels

(A, B: Anordnung der Kapselproteine (A: Außenansicht, B: Innenansicht). C: Lage des Viruskerns in der Kapsel. D: Anordnung der Kernkomponenten Modifiziert nach Russell, 2000; Fabry *et al.*, 2005 und Vellinga *et al.*, 2005).



### Abbildung 2: Genomkarte von Adenoviren und davon abgeleiteter Vektoren

a Genomkarte humaner Adenoviren. Die frühen Transkriptionseinheiten E1a, E1b, E2a, E2b, E3, E4 und die Region der späten Gene sind in Transkriptionsrichtung dargestellt, die inversen terminalen Repetitionen (ITR) und das Verpackungssignal  $\psi$  sind gekennzeichnet.

b Genomkarte Adenovirus-abgeleiteter Vektoren der ersten Generation. Die E1-Region ist deletiert und ersetzt durch ein heterologes Gen, das Transgen. Die E3-Region kann zusätzlich deletiert sein.

c Genomkarte Adenovirus-abgeleiteter Vektoren. Sämtliche viralen kodierenden Sequenzen sind deletiert („Gutless-Vektoren“) und ersetzt durch ein Transgen sowie durch funktionlose Füllsequenzen („Stuffer“).

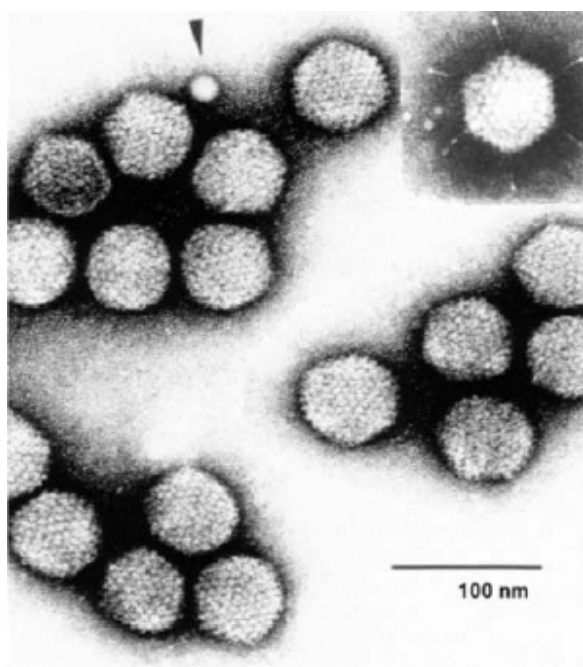
Abbildung modifiziert nach Robbins et al. (1998).

Adenoviren benötigen 32 - 36 Stunden für ihren Lebenszyklus. Dabei werden bis zu 1000-10000 infektiöse Partikel pro Wirtszelle unter optimalen Bedingungen hergestellt. Bei der Bindung des Virus an die Zielzelle spielt die Wechselwirkung der viralen Fiberproteine mit dem Coxsackievirus-adenovirus-Rezeptor (CAR) eine

Rolle (Bergelson et al., 1997; Russell, 2000). Nach der Anlagerung des Viruspartikels kommt es zu einer weiteren Interaktion, diesmal zwischen den Pentonbasisproteinen und den zellulären Integrinen, die als sekundäre Rezeptoren wirken und so die Internalisierung ermöglichen. So wird folgend der Viruspartikel über clathrinbedeckte Einstülpungen der Zellmembran in ein Endosom überführt (Mathias et al., 1998; Wang et al., 1998). Die Ansäuerung in den Endosomen führt zu einer Konformitätsänderung der Kapsidproteine, wodurch das "Uncoating" und somit die Freisetzung des Virus-Core in das Cytoplasma erfolgt (Greber et al., 1996). Bestimmte Signale (nuclear localization signals) der Core-Proteine erleichtern den Transport des Core über mikrotubuläre Transportmechanismen und Dynein in den Zellkern (Russell, 2000), die Kapside bleiben im Zytoplasma zurück (Leopold et al., 2000). Im Zellkern bleibt die virale DNA als Episom bestehen. Die Genexpression unterteilt man bei den Adenoviren in mehrere Phasen, deren chronologischer Ablauf essentiell ist. Jede Phase umfasst die aufeinander folgende Expression viraler Gene, von denen einige für Transkriptionsregulatoren codieren. Diese viralen Transkriptionsfaktoren regeln den korrekten Ablauf des Replikationszyklus der Adenoviren. Die Unterteilung erfolgt in eine sehr frühe, spätere frühe und späte Phase. Zunächst erfolgt in der sehr frühen Phase die Expression des E1-Gens, die von zellulären Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Die E1-Proteine aktivieren die Transkription der späten frühen Gene E1B, E2A, E2B, E3 und E4. Ein Komplex aus E1A und E1B unterdrückt die weitere frühe Genexpression, die sonst ungehemmt weiterlaufen und zum Zelltod führen würde, bevor komplette Viruspartikel hergestellt werden könnten. Die E2-Region codiert für Proteine, die an der viralen Replikation beteiligt sind, die etwa 6-8 Stunden nach der Infektion beginnt, ihr Maximum nach 18-20 Stunden erreicht und nach 24 Stunden beendet ist. Die Proteine der E3-Region sind für den viralen Replikationszyklus nicht essentiell, sie modulieren jedoch die Immunantwort unter anderem durch verminderte Präsentation von MHC-1 Antigenen an der Zelloberfläche sowie verminderte Empfindlichkeit gegenüber Tumornekrosefaktor (TNF). So werden weniger cytotoxische T-Zellen aktiviert (CTL) und die Zellen vor der Cytolyse durch aktivierte Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK) geschützt. Die Proteine der E4-Region sind in Kombination mit E1B-Genprodukten für den Transport viraler mRNA vom Nukleus in das Zytosol und der Hemmung des



Transports zellulärer mRNA verantwortlich. Sie beteiligen sich an der viralen Replikation und der Fertigstellung der Virionen. In der späten Phase werden Strukturproteine, die für den Zusammenbau und die Struktur des Kapsids notwendig sind, aus den Regionen L1-L5 exprimiert. Verpackungssequenzen der nukleären DNA initiieren den Zusammenbau der Core- und Kapsidstrukturen (Hearing et al., 1987). Die Replikation der DNA wird durch die virale DNA-Polymerase katalysiert, dessen Startsignal (origin) die ITR sind. Die an die 5' Enden der DNA kovalent gebundenen terminalen Proteine (TP) bieten unter anderem einen Schutz vor Exonukleasen und dienen der DNA-Polymerase als Primer (Rekosh et al., 1977; Hay et al., 1995; Lichy et al., 1982). Durch die unterdrückte Produktion zellulärer Proteine kommt es nach 30-40 Stunden zum Zelltod und damit zur Freisetzung der bis zu 10000 Virionen pro Zelle.



**Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Viruspartikeln**

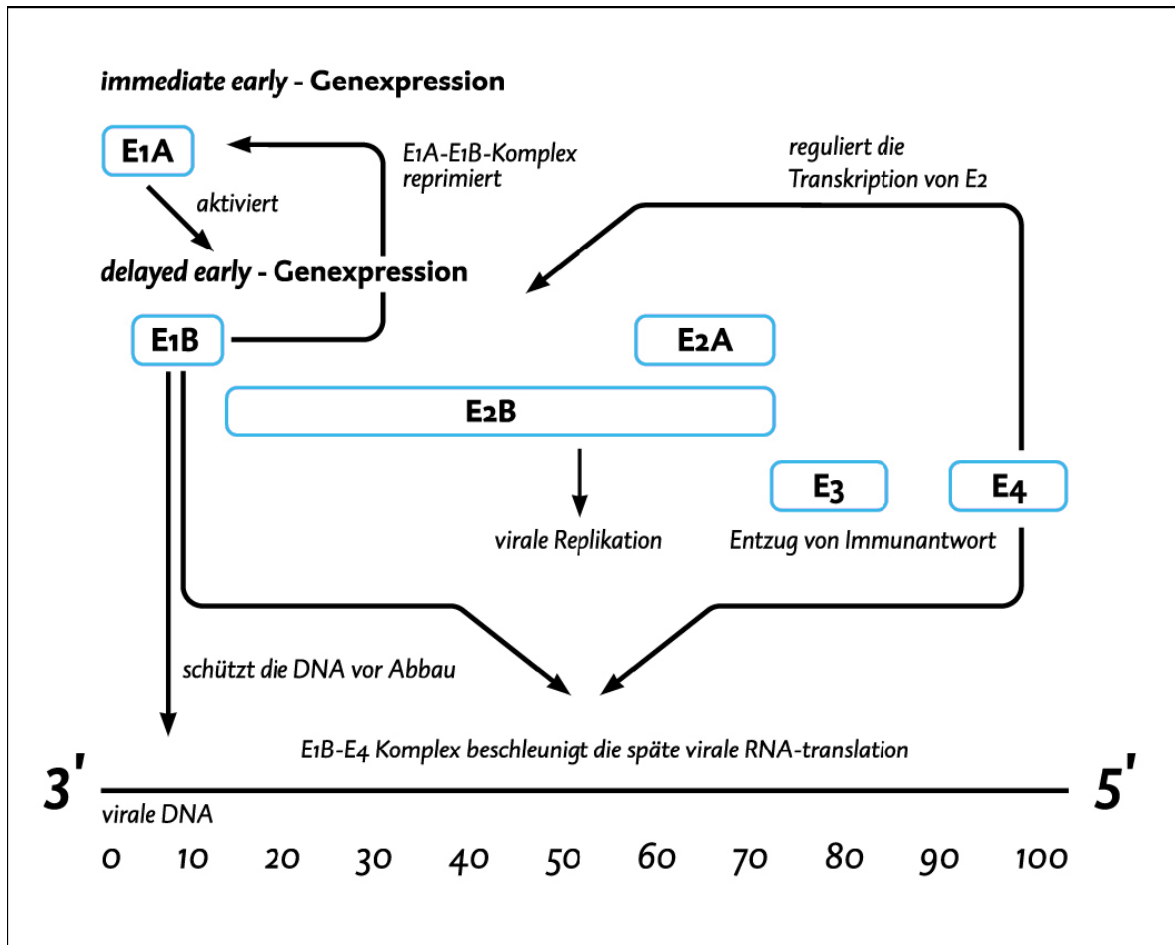


Abbildung 5: Zusammenfassung der wichtigsten Ereignisse der frühen Phase des adenoviralen Lebenszyklus (Abbildung modifiziert nach Günzburg und Salmons, 1997)

### 1.3.3 Adenovirale Vektoren

Rekombinante Adenoviren erhielten zunächst Aufmerksamkeit als geeignete Vektoren für den Transgen-Transfer in das Epithel des respiratorischen Traktes, beispielsweise für die Gentherapie der zystischen Fibrose. Schnell stellte man fest, dass es durch diese Vektoren bei einer Vielzahl von Anwendungsgebieten zu einer überdurchschnittlich effizienten Transgenexpression kommt (Benihoud et al., 1999; Kovesdi et al., 1997).

Adenoviren lassen sich leicht in großen Mengen und hohen Konzentrationen ( $<10^{13}$  Partikel/ml) in geeigneten Verpackungszelllinien herstellen, eine wichtige Eigenschaft für die Durchführbarkeit klinischer Studien. Mit einer Insertionsgröße für das Transgen von bis zu 8kb bei den Adenoviren der zweiten Generation und

bis zu 36kb bei den Adenoviren der dritten Generation sind sie auch hier anderen Vektoren überlegen. Problematisch, gerade bezüglich der Therapie metabolischer Erkrankungen, ist die rasch einsetzende Immunantwort und damit einhergehende Entzündungsreaktion gegen infizierte Zellen durch die Expression viraler Partikel und damit die zeitlich stark begrenzte Genexpression. Auch neutralisierende Antikörper, die bei vielen in der Bevölkerung vorhanden sind, können einen effektiven Gentransfer erschweren (Horwitz, 1996; Wilson, 1996). Um einerseits die Insertionsgröße für Transgene zu erhöhen und andererseits die Expression viraler Proteine und damit die Immunantwort zu minimieren wurden so Adenoviren unterschiedlicher Generationen entwickelt. Die Adenoviren der ersten Generation zeichneten sich durch eine Deletion des essentiellen E1-Gens aus, das für die Regulation der Expression der viralen Gene verantwortlich ist, und zusätzlich durch eine Deletion der nicht-essentiellen E3-Region. Die Viren sind replikationsdefizient, können die Zielzellen jedoch weiterhin effizient infizieren. Für die intrazelluläre Virusvermehrung wird die E1-Region durch entsprechende Verpackungszelllinien, zum Beispiel 293-Zellen, in-trans zur Verfügung gestellt. Adenoviren der zweiten Generation zeichnen sich durch zusätzliche Deletionen der E-2 und E-4-Regionen aus, die für die virale Translation, Transkription und Regulation zellulärer Funktionen zuständig sind. Durch diese Deletionen erhöht sich die potentielle Insertionsgröße der Transgene. Eine Reduktion der Immunantwort auf virale Proteine ist aber fraglich (Lusky et al., 1998). Die so genannten thermosensiblen Vektoren der zweiten Generation zeichnen sich u.a. durch eine Punktmutation der E-2 Region aus. Bei Basenpaar 1064 des für die virale DNA Synthese essentielle DNA-bindendene Protein codierende Gens, führt die Mutation (G zu A) zu einem Austausch von Prolin zu Serin, welcher das DNA-bindende Protein bei 37°C funktionsuntüchtig werden lässt (Channon and George, 1997). Auch Mutationen des DNA-Polymerase-Gens der E-2 Region (Chen et al., 1994) und die Deletionen der E-4 Region dienen neben der potentiellen Vergrößerung der Transgen-Insertionsgröße einer verminderten viralen Proteinsynthese und damit einhergehend einer fraglichen verminderten Immunantwort (Yang et al., 1994; Gao et al., 1996). Bei den neueren HC-Ad-Vektoren (high-capacity vectors) oder auch gutless vectors wurden sämtliche codierende virale DNA-Sequenzen bis auf die absolut essentiellen linken 400bp und rechten 120bp entfernt, die für die ITRs codieren und die Startpunkte für die

DNA-Replikation und das Verpackungssignal enthalten. Bei diesen Vektoren steigt die Insertionsgröße auf bis zu 36kb. Alle für die Virusreplikation und die Virushülle notwendigen Funktionen werden durch ein Helfervirus in-trans zur Verfügung gestellt (Mitani et al., 1995; Parks et al., 1996; Schiedner et al., 1998; Morsy und Caskey, 1999). Dieses Helfervirus enthält einen Defekt der Verpackungsdomäne, so dass nur selektiv die DNA des gutless-vectors in Virione verpackt wird. Die Herstellung dieser Vektoren ist bislang aufwendig. Der Vorteil liegt in der reduzierten Immunabwehr und damit in der längeren Transgenexpression, da die Vektoren keine viralen Funktionen mehr enthalten. So konnte zum Beispiel eine Expression des Alpha-Antitrypsin-Gens in Mäusen in supra-physiologischer Menge über mehrere Monate erzielt werden (Schiedner, 1998; Morral, 1998). Die Möglichkeit eine transiente Genexpression durch Integration der Transgene in das menschliche Genom durch Retroviren zu umgehen, birgt durch eine mögliche, aber sehr unwahrscheinliche Insertionsmutagenese wiederum die Gefahr der malignen Entartung (Check, 2002).

#### **1.3.4 Immunantwort auf adenovirale Infektion**

Limitiert wird die Verwendung adenoviraler Vektoren zur Therapie metabolischer Erkrankungen hauptsächlich durch die induzierte Inflammation, und die damit verbundene nur transiente Expression des Transgens. Zudem erfolgt nach Infektion die Ausbildung von spezifischen neutralisierenden Antikörpern, die eine erneute Administration des Adenovirus verhindert. Die Immunantwort nach adenoviraler Infektion wird in zwei Phasen unterteilt (Benihoud et al., 1997; Kovessi et al., 1999). Zunächst kommt es in den ersten ein bis vier Tagen nach Infektion zu einer polymorphonukleären Leukozyteninfiltration. Sowohl zytotoxische T-Lymphozyten als auch Natürliche Killerzellen sind in dieser Phase entscheidend beteiligt, mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Durch Prozessierung viraler Proteine auf der Oberfläche der MHC Klasse 1- Moleküle infizierter Zellen werden zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert, die über das Effektormolekül Perforin direkt und effektiv zytotoxisch wirken (Yang, 1995). MHC-Klasse 1-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus vorhanden und bestehen aus einer großen membranverankerten Untereinheit, einer kleinen

löslichen Untereinheit, dem  $\beta$ 2-Mikroglubulin und einem antigenischen Peptid. Dieses stellt ein Spaltprodukt von im Zytoplasma synthetisierten und durch das Proteasom gespaltenen Proteinen dar. Zytotoxische T-Lymphozyten können nur beim Vorliegen körperfremder Proteine an den Rezeptor binden und aktiviert werden (Selbsttoleranz). Nach Aktivierung werden verschiedenen Botenstoffe wie Tumor Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Granulozytenkoloniestimulierenden-Faktor (GM-CSF) ausgeschüttet und es kommt zur Synthese des Interleukin-2-Rezeptors. Durch diesen kann in Gegenwart von Interleukin-2 (IL-2) eine Proliferation der CD8<sup>+</sup>-T-Lymphocyten ausgelöst werden. Zudem bewirkt IFN- $\gamma$  eine Hochregulation der MHC Klasse 1-Moleküle und damit eine erhöhte Rezeptordichte (Yang et al., 1995; Skoskiewicz et al., 1985). Dieser Mechanismus wirkt immunmodulatorischen adenoviralen Steuerungsmechanismen durch Proteine der E3-Region entgegen. Das Glycoprotein gp19kDa bindet im Endoplasmatischen Retikulum nicht-kovalent mit den MHC Klasse1-Molekülen und hemmt deren Glycosidierung und Transport an die Zelloberfläche (Ginsberg, 1989). Durch diese verminderte Moleküldichte auf der Oberfläche schützt sich die infizierte Zelle vor zytotoxischen T-Lymphocyten, wird jedoch im Gegenzug anfälliger vor der Elimination durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), deren Aktivierung durch Bindung an MHC Klasse I-Moleküle über einen inhibierenden Rezeptor gehemmt wird (Lanier et al., 1998). Ein weiteres Glycoprotein, gp 14,7kDa, schützt die infizierte Zelle vor der durch TNF- $\alpha$  induzierten Lyse (Gooding, 1988). Durch Antagonisierung des TNF- $\alpha$  konnte eine verlängerte Transgenexpression gezeigt werden (Zhang, 1998). In der zweiten Phase, die ab dem fünften Tag post infectionem beginnt, werden CD4<sup>+</sup>-Lymphocyten über Prozessierung viraler Proteine durch MHC Klasse 2-Moleküle aktiviert. MHC Klasse 2-Moleküle werden von professionellen, antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, dazu zählen u.a. Monozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen. Nach Aufnahme extrazellulärer viraler Proteine werden diese über den MHC Klasse 2-Rezeptor präsentiert. CD4<sup>+</sup>-Lymphocyten werden in zwei Subpopulationen unterteilt. Die aktivierten T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF und Interleukin-2. Zudem können sie als zytotoxische Effektorzellen wirken (Yang, 1995). Die T<sub>H</sub>2-Zellen haben im aktivierten Zustand die Fähigkeit Antigene zu präsentieren und produzieren Interleukine wie IL4, IL5, IL6 und IL10. Sie sind in der Lage, B-Lymphocyten

spezifisch zu aktivieren und deren Proliferation mittels IL-4 zu fördern. Aktivierte B-Lymphozyten (Plasmazellen) produzieren als wichtigster Bestandteil der humoralen Immunantwort neutralisierende Antikörper, die eine erneute adenovirale Infektion limitiert (Yang, 1995; Yang, 1996).

## **1.4 Immunmodulatorische Proteine des Cytomegalievirus**

### **1.4.1 Allgemeine Einführung**

Im Laufe der Evolution haben Viren in Folge des Selektionsdruckes Strategien entwickelt, die Immunantwort des Wirtes zu beeinflussen. Für ihre Existenz ist die Replikation der Viren essentiell. Damit einhergehend werden in den Wirtszellen antigen-wirkende Proteine gebildet, die die Zellen für das Immunsystem angreifbar machen. Cytomegalieviren, gehörend zu den Betaherpesviridae innerhalb der Familie der Herpesviridae (Roizman et al., 1991), erreichen durch ein Gleichgewicht der Abwehrmechanismen des Wirtes mit den eigenen immunmodulatorischen Eigenschaften eine lebenslange Persistenz im Wirt. Der Vorteil dieser Persistenz und der Möglichkeit des sporadischen Auftretens einer klinisch manifesten Infektion besteht in der Optimierung der Effizienz der Transmission zu neuen Wirten. Viele Viren der Herpesgruppe, der Adenoviren und Poxviren bedienen sich ähnlicher Mechanismen der Immunabwehr, eine Tatsache die zum Verständnis der unterschiedlichen Funktionen vieler Gene maßgeblich beigetragen hat. Humane und murine Cytomegalieviren beeinflussen die Immunantwort des Wirtes auf verschiedenen Ebenen, so durch Modulation der major histocompatibility complex (MHC)-Proteine, der Aktivierung und Migration von Leukozyten, der Induktion des programmierten Zelltodes infizierter Zellen, der Aktivität von Interleukinen, Interferonen und Antikörpern. Dabei sind bei vielen Genprodukten Homologien zu zellulären Immunkomponenten zu erkennen, bei anderen spielen eigenständige Mechanismen eine Rolle. Zwei unterschiedliche Ansatzpunkte in der Immunmodulation des murinen CMV stellen dabei die Produkte der Gene m144 und m131/129 dar und sind Gegenstand dieser Arbeit. Die Koexpression dieser Gene wird dabei über eine Cap-unabhängige „internal ribosomal entry site“ (IRES) initialisiert, wobei ohne weitere Faktoren die

Proteinsynthese durch Bindung an Ribosomen gestartet werden kann (Hellen und Sarnow, 2001; Johannes und Sarnow, 1998). Üblicherweise tragen zelluläre mRNA's an Ihrem 5' Ende ein spezielles angebundenes Nukleotid, die 5'-Cap-Struktur, um mit weiteren zellulären Faktoren die Bindung an Ribosomen zu vermitteln. Die mRNA wird strangabwärts gescannt bis ein Start-Codon erreicht wird, um mit der Proteinsynthese zu beginnen (Pestova et al., 2002). Durch die IRES ist die Proteinsynthese von diesem komplexen Steuerungsmechanismus ausgenommen.

#### **1.4.2 Funktion des MHC-Klasse 1 Homologons m144**

Nach Infektion der Wirtszelle durch das murine CMV erfolgt virusinduziert eine verminderte Expression der konventionellen MHC-Klasse 1 Moleküle auf der Oberfläche der Zellen (Browne et al., 1990). Dadurch wird die Prozessierung viraler zytoplasmatisch degradiertes Proteine auf der Zelloberfläche herabgesetzt und die infizierte Zelle vor der Erkennung und Elimination durch zytotoxische T-Zellen geschützt (Townsend et al., 1989). Die verminderte MHC-Klasse 1 Moleküldichte auf der Zelloberfläche macht die Zelle jedoch anfällig für die Lyse durch NK-Zellen, deren inhibierende Rezeptoren nur durch ein adäquates Level der MHC-Komplexe stimuliert werden und es zu einer vermehrten Stimulation der aktivierenden Rezeptoren, getriggert durch non-MHC-Moleküle kommt (Lanier et al., 1997). Um sich sowohl vor zytotoxischen T-Zellen, als auch vor NK-Zellen zu schützen, codieren sowohl das humane als auch das murine CMV für ein MHC-1-Homologon, UL18 und m144. Die Gensequenz des in dieser Arbeit verwendeten murinen m144 ist am Ende des ca. 230kbp umfassenden Genoms lokalisiert und codiert für ein transmembranöses Protein, dessen Aminosäuresequenz der extrazellulären Region zu 25% mit der Sequenz des murinen MHC-Komplexes übereinstimmt (Rawlison et al., 1996). Es besteht ebenfalls aus einer membranösen schweren Kette, die mit einer Leichtkette,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, assoziiert ist, jedoch keine endogenen Peptide bindet (Chapman et al., 1998). Durch das MHC-1-Homologon m144 wird die NK-Zell-vermittelte Lyse der infizierten Zellen herabgesetzt (Cretney et al., 1999; Farrell et al., 1997). Die Wirkung wird dabei über einen inhibierenden Rezeptor der NK-Zellen vermittelt,

der nicht identisch ist mit dem physiologisch MHC Klasse I- bindenden inhibierenden Rezeptor (Kubota et al., 1998).

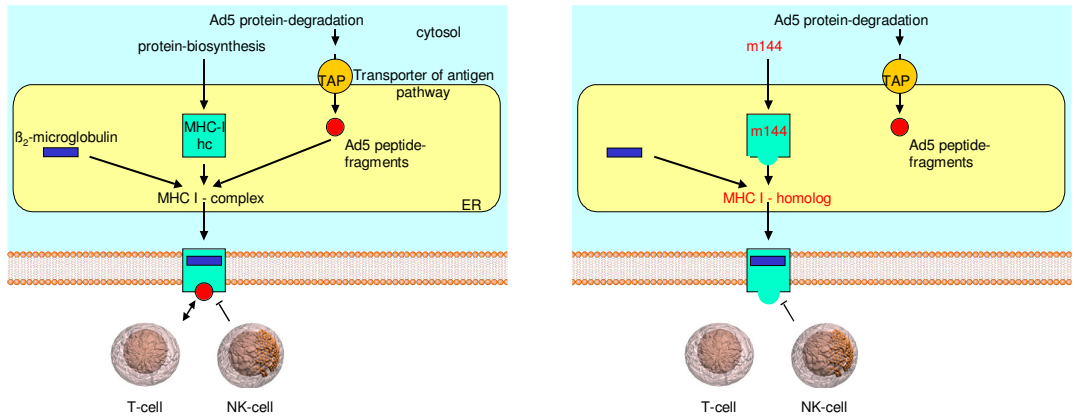


Abbildung 6: Funktion des MHC I-Homologen m144

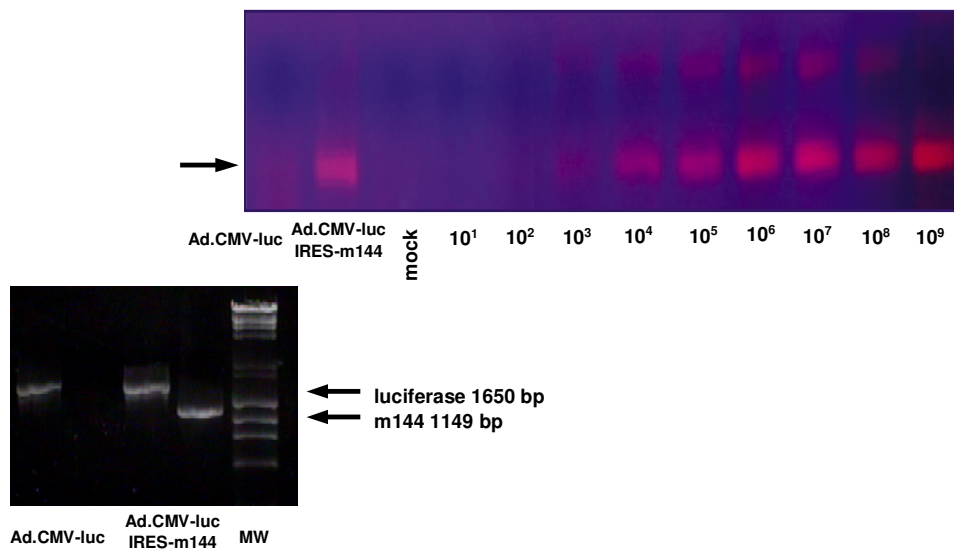


Abbildung 7: Nachweis der m144 cDNA (PCR) und mRNA RT-PCR (35x)



### 1.4.3 Funktion des CC-Chemokin Homologon m131/129

Chemokine gehören zu einer großen Superfamilie der chemo-attraktiven Cytokine, die eine wichtige Rolle bei der frühen inflammatorischen Antwort des Wirtes gegen eine Vielzahl von viralen, bakteriellen, fungiziden und mykobakteriellen Pathogenen spielen (Schluger et al., 1997). Sie modulieren unter anderem die Chemotaxis von Leukozyten und die Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen und fördern die Diapedesis und Infiltration der Leukozyten zur inflammatorischen Region (Schall et al., 2003). Klassifiziert werden sie in Abhängigkeit des Arrangements und der Positionen ihrer amino-terminalen Cystein-Enden (C, CC, CXC, CX3C, X für eine beliebige Aminosäure) und wirken an den Zielzellen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Schluger et al., 1997). Das murine Cytomegalievirus (mCMV) codiert für ein  $\beta$ -(C-C) Chemokin-Homologon von 81 Aminosäuren, genannt m131 oder MCK-1 (MacDonald et al., 1997). Durch Spleißen des 3' Endes zur strangabwärts angrenzenden Open Reading Frame (ORF) m129 entsteht ein neues Genprodukt, MCK-2, mit einer Größe von 31kDa, bestehend aus 280 Aminosäuren (MacDonald et al., 1999). Damit ist dieses Protein größer als alle bisher bekannten zellulären CC-Chemokine, die eine Größe zwischen sieben und 15 kDa aufweisen. Postuliert wird ein Chemokin-agonistischer, proinflammatorischer Effekt des MCK-2 durch Rekrutierung mononukleärer Leukozyten zu den Zielorganen der primären Virämie nach den ersten zwei Tagen nach Infektion mit folgender erleichterter Dissemination zu den Speicheldrüsen ab dem fünften Tag nach Infektion, den Orten der überwiegenden Replikation und Persistenz. Zugleich interferiert MCK-2 mit NK-Zellen und T-Lymphozyten mit der Folge einer erschwerten Elimination (Fleming et al., 1999; Saederup et al., 2001).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Agarose (Gelelektrophorese)	(Merck)
Agarose, Sea Plaque	(Biozym)
Ammoniumchlorid	(Merck)
Borsäure	(Merck)
Bromphenolblau	(Merck)
Calciumchlorid-Dihydrat	(Merck)
Cäsiumchlorid	(Gibco)
Cell Culture Lysis Reagent 5x	(Promega)
N,N-Dimethylformamid	(Merck)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Merck)
Dithiothreitol (DTT)	(Gerbu)
EDTA	(Merck)
Ethanol abs. p.A.	(Merck)
Ethidiumbromid	(Merck)
Ethylendiamintetraessigsäure	(Merck)
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galacto-Pyranosid (X-Gal)	(Merck)
Ficoll 400	(Merck)
Gel Extraction Kit	(Qiagen)
Glucose	(Merck)
Glutaraldehyd	(Merck)
Glycerin, wasserfrei	(Merck)
Hefeextrakt	(Merck)
HOPE-Fixierlösungen	(DCS)
Isopropanol	(Merck)
Kaliumacetat	(Fluka)
Kaliumchlorid	(Merck)
Kaliumhexacyanotarrat(II)-Trihydrat	(Merck)
Kaliumhexacyanotarrat(III)	(Merck)

Kaliumhydroxid	(Merck)
Kaliumferricyanid ( $K_3Fe[CN]_6$ )	(Merck)
Kaliumferrocyanid ( $K_4Fe[CN]_6$ )	(Merck)
Luciferase Assay Kit	(Promega)
Natriumchlorid	(Baker)
Di-Natriumcarbonat	(Merck)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck)
Di-Natrium-hydrogenphosphat-dihydrat	(Merck)
Natriumhydroxid	(Merck)
Natriumacetat	(Merck)
PCR Purification Kit	(Qiagen)
Plasmid Preparation Maxi Kit	(Qiagen)
Tris (Hydroxymethylaminomethan)	(Gibco)
Triton-X-100	(Fluka)
Tryptonwasser	(Merck)
Trypanblau	(Merck)
Xylenecyanol	(Merck)

### 2.1.2 Enzyme

Schrimps Alkalische Phosphatase	(Roche)
T4 DNA Ligase	(Roche)
T4 DNA Polymerase	(Invitrogen)

### 2.1.3 Molekulargewichtstandards, dNTP, Proteine und Antikörper

DNA-Marker II	(Roche)
DNA-Marker VII	(Roche)
dATP	(Roche)
dGTP	(Roche)
dCTP	(Roche)
dTTP	(Roche)

Oligonukleotide für Sequenzierungsreaktionen	(MWG-Biotech)
BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix	(Applied Biosystems)
2,5x Sequencing Buffer	(Applied Biosystems)
rekombinante Luciferase	(Promega)

#### 2.1.4 Labormaterialien

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

Dialysemembranen Slide-A-Lyzer	(Pierce)
Einwegspritzen 1 ml, 10 ml, 50 ml	(Braun, Melsungen)
Sterilfilter, Porenweite 0,22 µm	(Schleicher & Schuell)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	(Eppendorf)
Pipetten (2 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	(Gilson)
Pipetten 8- und 12 fach Multichannel	(Eppendorf)
Ultrazentrifugenröhrchen ultra clear, 14 x 95 mm	(Beckman)

#### 2.1.5 Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Vertrieb/Klonierung
pBHG-10	Ampicillin	F. Graham, McMaster University., Hamilton, ON, Canada
pBluescript II KS (+)	Ampicillin	Stratagene
pBluescript-m131/129	Ampicillin	Klonierung
pIRES	Ampicillin	Clontech
pIRESm131/129	Ampicillin	Klonierung
pGL3basic	Ampicillin	Promega
plucIRESm131/129	Ampicillin	Klonierung
pAd.CMV-pA	Ampicillin	Labor
pAd.CMV.lucIRESm131/129	Ampicillin	Klonierung

**Tabelle 3: Verwendete Plasmide**

### 2.1.6 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium with high Glucose (HGDMEM)	(Gibco)
Modified Eagle Medium 2x	(Gibco)
Waymouth's	(Gibco)
Fetal Bovine Serum	(Gibco)
Horseserum	(Gibco)
Penicillin/Streptomycin (100x)	(Gibco)
L-Glutamin 200 mM (100x)	(Gibco)
Dulbecco's Phosphate-buffered salin w/o Ca Mg, (PBS)	(Gibco)
HEPES (Konz.)	(Gibco)
RPMI 1640	(Gibco)
Trypsin-EDTA	(Gibco)

### 2.1.7 Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Beschreibung	Nährmedium	Bezug
<b>293</b>	humane embryonale Nierenkarzinomzellen, die stabil mit den Basenpaaren 1 - 4344 des adenoviralen Genoms transfiziert ist (Graham <i>et al.</i> , 1977)	HGDMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep, , 10 mM HEPES	ATCC (CRL-1573)
<b>HepG-2</b>	Humane Hepatoblastomzelllinie, etabliert aus einem Biopsat eines 15Jährigen (Aden <i>et al.</i> , 1979)	5:1 Verhältnis MEM und Waymouth's, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep	ATCC (HB-8065)
<b>Cos-7</b>	Nierenzelllinie des afrikanischen Grünaffen, mit SV40 Mutante transformiert (Gluzman 1981)	HGDMEM, 4 mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep, 1,5 g/L Natrium Bikarbonat, 10 % FCS	ATCC (CRL-1651)

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

### 2.1.8 Hergestellte Medien, Lösungen und Puffer

#### pH Puffer:

10x TE-Puffer pH 7,6	100 mM Tris-Cl (pH 7,6); 10 mM EDTA (pH 8,0)
10x TE-Puffer pH 8,0	100 mM Tris-Cl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0)
Tris-Cl (1 M) pH 7,6/8,0	121,1 g Tris Base in 1 l H <sub>2</sub> O pH Einstellung mit HCl
HEPES buffered saline	5 g HEPES, 8 g NaCl, 0,37 g KCl, 0,125 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O, 1 g Glucose, H <sub>2</sub> O ad 1 l Aqua dest.

#### Elektrophoresepuffer:

0,5x TBE	45 mM Tris-Borsäure; 1 mM EDTA
6x Gel Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 15% (w/v) Ficoll 400

#### Virus-Dialysepuffer:

Dialysepuffer	10 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 % Glycerol
---------------	--

X-Gal-Färbelösung (2% w/v)	1,3 mM MgCl <sub>2</sub> , 3 mM NaCl, 3 mM Kaliumhexacyanotarrat(II)-trihydrat, 3 mM Kaliumhexacyanotarrat(III), 2,5% X-gal-Lösung (bestehend aus 20 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- b-D-Galacto-Pyranosid in 1 ml N,N- Dimethylformamid) und 44 mM HEPES pH 7,3
Trypanblaulösung	0,5% (w/v) Trypanblau und 0,9% NaCl in PBS lösen
Glutaraldehyd (0,5%)	in PBS angesetzt
Stufengradientlösung A (1,5 g/ml CsCl Lösung)	30 g CsCl in 42,5 ml PBS; Einstellung mit PBS auf 1,5 g/ml (maximale Toleranz: 0,005 g/ml)

Stufengradientlösung B (1,35 g/ml CsCl Lösung)	35 ml der 1,5 g/ml CsCl Lösung und 14 ml PBS; Einstellung mit PBS auf 1,35 g/ml; (maximale Toleranz: 0,005 g/ml)
Stufengradientlösung C (1,25 g/ml CsCl Lösung)	11 ml der 1,35 g/ml CsCl Lösung und 9 ml PBS; Einstellung mit PBS auf 1,25 g/ml; (maximale Toleranz: 0,005 g/ml)
1 % Agaroselösung	1 g Agarose pro 100 ml Aqua dest. autoklavieren
2x Modified Eagle's Medium + Zusätze	2x MEM, 200 mM Glutamin, 2 % Pen/Strep., 5 % Hefeextrakt, 10 % Horseserum, 1 M HEPES
Agarose-Nährmediumgemisch	1:1 Gemisch aus 1 % Agaroselösung und 2x Modified Eagle's Medium + Zusätze

### 2.1.9 Geräte

Auflichtmikroskop	(Hund)
Autoklav Sandoclav	(Wolf)
Brutschränke Bakterienkulturen	(Köttermann)
Brutschränke Zellkultur Hera Cell	(Heraeus)
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT und Power Pack 300	(BioRad)
Feinwaage HR-120	(AND)
Luminometer Lumat LB 9507	(EG&G Berthold)
Magnetrührer	Cenco)
Neubauer-Zählkammer	(Labor Optik)
PCR-Thermozykler PCR Sprint	(ThermoHybaid)
pH-Meter pH 358	(WTW)
Schüttler 3005	(GFL)

Spektrophotometer SmartSpec 3000	(BioRad)
Sterilwerkbank HeraSafe	(Heraeus)
Tischzentrifuge Biofuge pico	(Heraeus)
Ultrazentrifuge Typ L7-35	(Beckman)
UV-Kammer für Gelanalyse und Software Gel Doc 2000	(BioRad)
Vortexer	(Braun)
Wasserbad	(Braun)
Zentrifuge Type 5804R	(Eppendorf)

## **2.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **2.2.1 Sterilisation**

Hitzestabile Nährlösungen und Gerätschaften wurden in heißem Wasserdampf in dem Autoklaven Sandoclav der Firma Wolf bei 121 °C und 2,05 bar für mindestens 30 Minuten sterilisiert. Lösungen mit hitzesensitiven Stoffen wurden mit einem Spritzenvorsatzfilter mit der Porengröße 0,22 µm (Qualilab), bzw. mit dem Millipore Vakuumfilter (Stericup), steril filtriert. Bei der Arbeit mit Zellkulturen produzierter infektiöser Flüssigabfall wurde in einer 5 Liter Flasche mit NaOH-Pellets (1 Esslöffel) gesammelt und vor der Entsorgung autoklaviert.

### **2.2.2 Wasser**

Wasser wurde mit einem Destillator Bi-Dest 2304 von der Firma GFL Burgwedel doppelt destilliert und autoklaviert oder sterilfiltriert verwendet. Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen) wurde für die Zellkultur verwendet.

### **2.2.3 Restriktionsverdau**

Pro 1 µg DNA wurden 10 units des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 50 µl verwendet. Restriktionsendonukleasen hydrolysieren



doppelsträngige DNA sehr spezifisch an meist palindromen Sequenzen. Sie erzeugen entweder überhängende Enden (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends). Die Wahl des Reaktionspuffers und gegebenenfalls der Zusatz von BSA erfolgten nach Angaben des Herstellers. Es folgte eine 1 stündige Inkubation bei 37°C. Durch den Restriktionsverdau konnten gezielt DNA-Fragmente gewonnen werden oder kompatible DNA-Enden für folgende Ligationen generiert werden.

#### **2.2.4 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen**

Um DNA für weitere Reaktionen oder Transfektionen von Enzymen zu trennen, die nachfolgende enzymatische Reaktionen störend beeinflussen können, wurde ein PCR Purification Kit gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

#### **2.2.5 Auffüllen überhängender Enden (Blunten)**

Liegen zwei zu ligierende DNA-Fragment mit nicht kompatiblen Enden vor (sticky end), so können diese vor der Ligation aufgefüllt werden.

Hierzu wurde die T4 DNA Polymerase verwendet, die eine 3'→5' Exonukleaseaktivität, sowie in Gegenwart hoher Konzentrationen ATP, TTP GTP und CTP, sowie Mg<sup>2+</sup> zusätzlich eine 5'→3' Polymerase Aktivität aufweist (Richardson et al., 1964). Dies führt an beiden Enden des DNA Fragments zum Auffüllen der überhängenden Enden. Die Reaktionsbedingungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **2.2.6 Dephosphorylieren des 5' Endes eines DNA –Fragmentes**

Um die Rezirkulation und Selbstligation restriktionsverdauter Plasmid DNA in einer blunt end-Ligation zu reduzieren kann mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase der 5' Phosphatrest des linearisierten Plasmids entfernt werden (Seeburg et al., 1977; Ullrich et al., 1977).

Zu diesem Zweck wurde bei allen blunt end-Ligationen der linearisierte Vektor für 1 Stunde bei 37°C mit der Schrimps Alkalischen Phosphatase gemäß den Angaben des Herstellers inkubiert und die Phosphatase anschließend hitzeinaktiviert.

### **2.2.7 Ligation von DNA -Fragmenten mit „sticky-ends“**

Um ein DNA Fragment in ein durch Restriktionsenzyme geöffnetes Plasmid einzufügen, müssen die beiden aufeinander passenden Enden durch Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und den 5'- Phosphatenden an beiden Strängen verknüpft werden. Diese Reaktion wird durch die T4 DNA Ligase katalysiert (Weiss, 1968).

Es wurden molare Verhältnisse zwischen Plasmidvektor und DNA Fragment von 1:0; 1:1; 1:3; 1:5 und 1:10 verwendet. Die DNA Konzentration betrug in einem 10 µl Reaktionsvolumen < 10 ng/µl. Die T4 DNA Ligase sowie der Ligase Puffer wurden nach Angaben des Herstellers hinzugefügt und die Ansätze für 4 Stunden bei 20°C inkubiert.

### **2.2.8 Ligation von DNA –Fragmenten mit „blunt-ends“**

Für diese Ligationsreaktion wurde das Protokoll für DNA mit überhängenden Enden modifiziert. Es wurden die gleichen molaren Verhältnisse zwischen Plasmid und DNA Fragment verwendet. Die DNA Konzentration betrug jedoch in einem Reaktionsvolumen von 5-10 µl 1-5 ng/µl. Die T4 DNA Ligase wurde in einer Konzentration 100 U/ml hinzugefügt und die Reaktionsansätze mit 10% 10x Ligasepuffer 5 Stunden bei 33°C inkubiert (nach Bercovich et al., 1992).

### **2.2.9 Transformation in kompetente Escherichia coli-Bakterien**

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wird diese in E. coli Bakterien überführt und in diesen vermehrt. Die Transformation von Plasmid-DNA in dazu kompetente Escherichia coli (DH5alpha, supercompetent cells (Gibco)) erfolgt durch Anlagerung des Plasmids an die Zellmembran des Bakteriums und folgender Einschleusung durch eine Temperatur abhängige Steigerung der Permeabilität (Hanahan, 1983).

Auf 50 µl kompetenter Bakterien wurden 30 ng zu transformierende Plasmid DNA hinzugefügt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden in einem 42°C Wasserbad. Anschließend wurden die Ansätze für 1-2 Minuten auf Eis gelagert und dann für 45 Minuten in 800 µl SOC Medium bei 37°C kultiviert. Zur Selektionierung wurden 200 µl des SOC Mediums auf eine 90 mm Agarmediumplatte überführt, die Ampicillin der Konzentration 100 µg/ml enthielten. Nach 18-20 Stunden können die Kolonien der transformierten Klone durch Inokulation von ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/ml) weiter vermehrt und die Plasmide nach Präparation durch einen Restriktionsverdau getestet werden.

### **2.2.10 Kryokonservierung von Bakterien**

Die Konservierung transformierter Bakterien erfolgt unter Zugabe einer 7%igen DMSO-Lösung. Nach 1-stündiger Lagerung auf Eis wurden die Bakterien bei -80°C gelagert.

### **2.2.11 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse**

Die Isolierung von Plasmid-DNA gliedert sich in Anzucht und Lyse der Bakterien und anschließende Reinigung der freigesetzten DNA (Birnboim, 1979). Die Anzucht erfolgte je nach erforderlicher DNA-Menge in 3-5 ml (Minipräparation) bzw. in 1 l (Maxipräparation) LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin für ca. 16 Stunden bei 37°C ( $OD_{600} = \sim 1,6$ ) im Brutschrank.

Die alkalische Lyse wurde gemäß den Angaben der Firma Qiagen mit Hilfe der Pufferlösungen P1, P2 und P3 durchgeführt.

Die Aufreinigung erfolgte bei der Minipräparation durch eine Alkoholfällung, indem zunächst die bei der Lyse ausgefallenen Proteine, Zellwandreste und chromosomale DNA bei 8000-12000 rpm abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde nun mit der doppelten Menge Ethanol ausgefällt, erneut zentrifugiert (10000-12000 rpm; 10-13 Minuten; 4°C), mit 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in 0,1x TE Puffer (pH 7,6) aufgenommen.

Bei der Maxipräparation wurde, um den Reinheitsgrad der DNA für eine Transfektion eukaryotischer Zellen zu erhöhen, die Aufreinigung über eine Qiagen-tip 500-Säule nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt und anschließend mit Alkohol ausgefällt.

### **2.2.12 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung unterschiedlich großer, durch einen Restriktionsverdau erzeugter DNA Fragmente, aufgrund ihrer größenabhängigen Wanderungsgeschwindigkeit durch ein Agarosegel in einem elektrischen Feld. Es wurde in 0,5x TBE Puffer eine 1%ige Agaroselösung angesetzt, die mit 500 ng/ml Ethidiumbromid versetzt wurde. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und emittiert nach Anregung im UV-Bereich Licht im sichtbaren Bereich (Waring, 1965). Bei dem Laufpuffer handelte es sich ebenfalls um 0,5x TBE Puffer. Die DNA-Lösungen wurde mit 10% Gel-Ladepuffer gemischt, in vorgeformte Lauftaschen eingebracht und bei 80 – 120 V aufgetrennt, anschließend fotografiert und elektronisch weiterverarbeitet. Zur Vergleichbarkeit der Größen der einzelnen DNA-Fragmente wurden zusätzlich zu den Proben standardisierte Gemische einzelner DNA-Fragmente eingesetzt (molecular weight marker II und VII).

### **2.2.13 Isolierung einzelner DNA -Fragmente aus Agarose-Gelen**

Bei der Isolierung einzelner Fragmente werden größere Mengen an DNA in die Lauf Taschen des Agarose-Gels eingebracht und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Durchleuchtung werden die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers mit dem Gel Extraction Kit aufgereinigt.

### **2.2.14 Endotoxinaufreinigung**

Lipopolysaccharide (Endotoxine), die bei der Präparation von Plasmid-DNA anfallen, können einen toxischen Effekt auf menschliche Zellen haben, und mit Hilfe von Triton X 114 Extraktion entfernt werden (Cotten et al., 1994). Das Prinzip dieser Extraktion beruht auf einer Phasentrennung von hydrophilen und amphiphilen Molekülen (Bordier, 1981).

Die DNA-Lösung wurde mit 3 M Natriumacetatlösung (pH 7,5) auf eine 0,3 M Natriumacetatlösung eingestellt. Diese Lösung wurden mit 3% Triton X 114 versetzt, das vorher einem dreimaligen Temperaturwechsel von 0°C auf 30°C unterzogen wurde, und die wässrige Phase nach Zentrifugation (2 min.; 30°C; 200 rpm) vorsichtig abpipettiert. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt und die DNA anschließend aus der wässrigen Phase durch Alkoholfällung weiter aufgereinigt.

### **2.2.15 Absorptionsmessung**

Um die Konzentration von DNA zu messen wurden 5 µl der Probe mit 95 µl dest. Wasser verdünnt und in einer Glasküvette photometrisch bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm durchleuchtet. Dieses Verfahren dient neben der Konzentrationsbestimmung auch den Grad an Proteinverunreinigung der Probe zu ermitteln, die sich aus dem Quotienten der optischen Dichte beider Wellenlängen errechnet. Da aromatisierte Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280nm absorbieren, sollte der Quotient den Wert 1,8 nicht unterschreiten.

## **2.3 Arbeiten mit Zellkulturen**

### **2.3.1 Kultivierung von 293-, cos und HepG2-Zellen**

Alle Zelllinien wurden als Monolayer auf 144mm Platten der Firma Greiner mit jeweils 20ml der entsprechenden Nährmedien kultiviert und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 96% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für ein optimales Wachstum wurde das Kulturmedium alle 3 Tage nach vorsichtigem Absaugen gewechselt. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80% erfolgte das Splitten. Hierbei wurden die Zellen zunächst nach dem Absaugen des Mediums mit 5ml PBS durch vorsichtiges Schwenken der Platten gewaschen. Nach erneutem Absaugen wurden 3ml, auf 37°C erwärmtes Trypsin-EDTA zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von, je nach Zelllinie, 3-5 Minuten, ließen sich nun die Zellen leicht von der Platte herunterpipettieren und in ein mit Nährmedium gefülltes 50 ml Falcon-Tube überführen. Die Menge des Nährmediums sollte dabei mindestens die dreifache Menge des insgesamt verwendeten Trypsins betragen, da nur so die zelltoxische Wirkung neutralisiert werden kann. Anschließend wurde das Falcon-Tube für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes im Nährmedium resuspendiert und auf neue Platten im Verhältnis 1:4 verteilt. Um eine zelltoxische Wirkung eventuell verbliebenen Trypsins zu verhindern erfolgte nach einer Inkubationszeit der Zellen von mindestens 12 Stunden und erfolgter Adhäsion ein erneuter Wechsel des Mediums.

### **2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur längerfristigen Lagerung können Zelllinien eingefroren werden. Für das Einfrieren von Zellen wurden zu 80-90% konfluent bewachsende 144mm Platten wie beschrieben gesplittet. Das nach der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde pro Platte in 4 ml Einfriermedium der Firma Gibco resuspendiert und in Kryotubes zu je 1 ml aliquotiert. Um ein zellschonendes Einfrieren der Bakterien auf -80°C zu ermöglichen, wurden die Kryotubes zunächst in eine bei -20°C

gelagerte, mit Ethanol gefüllte Trommel überführt, die ein langsames Absinken der Temperatur ermöglicht.

Beim Auftauen von Zellen wurden diese durch ein 37°C Wasserbad erwärmt und auf, mit 20 ml entsprechendes Nährmedium versetzte, 144mm Platten pipettiert. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Zellen für mindestens 12 Stunden inkubiert, dann erfolgte ein Mediumwechsel um Reste des Einfriermediums gänzlich zu entfernen.

### **2.3.3 Zellzählung**

Zur Zellzahlbestimmung wurden 90 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt und für 5 min inkubiert. Die Auszählung erfolgte in der Neubauer Zählkammer, in der vitale Zellen durch Ausschleusung des Farbstoffes weiss bleiben. Dadurch konnte auch der Vitalitätsgrad der Zellsuspension bestimmt werden, da tote Zellen blau erscheinen.

## **2.4 Spezielle molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **2.4.1 Klonierung des adenoviralen Expressionsplasmids pAd.CMV.luc.IRES.m131/129**

Adenovirale Expressionsplasmide enthalten Teile des adenoviralen Genoms, die eine Multiple Cloning Site (MCS) umschließen, welche die Möglichkeit bietet verschiedene Fragmente zu inserieren. Durch Rekombination der Expressionsplasmide in 293-Zellen lassen sich adenovirale Vektoren generieren, die somit Träger dieser Fragmente sind.

Für die Klonierung des adenoviralen Expressionsplasmids pAd.CMV.luc.IRES.m131/129 wurde zunächst mittels Xba I und EcoR I das m131/129 aus dem pAd.m131/129.pA, welches freundlicherweise von Hellen E. Farrell, University of Western Australia, zur Verfügung gestellt wurde, isoliert und in die entsprechenden Xba I und EcoR I Schnittstellen des pBlueScript kloniert (sticky). Durch Verdau mit erneut Xba I und nun Sal I wurde das m131/129 erneut

herausgeschnitten und mittels Gelelektrophorese isoliert und aufgereinigt. Das nunmehr am 3'-Ende modifizierte m131/129 ließ sich jetzt in die entsprechenden Xba I und Sal I Schnittstellen der MCS II des verdauten pIRES einfügen (sticky). Im zweiten Schritt erfolgte das Einfügen des Luciferase-Gens in die MCS I des entstandenen pIRES.m131/129. Dazu wurde das Luciferase-Gen mittels Nhe I und Xba I aus pGL3basic isoliert und wieder durch Gelelektrophorese isoliert und aufgereinigt und folgend in die Nhe I site der MCS I kloniert. Abschließend wurde das luc.IRES.m131/129-Konstrukt durch Nhe I- und EcoR-Verdau isoliert und beidseits blunt-end in die EcoR V-site des pAd.CMV.pA kloniert. Sämtliche Produkte aller Klonierungsschritte wurden durch geeignete Kontrollverdaus überprüft.

#### **2.4.2 Transfektion und Lyse von cos-Zellen**

Die Transfektion der cos-Zellen diente der Funktionsbestimmung des pAd.CMV.luc.IRES.m131/129 durch den quantitativen Nachweis der Luciferaseexpression mittels Luciferaseassay. Die cos-Zellen wurden auf six-well-plates mit 200000 Zellen pro well ausgesät und über Nacht inkubiert, so dass eine Konfluenz am Folgetag von 80-90% erreicht war. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml pro well Komplettmedium ohne fetales Kälberserum (FCS) versetzt. Zu 25 µg des Proben-Plasmids wurden 100 µl CaCl<sub>2</sub> zugesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Pro well erfolgte nun die Zugabe von 1000 µl HeBS und eine Inkubation von einer Minute unter leichtem Schwenken bevor tröpfchenweise der DNA-Mix aufpipettiert wurde. Dabei wurden drei wells pro six-well-plate mit dem zu testenden Plasmid versetzt und die weiteren drei wells mit einer Negativkontrolle ohne Plasmid-DNA. Anschließend wurden die Zellen erneut für 4,5 Stunden inkubiert. Nach Absaugung des Mediums wurden die wells mit 1 ml RPMI/10% DMSO versetzt und für 2 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte eine Inkubationszeit von 48 Stunden nach Zugabe von 2,5 ml Komplettmedium mit FCS. Für die Ernte der transfizierten Zellen wurden diese nach Absaugen des Mediums und Zugabe von 1 ml PBS gleichmäßig mittels eines cell-scraper abgekratzt und in ein Eppendorf-tube überführt. Nach Zentrifugation bei 3000 rpm



für 5 min bei 4°C wurde das Zell-pellet durch Zugabe von Cell-Culture-Lysis-Reagenz lysiert und erneut bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für den folgenden Luciferaseassay verwendet und bei -80°C eingefroren und gelagert.

### **2.4.3 Luciferaseexpressionstest der transfizierten Zellen**

Der Luciferaseassay dient der groben Quantifizierung der Genexpression in transfizierten Zellen. Die hier verwendete Luciferase ist eines zu diesem Zweck häufig verwendetes Reporter-gen (Naylor, 1999), welches auch in der Natur in Leucht-käfern vorkommt. Der biochemische Mechanismus besteht in der durch das Enzym Luciferase katalysierten oxidativen Dekarboxilierung von Luciferin zu Oxiluciferin und CO<sub>2</sub> unter Anwesenheit von ATP, O<sub>2</sub> und Mg<sup>2+</sup>. Die Lichtemission des lumineszierenden Oxiluciferin kann bei einer Wellenlänge von 562 nm mittels eines Luminometers bestimmt werden. Für die Durchführung des Luciferaseassay wurden die Überstände der lysierten Zellen auf Eis aufgetaut und nach Angaben des Herstellers in Duplikaten von 20 µl in spezielle Kunststoffröhrchen überführt. Bei der Messung wurden durch das Luminometer zusätzlich 100 µl der Luciferinlösung injiziert und nach einer Verzögerung von einer Sekunde für 10 Sekunden die Luminoszenz gemessen. Die Werte (rlu) der Duplikate wurden gemittelt und entsprechend der rlu der Negativkontrollen korrigiert. Innerhalb eines Referenzbereiches von 8 log Stufen sind die erhaltenen Werte proportional zur Luciferasekonzentration in den Zellen.

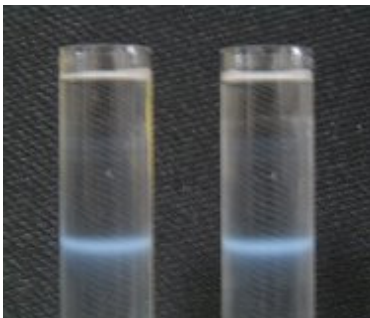
## **2.5 Arbeiten mit Adenovirus Ad.CMV.luc.IRES.m144/Ad.CMV.luc**

### **2.5.1 Vermehrung und Aufreinigung der rekombinanten Adenoviren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc**

Um für die weiteren Versuche eine ausreichende Menge an aufgereinigtem Virus zu erhalten war schrittweise eine Infektion von zunächst einer, dann sieben und schließlich fünfzig 144 mm Zellkultur-Schalen mit kultivierten 293-Zellen

notwendig. Bei einer Konfluenz der Zellen von 70-80% wurde hierzu bei der ersten Schale 5-10 µl einer bereits aufgereinigten Virus-Lösung mit 20 ml frischem Kulturmedium vermischt und gegen das alte Medium ausgetauscht. Nach einer Inkubation von 36-48 Stunden setzte ein zytopathischer Effekt ein, ersichtlich durch eine Abrundung von 80% der Zellen und ein Verlust der Adhärenz bei 10-20% der Zellen durch Zelltod. In diesem Stadium ließen sich die Zellen leicht von der Schale abspülen und inklusive des Mediums in einem 50 ml Falcon-Tube überführen. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und 10°C ließ sich ein Zellpellet vom virushaltigem Medium trennen. Dieses Medium diente nun der Infektion der weiteren sieben Schalen, wobei die Menge des Mediums pro Platte auf 20 ml durch frisches Medium ergänzt wurde. Auf diese Weise erhielt man folgend ein Zellpellet und das virushaltige Medium von 50 infizierten Schalen. Für spätere Virus-Vermehrungen wurden drei 50 ml Falcon-Tubes des virushaltigen Mediums mit Alufolie ummantelt und somit lichtgeschützt bei -80°C eingefroren. Das Zellpellet wurde nach zweimaligem Waschen in 4 ml PBS resuspendiert und anschließend dreimal in einem Trockeneis-Ethanol Bad und einem 37°C Wasserbad einer Schockgefrierung ausgesetzt. Dieses diente dem Aufbrechen der virusbeladenen Zellen. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und 10°C ließ sich das nun virushaltige PBS isolieren. Die Aufreinigung erfolgte durch Ultrazentrifugation der Virus-PBS-Lösung mittels eines Stufengradienten einer Cs-Cl-Lösung und folgender Dialyse. Die Ultrazentrifugation erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden drei Cs-Cl-Lösungen mit unterschiedlicher Dichte hergestellt. Lösung A mit einer Dichte von 1,5 g/ml, Lösung B mit einer Dichte von 1,35 g/dl und Lösung C von 1,25 g/dl. Diese wurden in genannter Reihenfolge vorsichtig in insgesamt sechs Beckmann-Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert. Dabei war stets darauf zu achten, dass es zu keiner Durchmischung der einzelnen Phasen kam, da die strikte Trennung der einzelnen Lösungen maßgeblich ist für die erfolgreiche Aufreinigung. Die Virus-PBS-Lösung wurde nun mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 36 ml aufgefüllt und zu je 6 ml auf die sechs Zentrifugenröhrchen verteilt. Etwaige Gewichtsunterschiede wurden durch Zugabe von PBS austariert, da eine Differenz in der Zentrifuge gegenüberliegender Röhrchen nur bis zu 0,05 g tolerabel ist. Nach Einsetzen der Röhrchen in die swinging-buckets des SW 40 Ti-Rotors der Ultrazentrifuge erfolgte die erste Zentrifugation bei 34000 rpm und 10°C für eine Stunde. Das gereinigte Virus

zeichnete sich nun zwischen den Lösungen der Dichte von 1,35 g/ml und 1,25 g/ml als bläulich schimmernde Bande ab. Diese wurde mittels einer 20 G-Kanüle und einer 20 ml Spritze nach vorsichtigem Durchstechen des Zentrifugenröhrchens unterhalb der Bande abgesogen. Für den zweiten Zentrifugationsschritt wurde die Viruslösung durch Zugabe der Lösung von 1,35 mg/dl Dichte auf ein Gesamtvolumen von 24 ml gebracht und zu je 12 ml in zwei Zentrifugenröhrchen überführt. Auch hier wurde bei Notwendigkeit mittels genannter Lösung austariert. Die Zentrifugation erfolgte für 24 h und 10°C bei 34000 rpm, wobei sich ein kontinuierlicher Gradient ausbildet. Das auch diesmal als bläuliche Bande imponierende aufgereinigte Virus wurde erneut mittels der 20G Kanüle isoliert und mit Dialysepuffer auf ein Volumen von 5 ml gebracht und folgend in den Dialyserahmen injiziert. Für die Dialyse wurde der Rahmen für 24 h bei 4°C und Dunkelheit mittels eines Schwimmers in ein mit 1 l gefülltes Becherglas versetzt. Der Dialysepuffer wurde alle 8 h ausgetauscht. Nach Beendigung der Dialyse wurde das aufgereinigte Virus mit einer Spritze aus dem Rahmen abgezogen und zu 100 µl in Eppendorf-tubes pipettiert, in einem Trockeneis-Ethanol-Bad schockgefroren und bei -80°C gelagert.



**Abbildung 8: Virusbanden nach der Ultrazentrifugation**

### 2.5.2 Titration (Plaque Assay)

Der Plaque Assay ist eine der sensitivsten und zuverlässigsten Methoden zur Quantifizierung aufgereinigter Viren. Am Tag vor der Titerung wurden zwei 144 mm Zellkulturschalen mit einer Konfluenz der 293-Zellen von 80-90% auf 16-20 60 mm Schalen gesplittet. Für die eigentliche Titerung wurden 200 µl der Viruslösung auf Eis aufgetaut und eine serielle, exponentielle Verdünnungsreihe mittels HGDMEM hergestellt, so dass je 2 ml der Verdünnungsstufen 1:10<sup>7</sup> bis 1:10<sup>12</sup> vorlagen. Nach Absaugen des Mediums der 60 mm Schalen und einmaligem Waschen mit PBS wurden je 3 Schalen mit 500 µl jeder Verdünnungsstufe versetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dabei wurden sämtliche Platten alle 15 min vorsichtig geschwenkt um eine gleichmäßige Verteilung der Viruslösung zu ermöglichen. 2 Platten wurden als Negativkontrolle ausschließlich mit 500 µl HGDMEM versetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Viruslösungen vorsichtig abgesogen und die Zellen mit einem Gemisch aus Agarose und Nährmedium überschichtet. Dieses Gemisch ist bei 37°C flüssig und verfestigt sich bei Raumtemperatur. Entsprechend vorsichtig wurden jeweils 8 ml pro Platte vom Rand aus auf die Zellen pipettiert um den Zellrasen durch die gegebenen Scherkräfte aufgrund der höheren Viskosität des Mediums nicht zu beschädigen. Die Platten wurden bis zur Verfestigung der Überschichtung unter der sterilen Werkbank belassen und anschließend für 12-14 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 7 Tagen wurden weitere 5 ml des Agarose-Nährmedium-Gemisches hinzugefügt. Ab dem 10. Tag wurde bei sämtlichen Platten täglich die Plaques quantifiziert und markiert, die Ausdruck eines durch die Überschichtung räumlich begrenzten zytopathischen Effektes (CPE) der 293-Zellen sind. Nachdem keine neuen Plaques hinzukamen wurde der Virustiter nach folgender Formel berechnet, wobei nur Platten mit einer Gesamtzahl von Plaques zwischen 30 und 300 gewählt wurden um eine größtmögliche Genauigkeit zu erzielen:

$$\frac{\text{Durchschnitt der Plaques pro Platte x Verdünnung}}{0,5 (= \text{Menge der Viruslösung pro Platte})} = \frac{\text{plaque forming units}}{\text{MI}}$$



**Abbildung 9:** Zellkulturschale am 10. Tag nach Infektion mit der Verdünnungsstufe  $1:10^7$ . Mehrere Plaques sind zu erkennen (Beispiel eines Plaque Assays).

### 2.5.3 Luciferaseexpressionstest mit der Ziellinie HepG2

Der Luciferaseexpressionstest dient der Funktionalitätsüberprüfung und quantitativen Differenzierung der Luciferaseexpression der beiden Adenoviren Ad.CMV.luc und Ad.CMV.luc.IRES.m144 *in vitro*. Dabei wurden sechs Stunden vor der Infektion  $1 \times 10^6$  HepG2-Zellen pro well dreier six-well-plates ausgesät. In zwei Versuchsreihen wurden zunächst mittels zusatzfreiem Nährmedium die Verdünnungsstufen 30, 10 und 3 m.o.i. (multiplicity of infection), folgend die Verdünnungsstufen 3; 0,3 und 0,03 hergestellt. Die m.o.i gibt dabei das Verhältnis infektiöser Partikel in der beim Plaque Assay bestimmten Messeinheit pfu (plaque forming units) zur Menge zu infizierenden Zellen an. Nach der sechsständigen Inkubationszeit und damit einhergehenden Adhärenz der HepG2-Zellen (humane Hepatoblastomzelllinie) wurde das Medium abgesogen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 500  $\mu$ l jeder Virusverdünnungsstufe auf je drei wells pipettiert. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, wobei die Platten alle 15 min zur optimalen Verteilung der Viruslösung vorsichtig geschwenkt wurden. Drei der wells dienten dabei jeweils als Negativkontrolle durch Zugabe

von virusfreiem Nährmedium ohne Zusätze. Nach der Inkubation wurden die Viruslösungen, respektive das zusatzfreie Nährmedium entfernt, durch je 2 ml Kompletmedium pro well ausgetauscht und eine weitere Inkubation von 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> angeschlossen. Folgend wurden nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS die Zellen mit jeweils 150 µl Cell-Culture-Lysis-Reagenz (CCLR, Promega) pro well versetzt und lysiert. Das Lysat wurde mit Hilfe des cell-scrapers gleichmäßig abgekratzt, in Eppendorf-tubes gesammelt und bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand diente der bereits beschriebenen Luciferase-Messung und wurde später bei –80 °C eingefroren.

## **2.6 *in-vivo* Experimente**

### **2.6.1 Versuchstiere**

Für die beiden Versuchsreihen wurden Mäuse des immunkompetenten Inzuchtstammes balb/c verwendet, die über einen kommerziellen, amtlich zugelassenen Händler bezogen wurden. Die Mäuse waren bei Versuchsbeginn 8-10 Wochen alt mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 18 g. Die Haltung erfolgte gemäß der Tierschutzbestimmungen des Gentechnikgesetzes in speziellen Räumlichkeiten des Universitätsklinikums unter S2-Sicherheitsbedingungen. Es wurden 6 Mäuse pro Käfig gehalten, Wasser und Futter stand kontinuierlich zur Verfügung. Für die erste Versuchsreihe wurden insgesamt 60 Mäuse, für den zweiten Tierversuch 6 Mäuse verwendet. Beide Versuche wurden von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Lagerstraße 36, 20357 Hamburg genehmigt.

### **2.6.2 Virale Applikation**

Die virale Applikation erfolgte mittels einer 26 G-Kanüle und einer Hamilton-Glasspritze mit 100 µl Fassungsvermögen in eine der beiden Schwanzvenen. Für optimale Arbeitsbedingungen wurden die Mäuse in eine Zwangsröhre überführt

und die Venen in einem 42-45°C warmen Wasserbad für ca. eine Minute dilatiert. Nach erfolgreicher Punktion wurden im ersten Tierexperiment insgesamt 60 Mäusen in zwei Gruppen jeweils  $1 \times 10^8$  pfu des Ad.CMV.luc.IRES.m144 oder Ad.CMV.luc pro Maus injiziert. Im zweiten Tierexperiment wurde die Dosis jeweils auf  $1 \times 10^9$  pfu erhöht bei je drei Mäusen pro Gruppe und einer Kontrollmaus.

### **2.6.3 Terminierung der Mäuse**

Die Mäuse wurden in einen Luft undurchlässigen Käfig gesetzt und zunächst über einen zuführenden Schlauch durch ein O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-Gemisch im Verhältnis 1:1 narkotisiert. Folgend wurde die O<sub>2</sub> Zufuhr unterbrochen und die Tiere durch das für ca. 3 min alleinig einströmende CO<sub>2</sub> terminiert. Zudem wurde anschließend eine zervikale Dislokation durchgeführt. Die Terminierung der Mäuse der ersten Versuchsreihe erfolgte in Gruppen zu je 10 Tieren zu den Zeitpunkten 7, 14 und 20 Tage nach viraler Applikation, die der sechs Mäuse des zweiten Versuches nach 5 Tagen.

### **2.6.4 Fixation der Lebergewebe und Herstellung eines Leberhomogenisats zur Luciferaseexpressionsmessung**

Die getöteten Tiere wurden in Rückenlage fixiert. In der Mittellinie wurde ein Hautschnitt durchgeführt und die Haut abpräpariert. Es erfolgte ein Schnitt durch die Linia alba und ein seitlicher Entlastungsschnitt. Die Leber im nun offenen Situs wurde mobilisiert und entnommen. Die Hälfte des Organs wurde zu etwa gleichen Teilen in einerseits phosphatgepuffertem Formaldehyd für 24-48 Stunden bei Raumtemperatur fixiert und zudem zur Weiterverarbeitung und Fixation mit den Lösungen HOPE I und HOPE II nach den Angaben des Herstellers an das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf weitergereicht. Die zweite Hälfte wurde unmittelbar nach Entnahme zur Herstellung eines Homogenisats weiterverarbeitet. Dazu wurde in einem 10 ml Falcon-Tube dem Gewebe pro Gramm ein Milliliter des Cell-Culture-Lysis-Reagenz zugesetzt und mechanisch vermixt. Um das Homogenisat von festen Bestandteilen zu trennen

folgten zwei Zentrifugationsschritte, zunächst bei 4°C und 5000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde in Eppendorf-tubes überführt und erneut zentrifugiert bei 4°C und 13000 rpm. Der hieraus entstandene Überstand wurde für den beschriebenen Luciferaseassay verwendet und die Werte der eingesetzten Duplikate jedes Homogenisats gemittelt.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung des adenoviralen Expressionsplasmids pAd.CMV.luc.IRES.m131/129

Die cDNA des m131/129 wurde durch Verdau mittels der Restriktionsenzyme Xba I und EcoR I aus dem Plasmid pAd.m131/129 und anschließender Gelextraktion gewonnen und in die entsprechenden Schnittstellen des kommerziell erhältlichen pBlueScript *sticky end* ligiert. Durch erneuten Verdau mit Xba I und Sal I und Gelextraktion wurde das Fragment in die Sal I/Xba I Schnittstellen der multiple cloning site II (MCS II) des pIRES *sticky end* eingefügt. Das Luciferase-Gen wurde durch Verdau mit Nhe I und Xba I aus pGL3basic isoliert, durch Gelextraktion aufgereinigt und in die Nhe I Schnittstelle der MCS I des p.IRES.m131/129 *sticky end* ligiert. Das luc.IRES.m131/129 Konstrukt wurde nun durch Verdau mit Nhe I und EcoR V und Gelextraktion isoliert, das überhängende Ende der Nhe I Schnittstelle mittels der T 4 DNA-Polymerase aufgefüllt, und *blunt end* in die EcoR V Schnittstelle des pAd.CMV.pA ligiert.

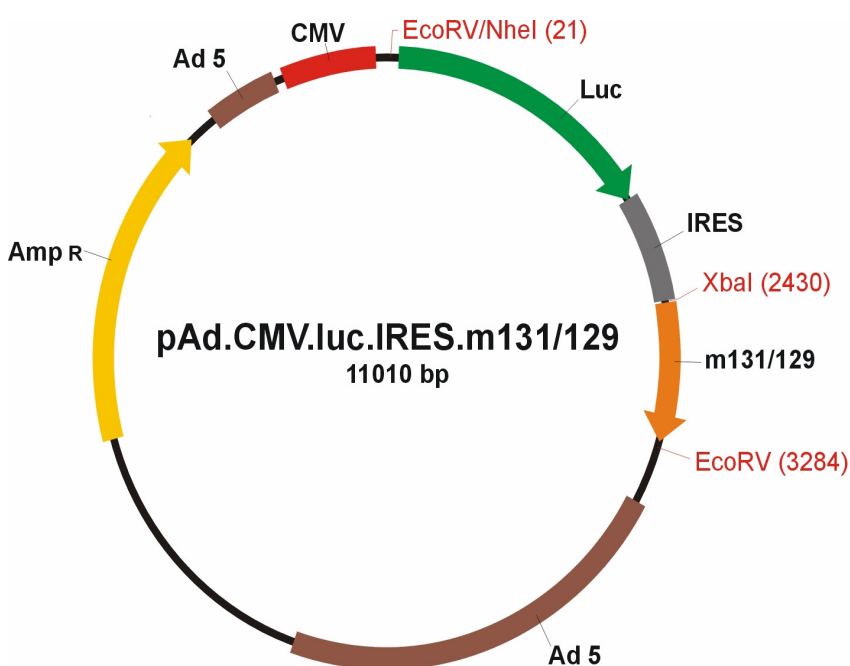


Abbildung 10: Plasmidkarte des Expressionsplasmids pAd.CMV.luc.IRES.m131/129 mit verbliebenen Schnittstellen der Klonierungsschritte.

### **3.2 Versuch der Generierung des Adenovirus Ad.CMV.luc.IRES.m131/129**

Nach der Methode von Graham und Prevec (1991 und 1995) und Bett et al. (1994) wurde versucht das E1-deletierte und rekombinations-defiziente Adenovirus Ad.CMV.luc.IRES.m131/129 zu generieren. Insgesamt scheiterten vierzehn Versuche mittels der Calciumphosphat-Präzipitation die zwei Plasmide pAd.CMV.luc.IRES.m131/129 und pBHG10 homolog in 293-Zellen zu rekombinieren.

### **3.3 Präparation der adenoviralen Vektoren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc für die *in vitro* und *in vivo*- Versuche**

Die beiden Adenoviren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc wurden wie unter 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben vermehrt, aufgereinigt und mittels des Plaque Assays getitert. Die erhaltenen Titer betragen  $6,6 \times 10^9$  pfu/ml für das Ad.CMV.luc.IRES.m144 und  $3,6 \times 10^9$  pfu/ml für das Ad.CMV.luc bei jeweiligen Gesamtvolumina von 6ml.

### **3.4 Ergebnisse der *in vitro* Versuche**

#### **3.4.1 Luciferaseexpression des adenoviralen Expressionsplasmids pAd.CMV.luc.IRES.m131/129 in cos-Zellen**

Der Luciferaseexpressionstest dient der Funktionalitätsüberprüfung des klonierten Expressionsplasmids pAd.CMV.luc.IRES.m131/129. Verwendet wurde der nach Zentrifugation isolierte Überstand der transfizierten cos-Zellen (Nierenzelllinie). Entscheidend ist hierbei lediglich der qualitative Expressionsnachweis um beispielsweise einen eventuell eingetretenen Klonierungsfehler auszuschließen, da das Plasmid folgend in einer weiteren Arbeit nach der von Graham et al. (1977) etablierten Methode der Phosphat-Calcium-Präzipitation zur Generierung des

adenoviralen Vektors Ad.CMV.luc.IRES.m131/129 verwendet wird. Als Negativkontrolle dient hierbei der nach Zentrifugation isolierte Überstand nicht transfizierter cos-Zellen.

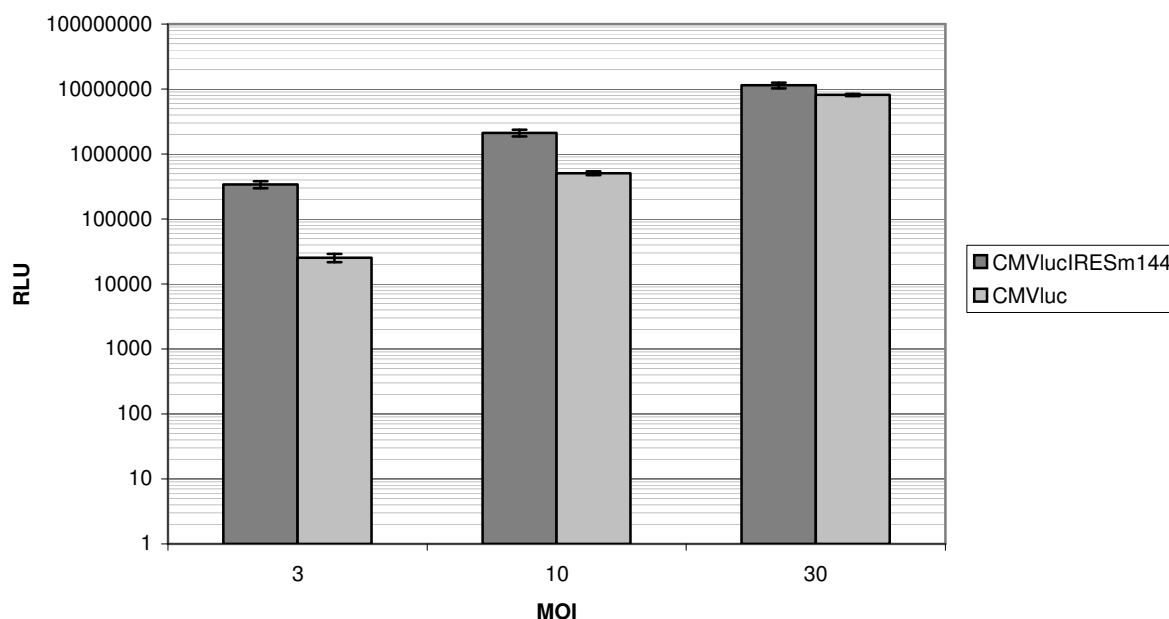
	pAd.CMV.luc.IRES.m131/129			Negativkontrolle		
Messwert 1 in RLU	56766	61520	58412	0	1	1
Messwert 2 In RLU	56812	61580	58418	1	1	0
Mittelwert In RLU	56789	61550	58415	0,5	1	0,5

**Tabelle 5: Luciferaseexpression *in vitro***

Die Funktionalität des Markergens Luciferase konnte so nachgewiesen werden.

### **3.4.2 Luciferaseexpressionsassay der rekombinanten Adenoviren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc in HepG2 Zellen**

Der Assay diente der Funktionalitätsüberprüfung der beiden Adenoviren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc sowie der Vergleichbarkeit der Luciferaseexpression in der humanen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2. Zudem geben die gewonnenen Daten Rückschlüsse auf den Einfluss des Immunsystems bei den *in-vivo* Experimenten an immunkompetenten BALB/c-Mäusen bezüglich der quantitativ unterschiedlichen Luciferaseexpression beider Viren im Vergleich zu den *in-vitro* Versuchen. Folgende Tabelle stellt die gemessene Luciferase-Aktivität beider Viren in relativ lightning units (rlu) der Verdünnungsstufen m.o.i. 30, 10 und 3 der ersten Versuchsreihe dar. Die gemittelten Werte der Negativkontrollen wurden jeweils von den Messergebnissen subtrahiert.

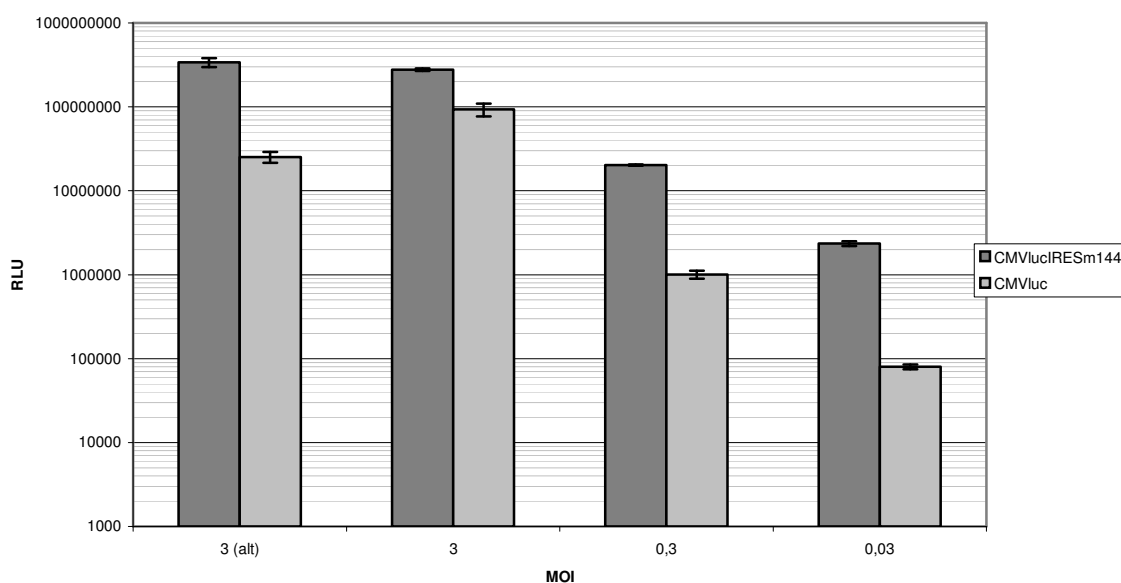


**Abbildung 11: *In-vitro* Expression der Luciferase in HepG2-Zellen (1000fache Verdünnung)**

Die Versuchsreihe zeigte eine zunehmende Differenz der Luciferaseexpression bei höheren Verdünnungsstufen. Lag bei einer m.o.i. von 30 die Expression der Luciferase nach Infektion mit dem Virus Ad.CMV.luc.IRES.m144 lediglich um den Faktor 1,4 über den Expressionsraten nach Infektion mit dem Referenz-Virus Ad.CMV.luc, so steigerte sich diese Differenz auf die Faktoren von 4,2 und 13,4 bei den höheren Verdünnungsstufen einer m.o.i. von 10, bzw. 3. Diese Differenz resultiert aus einer überproportional abnehmenden Luciferaseexpression des Referenz-Virus bei höheren Verdünnungsstufen, wohingegen die Proportionalität nach Infektion mit dem Virus Ad.CMV.luc.IRES.m144 verdünnungsunabhängig gewährleistet bleibt, d.h. beispielsweise: Eine 10-fache Verdünnung resultiert ebenfalls in einer Abnahme der Luciferaseexpression um den Faktor zehn.

Durch diesen zunehmenden Unterschied erfolgte eine zweite Versuchsreihe um zu überprüfen, ob bei höheren Virus-Verdünnungsstufen der Unterschied der Expression der Viren bei gleicher m.o.i. signifikant zunimmt. Bei fehlendem immunologischen Einfluss dieses Versuches und gleichem Promoter, dem CMV-Promoter, war eine annähernd gleich hohe Luciferaseexpression der Viren zu erwarten. Zur Bestätigung der gemessenen Diskrepanz bei der m.o.i. von 3 wurde

diese Verdünnung erneut gewählt, zuzüglich die Verdünnungsstufen m.o.i. 0,3 und 0,03.



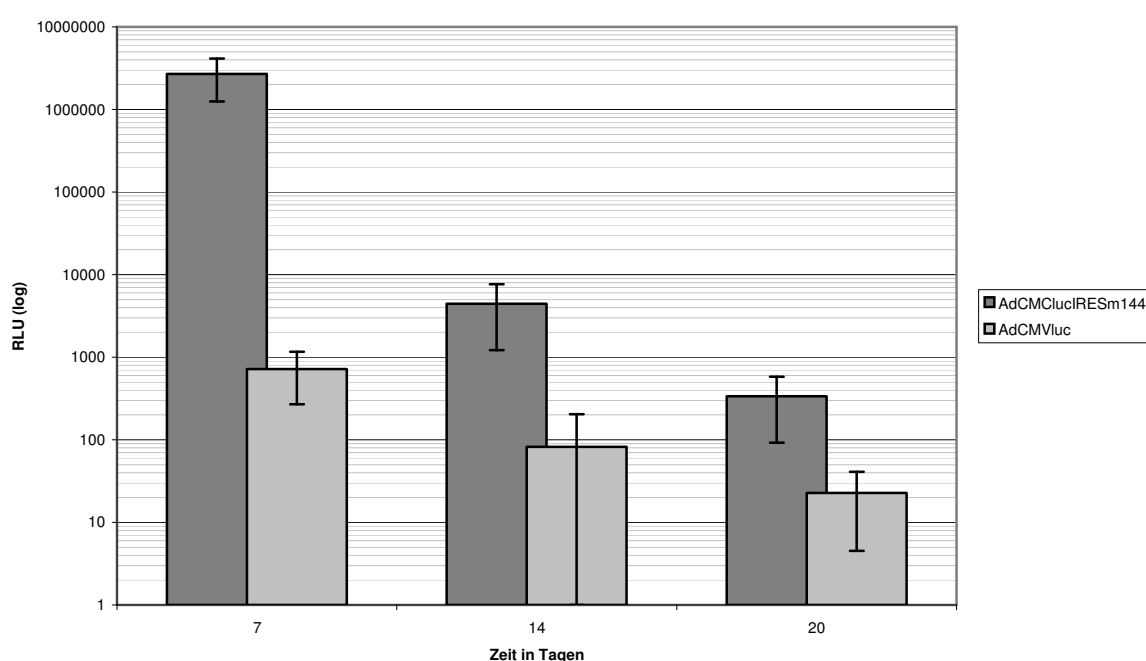
**Abbildung 12: *In-vitro* Expression der Luciferase in HepG2-Zellen (1000fache Verdünnung)**

Trotz geringerer Diskrepanz der Luciferaseexpressionswerte bei der neu gemessenen m.o.i. von 3 gegenüber der alten m.o.i. von 3, ergab sich in der zweiten Messreihe erneut eine Differenz. Die Luciferaseexpression beider Viren unterscheidet sich hier um den Faktor 2,9 bei einer m.o.i. von 3, bzw. um die Faktoren 20,2 und 29 bei den Verdünnungsstufen einer m.o.i. von 0,3 und 0,003. Insgesamt zeigen sämtliche Differenzen statistische Signifikanz.

### 3.5 Ergebnisse der *in vivo* Versuche

#### 3.5.1 Luciferaseexpressionsassay aus den Leberhomogenisats des dreizeitigen Tiermodells

Folgende Tabelle gibt die Daten der Luciferaseexpression, die mittels des Luciferaseexpressionsassays aus den Überständen der aufgereinigten Leberhomogenisate gewonnen wurden.

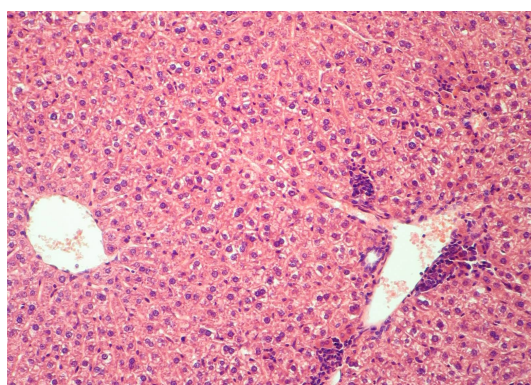


**Abbildung 13: Luciferaseexpressionsassay der aufbereiteten Leberhomogenisate des dreizeitigen Tiermodells**

Zu allen drei Zeitpunkten lagen die Expressionsraten des Ad.CMV.luc.IRES.m144 statistisch signifikant über denen des Ad.CMV.luc und zwar um den Faktor 3751 nach sieben Tagen, den Faktor 54 nach 14 Tagen und dem Faktor 15 nach 20 Tagen.

### 3.5.2 Auswertung der Leberhistologie des dreizeitigen Tiermodells

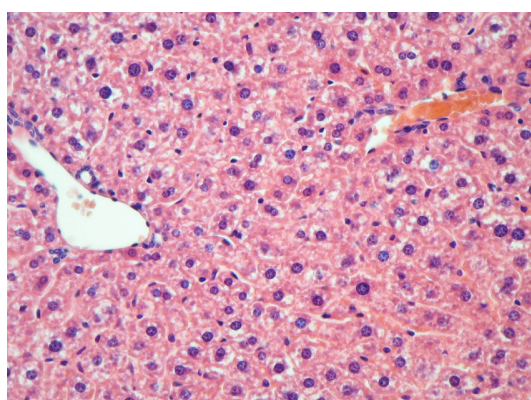
Ziel der Anfertigung histologischer Schnitte aus den Lebern der balb-c Mäuse war der Nachweis einer unterschiedlichen Entzündungsreaktion im Lebergewebe der mit Ad.CMV.luc.IRES.m144 infizierten Mäuse gegenüber denen mit stattgefundenener Ad.CMV.luc- Infektion. Postuliert wurde eine geringere Infiltration mit sowohl Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) als auch zytotoxischen T-Lymphozyten nach Infektion mit Ad.CMV.luc.IRES.m144 als Folge des zellulären immunologischen Schutzes der Hepatozyten durch das exprimierte MHC-Homologon m144 (Cretney et al., 1999; Farrell et al., 1997). Ein quantitativer oder qualitativer Unterschied in der Entzündungszellinfiltration des Lebergewebes konnte zu keinem der Zeitpunkte 7, 14 und 20 Tage nach Infektion mit Ad.CMV.luc.IRES.m144, bzw. Ad.CMV.luc nachgewiesen werden.



Ad.DL312 ( $3 \times 10^9$  p.f.u.)

(Adenovirus ohne  
Expressionskassette/  
unserer Arbeitsgruppe)

zusätzliche  
Folgeversuch



Ohne Virus

Abbildung 14: Leberhistologie nach Infektion mit Ad.DL312 und ohne virale Infektion- Kein Nachweis einer Entzündungszellinfiltration.

### **3.5.3 Auswertung der Leberhistologie nach zehnfacher Virusapplikation**

Um eine verstärkte Immunzellinfiltration zu provozieren wurden in einem zweiten Tiermodell jeweils drei balb/c Mäuse mit der zehnfachen Virusmenge, entsprechend  $1 \times 10^9$  pfu, des Ad.CMV.luc.IRES.m144 und des Ad.CMV.luc systemisch infiziert. Eine Maus diente als Negativkontrolle. Die Terminierung der Mäuse erfolgte bereits nach fünf Tagen. Die histologisch aufbereiteten Leberschnitte zeigten keine unterschiedliche Immunzellinfiltration sowohl in den infizierten Mäusen, als auch in der Negativkontrolle.



## 4 Diskussion

Im folgenden Diskussionsteil wird zunächst auf die Funktionalitätsüberprüfung des Expressionsplasmids pAd.luc.IRES.m131/129 eingegangen und die möglichen Gründe des Nichtgelingens der Virussyntese erörtert. Folgend werden die Ergebnisse der adenoviralen *in vivo* und *in vitro* Experimente der vergleichenden Markergenexpression des Ad.CMV.luc.IRES.m144 und des Ad.CMV.luc diskutiert.

### 4.1 Funktionsüberprüfung des Expressionsplasmids pAd.luc.IRES.m131/129 und der Versuch der Generierung des rekombinanten Adenovirus Ad.CMV.luc.IRES.m131/129

Das klonierte adenovirale Expressionsplasmid pAd.luc.IRES.m131/129 wurde durch Calciumphosphat-Transfektion in die humane Nierenkarzinomzelllinie 293 überführt, welche für diese Technik besonders geeignet ist. Der anschließende Luciferaseassay diente der rein qualitativen Bestätigung der Funktionstüchtigkeit des Plasmids, welches in einem weiteren Schritt zur Generierung eines adenoviralen Vektors durch Co-Präzipitation verwendet werden sollte. Ziel war es, den Vektor Ad.CMV.luc.IRES.m131/129 herzustellen und in einem murinen Tiermodell den Vektor Ad.CMV.luc gegenüberzustellen. Durch Vergleiche der Luciferase-Aktivität und einer möglichen unterschiedlichen hepatischen Entzündungszellinfiltration sollte die immunmodulatorische Wirkung des durch das m131/129 codierten CC-Chemokin-Homologon charakterisiert werden. Insgesamt führten vierzehn Versuche den adenoviralen Vektor zu generieren zu keinem positiven Ergebnis. Bei der Konstruktion eines solchen rekombinanten, replikationsdefizienten Adenovirus für die Gentherapie wird die E1-Region durch ein therapeutisches Gen ausgetauscht (Bett et al., 1993; Bett et al., 1994). Dieses wird durch Kotransfektion der Helfer-Zelllinie 293, einer speziellen transformierten Nierenepithelzelllinie, mit zwei verschiedenen Plasmiden erreicht. Das Shuttle-Plasmid enthält das therapeutische Gen und einen kleinen Teil des adenoviralen Genoms. Das andere Plasmid pBHG10 besteht ausschließlich aus viralem Genom, ist aber ebenso unvollständig. Beide Plasmide können daher für sich

allein keine Adenoviren generieren. Kommt es jedoch zufällig zur Kotransfektion einer 293-Zelle mit den beiden Plasmiden, kann es zu einem Austausch der genetischen Information durch Cross-over, einer homologen Rekombination kommen. Daraus entstehen rekombinante, E1- und E3-deletierte Adenoviren, die das therapeutische Gen beinhalten. Die Kotransfektion ist letztendlich ein seltenes Ereignis. Die Transfektionseffizienz nimmt mit zunehmender Plasmidgröße ab, so dass das 34 kb schwere pBHG10 schlechter zu transfizieren ist als das Shuttle-Plasmid mit 11 kb (Hanahan, 1983). Selbst bei einer erfolgreichen Kopplung der genetischen Informationen beider Plasmide müssen die Verpackungszellen mit dem replikationsdefizienten Adenovirus noch weitere 10 bis 14 Tage unter einer Agaroseschicht vital bleiben, da nur so nach homologer Kombination plaqueförmige apoptotische Zellareale von vitalen Zellen abgegrenzt werden können. Als ein weiterer, eventuell entscheidender Faktor für das Nichtgelingen der Virussynthese, kommt ein möglicher inhibitorischer Einfluss des m131/129 in Frage.

#### **4.2 *In vitro* Luciferaseexpressionsvergleich der rekombinanten Adenoviren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc in 293 Zellen**

Ziel des *in vitro* Versuches war die Gegenüberstellung der Expression des Markergens Luciferase ohne Einfluss des Immunsystems. Erwartet wurde folglich eine vergleichbare Expression beider Viren, Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc, da sich *in vitro* die immunmodulatorischen Eigenschaften des m144 nicht auswirken. Die gemessenen Werte der Luciferaseexpression beider Viren unterschieden sich in Abhängigkeit von den gewählten Verdünnungsstufen, wobei die Werte des Ad.CMV.luc.IRES.m144 stetig über denen des Ad.CMV.luc lagen. Die Diskrepanz lag bei der höchsten Konzentration von 30 m.o.i. bei einem Faktor von 1,4 und steigerte sich bei abnehmender Konzentration auf 0,03 m.o.i. auf einen Faktor von 29. In einer zweiten Messreihe der höheren Verdünnungsstufen wurden die Werte für die Konzentration von 3 m.o.i., die bereits Gegenstand der ersten Messreihe waren, kontrolliert. Die Diskrepanz der Luciferaseexpression des Ad.CMV.luc.IRES.m144 und des Ad.CMV.luc reduzierte sich hier von einem Faktor von 13,4 auf einen Faktor von 2,9. Die Unterschiede der Messergebnisse

sind statistisch signifikant. Der Messbereich beider Verdünnungsreihen erfolgte bei einer konstanten Substrat/rlu ratio. Es wurde derselbe Dialysepuffer für die Verdünnungsreihen verwendet, so dass methodische Fehlerquellen sehr unwahrscheinlich sind. Obwohl eine statistische Signifikanz der Abweichungen festzustellen ist, kann die unterschiedliche Expression des Markergens Luciferase für beide Adenoviren als Ausgangspunkt für das Tiermodell herangezogen werden, bei der die immunmodulatorischen Eigenschaften des m144 zum Tragen kommen.

### **4.3 *In vivo* Charakterisierung der rekombinanten Adenoviren**

#### **Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc**

Im Tiermodell wurden jeweils 30 balb/c Mäuse mit den beiden adenoviralen Vektoren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc mit einer Dosis von  $1 \times 10^8$  pfu intravenös über eine der beiden Schwanzvenen infiziert. Intravenöse Injektionen führen regelhaft zu einer effizienten hepatischen Infektion (Yang et al., 1994). Ziel des Modells war es, eine unterschiedliche Expressionsaktivität der infizierten Zellen durch den Luciferaseexpressionsassays nachzuweisen und bildgebend durch histologische Schnitte der Leber mit einer etwaigen unterschiedlichen Immunzellinfiltration kausal zu begründen. Die Anwendung adenoviraler Vektoren ist in der Gentherapie durch ihre transiente Genexpression limitiert. Bereits nach zwei Wochen lässt sich nur noch eine minimale Transgenexpression nachweisen (Kurata et al., 1999). Wie unter 1.3.4 erläutert, ist diese limitierte Expressionsdauer durch die frühzeitig einsetzende zelluläre Immunabwehr gegen infizierte Zellen, vermittelt durch NK- Zellen und zytotoxische T-Lymphozyten, sowie in einer späteren Phase durch die humorale Immunabwehr bedingt (Benihoud et al., 1997; Kovetsdi et al., 1999). Die zytotoxischen T-Lymphozyten erkennen Fragmente viraler Proteine, die auf der Oberfläche der MHC Klasse I-Moleküle prozessiert werden, und werden aktiviert. Zudem wird durch Ausschüttung von IFN- $\gamma$  die Expression der Oberflächenmoleküle gesteigert, ein Mechanismus, der der adenoviralen Downregulation der MHC- Komplex-Dichte über Proteine der E3-Region entgegenwirkt. Die MHC Klasse I-Moleküle spielen eine Schlüsselrolle in der initialen zellulären Immunantwort auf adenovirale

Infektionen. Sie dienen einerseits den zytotoxischen T-Lymphozyten durch Antigen-Prozessierung als Aktivator, andererseits inhibieren sie die NK-Zell-Population, so dass ihre verminderte Expression zu deren Aktivierung führt. Um sich vor dieser zweiseitigen Immunantwort zu schützen, exprimiert das murine Cytomegalievirus das hier verwendete m144, ein MHC Klasse I-Homologon. Einerseits werden durch die fehlende Prozessierung viraler Proteinfragmente durch diese Moleküle die zytotoxischen T-Lymphozyten an ihrer Aktivierung gehindert, da diese die Zelle nicht mehr als infiziert erkennen können. Zum anderen werden weiterhin die inhibitorischen Rezeptoren der Natürlichen Killerzellen stimuliert, so dass auch deren Aktivierung mit folgender Elimination der Zelle unterbleibt (Cretney et al., 1999; Farrell et al., 1997).

Ziel und Folge dieser Immunmodulation ist eine vermehrte Replikation und erleichterte Dissemination des MCMV. In dieser Arbeit sollte die Frage überprüft werden, ob sich durch Koexpression des m144 in einem adenoviralen Vektor die Transgenexpression (Luciferase) in der Leber nach systemischer Applikation durch diese immunmodulatorischen Eigenschaften verändert. Dazu wurden balb/c Mäuse mit einer Virusmenge von jeweils  $1 \times 10^8$  pfu mit den beiden adenoviralen Vektoren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc systemisch infiziert und die Luciferaseexpression nach Aufbereitung der Lebern zu den Zeitpunkten 7, 14 und 20 Tagen untersucht. Ausgehend von einer frühzeitigen Immunmodulation in der ersten Phase nach Infektion war die Erwartung, dass es durch die verminderte Aktivität von Natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten zu einer höheren Transgenexpression kommt. Aus der verminderten Elimination der infizierten Zellen sollte zudem eine verlängerte Expression des Markergens resultieren. Die Ergebnisse des Tiermodells zeigen bereits nach sieben Tagen eine deutliche Überlegenheit der Luciferaseexpression des Ad.CMV.luc.IRES.m144 gegenüber dem Ad.CMV.luc. Die gemessene Luciferase-Aktivität war hier nach sieben Tagen um den Faktor 3751 erhöht. Die Modulation der frühen zellulären Immunabwehr ist zu diesem Zeitpunkt offensichtlich schon ausschlaggebend und führt zu einer verminderten Elimination der infizierten Zellen und damit einhergehenden zu einer quantitativ verbesserten Transgenexpression. Zu den Zeitpunkten 14 und 20 Tage reduzierte sich die zu messende Luciferaseexpression in beiden Versuchsgruppen beträchtlich. In der Versuchsgruppe der mit dem Ad.CMV.luc infizierten Mäuse reduzierte sich die

Expression nach 14 Tagen auf 11,5%, beziehungsweise auf 3,2% nach 20 Tagen gegenüber den ohnehin geringen Ausgangswerten nach 5 Tagen. In der Versuchsgruppe der mit dem Ad.CMV.luc.IRES.m144 infizierten Mäuse belief sich die Reduktion der Expression auf Werte von 0,2% nach 14 Tagen und unter 0,02% nach 20 Tagen. Obwohl die Expressionsraten hier noch numerisch über denen der Kontrollgruppe liegen, scheint der immunmodulatorische Einfluss des m144 sich primär durch eine verminderte Elimination der infizierten Zellen in der frühen Phase nach Infektion auszuwirken, jedoch ohne maßgebliche Auswirkung auf die Dauer der Transgenexpression. Das komplexe Zusammenspiel der zellulären und humoralen Immunantwort scheint durch das m144 nur zeitlich begrenzt beeinflussbar zu sein. Während in der frühen Phase nach Infektion die zelluläre Elimination infizierter Zellen offensichtlich inhibiert wird, wie die erhöhte Transgenexpression zeigt, scheinen sich bereits nach wenigen Tagen die kaskadenartigen Prozesse der Interaktion von Botenstoffen wie den Interleukinen, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  und den zellulären Komponenten des Immunsystems so zu steigern, dass keine maßgebliche und messbare Hemmung der Elimination mehr stattfindet. Der immunmodulatorische Einfluss des m144 scheint für eine verlängerte Transgenexpression offensichtlich nicht auszureichen, hat aber in der frühen Phase nach Infektion einen signifikanten Einfluss. Der bildgebende Beleg einer verminderten Entzündungszellinfiltration durch histologische Schnitte des aufbereiteten Lebergewebes war selbst bei einer höherer systemisch applizierten Virusmenge von  $1 \times 10^9$  pfu nicht erfolgreich. Folgeversuche unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass ein Entzündungsinfiltrat auch bei einer systemischen Infektion mit Ad.DL312, ein Adenovirus ohne zusätzliche Expressionskassette, bei einer Virusmenge von  $3 \times 10^9$  p.f.u. in der Leber nicht nachweisbar ist. Also auch in Abwesenheit immunmodulatorischer Proteine, trotz dreifacher Virusdosis, verspricht dieses Verfahren offenbar keinen Erfolg, und der misslungene bildgebende Nachweis einer unterschiedlichen hepatischen Infiltration von Entzündungszellen nach Infektion mit den beiden adenoviralen Vektoren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc kann relativiert werden.

Für die Anwendung viraler Vektoren für klinische Studien müssen verschiedene Kriterien erfüllt sein. Sie müssen bestimmte Zellen des Menschen effizient modifizieren können, eine ausreichend starke und ausreichend langfristige Genexpression gewährleisten und hinsichtlich des gewünschten

Behandlungsansatzes ein möglichst geringes Risikoprofil aufweisen. Adenovirale Vektoren zeichnen sich bislang durch ihre hohe Effizienz und geringe Nebenwirkungsrate ab. Ihr großer Nachteil gegenüber retroviralen Vektoren ist jedoch die limitierte Dauer der Genexpression. Die Koexpression des m144 mit therapeutischen Genen bietet die Möglichkeit die Nachteile adenoviraler Vektoren weiter zu minimieren. So konnte in dieser Arbeit eine äußerst effiziente Genexpression in der Leber festgestellt werden. Die Expression war initial circa um den Faktor 4000 höher gegenüber dem adenoviralen Kontrollvektor. Auch wenn die Expressionsdauer des Ad.CMV.luc.IRES.m144 begrenzt ist, belegt dies einen immensen Einfluss des MHC-I Homologons auf die initiale Immunantwort. Die Kopplung adenoviralen Vektoren mit dem m144 und anderen immunmodulatorischen Genen wie dem m131/129 bietet offensichtlich Vorteile und kann hinsichtlich der therapeutischen klinischen Anwendbarkeit neue Möglichkeiten eröffnen. Erkrankungsbilder, die derzeit Gegenstand klinischer Gentherapiestudien sind, umfassen onkologische Erkrankungen, monogene Erbkrankheiten, Infektionserkrankungen (insbesondere HIV/AIDS) und kardiovaskuläre Erkrankungen. Dabei stellen die Krebserkrankungen mit über 60% den größten Anteil.

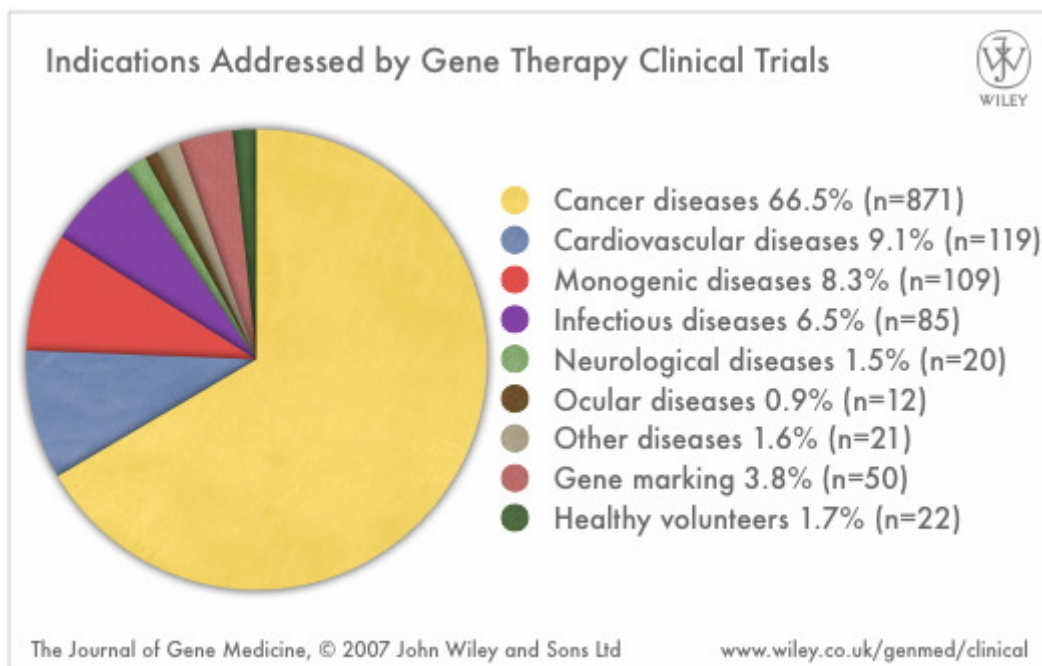


Abbildung 15: Anteile der Indikationen derzeitiger gentherapeutischer klinischer Studien

Vor Allem die Gruppe der monogenen Erbkrankheiten stellt ein viel versprechendes Feld der adenoviralen Gentherapie da. Die molekularbiologische Grundlagenforschung führte durch die Charakterisierung vieler ursächlicher genetischer Defekte hereditärer Erkrankungen zu einem besseren pathogenetischen Verständnis vieler Erberkrankungen. Somit besteht vermehrt die Hoffnung und die Möglichkeit diese isolierten Defekte durch die genterapeutische Substitution der normalen funktionsfähigen Kopie zu behandeln. Durch die hervorragende Transduktionseffizienz der Adenoviren in Hepatozyten sind gerade monogene Defekte der Leber von großem Interesse. Beispielhaft, und zum Teil bereits mehrfach Gegenstand klinischer Studien der somatischen Gentherapie, sind Erberkrankungen wie der Morbus Wilson (isolierter Defekt des Wilson-Gens ATP7B des Chromosom 13), die Hämophilie A (Mangel des Gerinnungsfaktors VII, ein 265 kD großes einkettiges Protein mit dem Genlocus Xq28) und die dominant vererbte familiäre Hypercholesterinämie (Defekt des LDL-Rezeptor-Gens). Hier könnte die Koexpression immunmodulatorischer Proteine wie dem m144 die Expressionseffektivität erhöhen und gegebenenfalls auch die Expressionsdauer erhöhen. Eine quantitativ zielgerichtete Transgenexpression hat durch die hohe Expressionseffizienz bei m144 Koexpression den Vorteil geringere Virusdosen verwenden zu müssen, mit der Konsequenz eines geringeren Nebenwirkungsprofils und besserer Wirtschaftlichkeit. Weitere klinische Implikationen bietet die adenovirale Gentherapie der zystischen Fibrose und des Crigler-Najjar-Syndroms, eine genetisch determinierte Konjugationsstörung des Bilirubins in der Leber. Erfolg versprechend sind somit sämtliche Ansätze der adenoviralen Gentherapie, bei denen durch Suppression und Modulation der Immunantwort eine höhere und längere Transgenexpression erzielt werden soll. Aber auch die Autoimmunhepatitis, als wohl multifaktoriell bedingte Entzündung der Leber, kann durch die immunmodulierende Wirkung des m144 zukünftig Gegenstand der adenoviralen Gentherapie werden. Problematisch sind dabei genterapeutische Ansätze bei denen durch Transgenexpression eine Stimulation des Immunsystems erzielt werden soll. So erscheint beispielsweise eine immunmodulatorische Koexpression des m144 bei der bei uns im Labor etablierten doxycyclinsupprimierbaren Expression des humanen single-chain Interleukin-12-Gens für die Therapie maligner Tumoren nicht sinnvoll. Die direkten Interleukin-12 und indirekten über TNF- $\alpha$  induzierten Folgen der antitumoralen

Immunantwort würden durch die exprimierten MHC-I-Homologe des m144 abgeschwächt.

#### **4.4 Ausblick auf Folgeversuche mit dem Chemokin-Homologon m131/129**

Über das für das  $\beta$ -(C-C) Chemokin-Homologon codierende m131/129 bedient sich das murine CMV eines weiteren Mechanismus der Immunmodulation zur erleichterten Dissimination und Persistenz im Wirtsorganismus. Das Verfahren der Generierung des funktionstüchtigen Expressionsplasmids pAd.CMV.luc.IRES.m131/129 wurde in dieser Arbeit dargestellt und ermöglicht als Gegenstand einer zukünftigen Arbeit die hier misslungene Herstellung eines adenoviralen Vektors durch homologe Rekombination. In einem mit in dieser Arbeit vergleichbarem Tiermodell kann der immunmodulatorische Einfluss des m131/129 mit der Fragestellung einer prolongierten Genexpression überprüft werden.

Versuche an balb/c-Mäusen zeigten, dass es in Abhängigkeit des Genprodukts des m131/129, dem  $\beta$ -(C-C) Chemokin-Homologon MCK-2, zu einer vermehrten inflammatorischen Antwort in der Leber kommt, wenngleich diese Immunantwort nicht mit einer erhöhten Eliminationsrate der infizierten Zellen assoziiert ist (Saederup et al., 2001). Fleming et al. zeigten, dass es zu einer zweifach verminderten Infiltration von Entzündungszellen in der Leber zwei Tage nach Infektion mit MCK-2 depletierten Viren kommt. Die Hauptfunktion des MCK-2 scheint demnach in der Rekrutierung mononukleärer Leukozyten zu liegen, die eine erleichterte Dissimination des Cytomegalievirus zu den Speicheldrüsen ermöglichen. Des Weiteren war die Abwesenheit des MCK-2 mit einer beschleunigten Eliminationsrate der infizierten Zellen verbunden. Die Chemokin-agonistische Komponente der proinflammatorischen Wirkung wird offensichtlich ergänzt durch eine Interferenz mit der frühzeitigen Nk-Zellen und T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort des Wirtes mit der Folge einer erhöhten Replikationsrate der Viren.

Ob diese Beeinflussung der Elimination infizierter Zellen einen Einfluss auf die quantitative Transgenexpression in der frühen Phase nach Infektion oder zu einer verlängerten Expression führt, gilt es in folgenden Versuchen zu ergründen.



Möglich erscheint dann ebenfalls eine Koexpression beider immunmodulatorischen Proteine nach Generierung eines entsprechenden adenoviralen Vektors.

## 5 Zusammenfassung

Die Gentherapie mit adenoviralen Vektoren bietet im Vergleich zu anderen Vektoren durch das breite Spektrum an Zielzellen, die leichte Aufbereitung mit hohen Titern sowie der Möglichkeit einer relativ großen Transgeninsertion einige Vorteile. Die Tatsache, dass die virale DNA im Kern der Wirtszelle als Episom vorliegt und nicht in das Genom integriert wird, führt jedoch gerade im Hinblick auf die Gentherapie metabolischer Erkrankungen zu dem entscheidenden Nachteil einer nur transienten Genexpression.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Nachteil der transienten Genexpression durch die adenovirale Koexpression des immunmodulatorisch wirkenden MHC Klasse I Homologon m144 des murinen Cytomegalievirus zu minimieren. Den Weg zur Generierung eines funktionstüchtigen Expressionsplasmids, dem pAd.CMV.luc.IRES.m131/129, welches mit dem m131/129 für ein weiteres immunmodulatorisch wirkendes Chemokin-Homologon codiert, ist beschrieben und das Plasmid steht für Folgeversuche zur Verfügung.

Für die Charakterisierung des immunmodulatorischen Effektes des m144 wurde die Expression des Markergens Luciferase *in vitro* und *in vivo* der beiden adenoviralen Vektoren Ad.CMV.luc.IRES.m144 und Ad.CMV.luc miteinander verglichen. Im Tiermodell mit balb/c Mäusen zeigte sich bereits nach fünf Tagen post infectionem eine deutliche Überlegenheit der Transgenexpression im aufbereiteten Lebergewebe der mit dem Ad.CMV.luc.IRES.m144 infizierten Mäuse und unterschied sich damit deutlich von den *in vitro* Versuchen. Nach 14 und 20 Tagen war die Differenz der Expression noch signifikant, die absoluten Werte beider Versuchsgruppen befanden sich jedoch auf niedrigem Niveau. Ein Unterschied in der Entzündungszellinfiltration der Leberhistologie beider Gruppen war nicht nachweisbar.

Fazit: Das immunmodulatorische m144 des murinen Cytomegalievirus führt in der frühen Phase der Infektion bei balb/c Mäusen zu einer circa 4000-fachen höheren Genexpression, hat jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Expressionsdauer.

## 6 Literaturverzeichnis

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979): Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282(5739): 615-616.

Andreason GL, Evans GA (1988): Indroduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* 6(7): 650-660.

Benihoud K, Yeh P and Perricaudet M (1999): Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10, 440–447.

Bercovich JA, Grinstein S, Zorzopulos J (1992): Effect of DNA concentration of recombinant plasmid recovery after blunt-end ligation. *Biotechniques* 12(2): 190-193.

Bergelson JM (1999): Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem Pharmacol* 57(9): 975-979.

Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell and R. W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320-1323.

Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, Droguett G, Horwitz MS, Wickham T, Crowell RL and Finberg RW (1998): The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *Journal of Virology* 72(1): 415-419.

Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL (1994): An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(19): 8802-8806.

Bett AJ, Prevec L and Graham FL (1993): Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors, *Journal of Virology*. 67: 5911-21.

Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.

Bordier C (1981): Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256(4): 1604-1607.

Browne H, Smith G, Beck S, Minson T (1990): A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalievirus and  $\beta 2$  microglobulin. *Nature* 347: 770-772.

Chapman TL, Bjorkman PJ (1998): Characterization of a Murine Cytomegalievirus Class I Major Histocompatibility Complex (MHC) Homolog: Comparison to MHC Molecules and to the Human Cytomegalievirus MHC Homolog. *J Virol* 72(1): 460-466.

Check E (2002): Gene therapy: A tragic setback. *Nature* 420(6912): 116-188.

Chen H, Ramachandra M, Padmanabhan R (1994): Biochemical characterization of a temperature-sensitive adenovirus DNA. *Virology* 205: 364–70.

Christ M, Lusky M, Stoeckel F, Dreyer D, Dieterle A, Michou AI, Pavirani A and Mehtali M (1997): Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol Lett* 57(1-3): 19-25.

Cotten M, Baker A, Saltik M, Wagner E, Buschle M (1994): Lipopolysaccharide is a frequent contamination of plasmid DNA preparation and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus. *Gen Ther* 1(4): 239-246.

Cretney E, Degli-Esosti MA, Densley EH, Farrell HE, Davis-Poynter NJ, Smyth MJ (1999): m144, a Murine Cytomegalievirus (MCMV)-encoded Major Histocompatibility Complex Class I Homologue, Confers Tumor Resistance to Natural Killer Cell-mediated Rejection. *J. Exp. Med.* 199 Aug.2;190(3): 435-443.

Fabry CM, Rosa-Calatrava M, Conway JF, Zubieta C, Cusack S, Ruigrok RW and Schoehn G (2005): A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 Kapsid. *Embo J* 24(9): 1645-1654.

Farrell HE, Vally H, Lynch DM, Fleming P, Shellam GR, Scalzo AA, Davis-Poynter NJ (1997): Inhibition of natural killer cells by a cytomegalievirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* 3;386(6624): 510-4.

Fleming P, Davis-Poynter N, Degli-Esosti M, Densley E, Papadimitriou J, Shellam G, Farrell H (1999): The Murine Cytomegalievirus Chemokine Homolog, m131/129, Is a Determinant of Viral Pathogenicity. *Journal of virology* 73: 6800-6809.

Gao G-P, Yang Y, Wilson JM (1996): Biology of adenoviral vectors deleted of E1 and E4 for liver-directed gene therapy. *Journal of virology* 70(12): 8934-43.

Ginsberg HS, Lundholm-Beauchamp U, Horswood RL, Pernis B, Wold WS, Chanock RM, Prince GA (1989): Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease. *Proc Nat/ Acad Sci USA* 86:3823-3827.

Gluzman Y (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23(1): 75-182.

Gooding LR, Elmore LW, Tollefson AE, Brady HA and Wold WSM (1988): A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* 53: 341-346.

Graham FL, Prevec L (1991): Manipulation of adenovirus vectors. In: Walker JM, Murray EJ (ed) *Methods in Molecular Biology* 7. New Jersey, The Humana Press Clifton: 109-128.

Graham FL, Prevec L (1995): Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* 3(3): 207-220.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1): 59-74.

Greber UF, Webster P, Weber J and Helenius A (1996): The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *Embo J* 15(8): 1766-1777.

Günzburg WH, Salmons B (1997): *Gentransfer in Säugetierzellen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580.

Hay RT, Freeman A, Leith I, Monaghan A and Webster A (1995): Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 199 (Pt 2): 31-48.

Hearing P, Samulski RJ, Wishart WL, Shenk T (1987): Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol* 61(8): 2555-2558.

Hellen CU and Sarnow P (2001): Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15: 1593–1612.

Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel DT and 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* 16(9): 2294-2306.

Horwitz MS (1996): Adenoviruses. in: Fields Virology. Fields BN, Knipe DM and Howley PM. Philadelphia, Raven Publishers: 2149-2171.

Johannes G and Sarnow P (1998): Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. RNA (N. Y.) 4: 1500–1513.

Kay M, Liu D and Hoogerbrugge PM (1997): Gene Therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 12744-12746.

Kirby I, Davison E, Bevil AJ, Soh CP, Wickham TJ, Roelvink PW, Koveshi I, Sutton BJ and Santis G (2000): Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. J Virol 74(6): 2804-2813.

Koveshi I, Brough DE, Bruder JT and Wickham TJ (1997): Adenoviral vectors for gene transfer. Curr Opin Biotechnol 8: 583–589.

Kreppel F and Kochanek S (2007): Modification of Adenoviral Gene Transfer Vectors With Synthetic Polymers: A Scientific Review and Technical Guide. Molecular Therapy 16(1): 16-28.

Kubota A, Kubota S, Farrell HE, Davis-Poynter N, Takei F (1999): Inhibition of NK cells by murine CMV-encoded class I MHC homologue m144. Cellular Immunity 191(2):145-51.

Kurata H, Liu CB, Valkova J, Koch AE, Yssel H, Hirabayashi Y, Inoue T, Yokota T and Arai K (1999): Recombinant adenovirus vectors for cytokine gene therapy in mice. J Allergy Clin Immunol 103(5 Pt 2): 471-484.

Lanier LL (1998): NK cell receptors. Annu Rev Immunol;16: 359.

Lanier LL, Corliss B, Phillips JH (1997): Arousal and inhibition of human NK cells. Immunol Rev;155: 145-154.

Leopold P, Kreitzer G, Miyazawa N, Rempel S, Pfister KK, Rodriguez-Boulan E, Crystal RG (2000) : Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Human Gene Therapy* 11: 151-165.

Lichy JH, Field J, Horwitz MS and Hurwitz J (1982): Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase: role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(17): 5225-5229.

Lusky M, Christ M, Rittner K, Dieterle A, Dreyer D, Mourots B, Schultz H, Stoeckel F, Pavirani A and Mehtali M (1998): In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1}E2A, or E1}E4 deleted. *Journal of Virology* 72: 2022-2032.

MacDonald MR, Burney MW, Resnick SB, Virgin IV HW (1999): Spliced mRNA Encoding the murine Cytomegalievirus Chemokine Homolog Predicts a  $\beta$ -Chemokine of Novel Structure. *Journal of virology* 73(5): 3682-3691.

MacDonald MR, Li X-Y, Virgin IV HW (1997): Late expression of a  $\beta$ -Chemokine Homolog by Murine Cytomegalievirus. *Journal of virology* 71(2): 1671-1678.

Madrow S, Falke D (1997): *Molekulare Virologie*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 391-411.

Mannino RJ, Gould-Fogerite S (1988): Liposome mediated gene transfer. *Biotechniques* 6(7): 682-690.

Mathias P, Galleno M and Nemerow GR (1998): Interactions of soluble recombinant integrin  $\alpha$  v  $\beta$  5 with human adenoviruses. *J Virol* 72(11): 8669-8675.

Matthews DA, Russell WC (1995): Adenovirus protein-protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *J Gen Virol* 76 ( 8): 1959-1969.



Mitani K, Graham FL, Caskey CT and Kochanek S (1995): Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus- dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(9): 3854-3858.

Morrall N, Parks R, Zhou H et al. (1998): High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological Levels of  $\alpha$ 1-Antitrypsin with negligible toxicity. *Hum Gene Ther* 9: 2709–2716.

Morsy MA and Caskey CT (1999): Expanded-capacity adenoviral vectors - the helperdependent vectors. *Molecular Medicine Today* 5(1): 18-24.

Mountain A (2000): Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* 18: 119–128.

Naylor LH (1999): Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol* 58(5): 749-57.

Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA and 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 USA* 93(24): 13565-13570.

Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI and Hellen CU (2001): Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7029–7036.

Parks R, Eveleigh C and Graham F (1999): Use of helper-dependent adenoviral vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration. *Gene Therapy* 6: 1565-1573.

Rawlison WD, Farrell HE, Barrell BG (1996): Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalievirus. *J Virol* 70(12): 8833-8849.

Rekosh DM, Russell WC, Bellet AJ, Robinson AJ (1977): Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* 11(2): 283-295.

Richardson CC, Schildkraut CL, Aposhian HV, Kornberg A (1964): Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XIV: Further purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 239: 222-232.

Robbins PD, Tahara H and Ghivizzani SC (1998): Viral vectors for gene therapy. *TibTech* 16: 35 – 40.

Roizman B, Baines J (1991): The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 14(2): 63-79.

Romano G, Michell P, Pacilio C and Giordano A (2000): Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 18(1): 19-39.

Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH and Ward TG (1953): Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84(3): 570-573.

Russell WC (2000): Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81(11): 2573-2604.

Saederup N, Aguirre SA, Sparer TE, Bouley DM, Mocarsci ES (2001): Murine Cytomegalievirus CC Chemokine Homolog MCK-2 (m131/129) Is a Determinant of Dissimination That Increases Inflammation at Initial Sites of Infection. *Journal of virology* 75(20): 9966-9976.

Schall TJ, Bacon KB (1994): Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Current opinion in immunology* 6: 865-873.

Schiedner G, Morral N, Parks RJ et al. (1998): A high capacity adenovirus vector with all viral genes deleted results in improved in vivo expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18: 180–183.

Schiedner G, Morral N and Parks R (1998): Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nature Genetics* 18: 180-183.

Schluger NW, Rom WN (1997): Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Current opinion in immunology* 9: 504-508.

Schmid SI and Hearing P (1998): Cellular components interact with adenovirus type 5 minimal DNA packaging domains. *J Virol* 72(8): 6339-6347.

Shenk T (1996): Adenoviridae: The viruses and their replication (Chapter 67). In: *Fields Virology, Third Edition*, edited by Knipe BN, Howley PM et al.. Raven Publishers, Philadelphia: 2111-2148.

Skoskiewicz MJ, Colvin RB, Schneeberger EE and Russell PS (1985): Widespread and selective induction of major histocompatibility complex-determined antigens in vivo by g interferon. *J Exp Med* 162: 1645.

Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM (1993): Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J* 12(7): 2589-2599.

Tomko RP, Johansson CB, Totrov M, Abagyan R, Frisen J, Philipson L (2000): Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res* 255(1): 47-55.

Townsend A, Bodmer H (1989): Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rec Immunol* 7: 601-624.

Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischler E, Rutter WJ, Goodman HM (1977): Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196(4296): 1313-1319.

Vellinga J, Van der Heijdt S and Hoeben RC (2005): The adenovirus Kapsid: major progress in minor proteins. *J Gen Virol* 86(6): 1581-1588.

Wang X and Bergelson JM (1999): Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol* 73: 2559–2562.

Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G (1998): Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol* 72: 3455-3458.

Waring MJ (1965): Complex formation between ethidium bromide and nucleic acid. *J Mol Biol* 13(1): 269-282.

Webster A, Russell S, Talbot P, Russell WC and Kemp GD (1989): Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity. *J Gen Virol* 70 (12): 3225-3234.

Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC (1968): Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem* 243(17): 4543-4555.

Wilson JM (1996): Adenoviruses as Gene-Delivery Vehicles. *The New England Journal of Medicine* 334(18): 1185-1187.

Yang Y, Ertl HC, and Wilson JM (1994): MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1: 433.

Yang Y, Jooss KU, Su CI, Ertl HC, Wilson JM (1996): Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in L&O. *Gene Ther* 3: 137-144.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Gonczol E, Engelhardt JF, Wilson JM (1994): Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nature Genetics* 7: 362-9.

Yang VP, Su Q, Wilson JM (1996): Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. *J Virol* 70: 7209-7212.

Yang Y, Wilson JM (1995): Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo. *J Immunol* 155: 2564-2570.

Yang Y, Xiang Z, Ertl HCJ, Wilson JM (1995): Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7257-7261.

Zhang HG, Zhou T, Yang P, Edwards CK III, Curiel DT, Mountz DM (1999): Inhibition of tumor necrosis factor alpha decreases inflammation and prolongs adenovirus gene expression in lung and liver. *Hum Gene Ther* 9: 1875-1884.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Anteile verschiedener Vektoren an gentherapeutischen klinischen Studien  
Quelle: [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)
- Abbildung 2: Genomkarte von Adenoviren und davon abgeleiteter Vektoren
- Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines adenoviralen Partikels
- Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Viruspartikeln
- Abbildung 5: Zusammenfassung der wichtigsten Ereignisse der frühen Phase des adenoviralen Lebenszyklus (Abbildung modifiziert nach Günzburg und Salmons, 1997)
- Abbildung 6: Funktion des MHC I-Homologon m144
- Abbildung 7: Nachweis der m144 cDNA (PCR) und mRNA RT-PCR (35x)
- Abbildung 8: Virusbanden nach der Ultrazentrifugation
- Abbildung 9: Zellkulturschale am 10. Tag nach Infektion mit der Verdünnungsstufe 1:107. Mehrere Plaques sind zu erkennen (Beispiel eines Plaque Assays).
- Abbildung 10: Plasmidkarte des Expressionsplasmids pAd.CMV.luv.IRES.m131/129 mit verbliebenen Schnittstellen der Klonierungsschritte.
- Abbildung 11: In-vitro Expression der Luciferase in HepG2-Zellen (1000fache Verdünnung)
- Abbildung 12: In-vitro Expression der Luciferase in HepG2-Zellen (1000fache Verdünnung)
- Abbildung 13: Luciferaseexpressionsassay der aufbereiteten Leberhomogenisate des dreizeitigen Tiermodells
- Abbildung 14: Leberhistologie nach Infektion mit Ad.DL312 und ohne virale Infektion
- Abbildung 15: Anteile der Indikationen derzeitiger gentherapeutischer klinischer Studien

### 7.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Vor- und Nachteile viraler Vektoren
- Tabelle 2: Übersicht der adenoviralen Serotypen
- Tabelle 3: Verwendete Plasmide
- Tabelle 4: Verwendete Zelllinien
- Tabelle 5: Luciferaseexpression *in vitro*

## 8 Lebenslauf

<b>Name</b>	Henning Lange
<b>Geburtsdatum/-ort</b>	31. Oktober 1977, Bielefeld
<b>Schulbildung</b>	
09/90 – 05/97	Albert-Einstein-Gymnasium Hameln
Abschluss	Abitur, Note 1,8
<b>Grundwehrdienst</b>	
11/97 – 08/98	Fallschirmspringer beim 5. Fallschirmpanzerabwehrbataillon in Wildeshausen
<b>Hochschulstudium</b>	
10/98 – 09/01	Studium der Medizin an der Christian-Albrecht-Universität Kiel
07/00	Physikum, Note 2,66
07/01	1. Staatsexamen, Note 3
10/01 – 04/05	Studium der Medizin an der Universität Hamburg
03/04	2. Staatsexamen, Note 2,66
04/04 – 03/05	Praktisches Jahr in den Bereichen: <ul style="list-style-type: none"><li>• Anaesthesiologie und Intensivmedizin am Klinikum Nord, Hamburg im Bereich der Anaesthesie sowie der neurochirurgischen Intensivstation</li><li>• Innere Medizin am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf in den Bereichen Infektiologie und Endokrinologie sowie Kardiologie</li></ul>

- Chirurgie am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf in den Bereichen Hepatobiliäre Chirurgie sowie Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

## Doktorarbeit

seit 11/01

Labor für Gentherapie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Arbeitsgruppe Dr. med. Andreas Block. Thema: Wege zur persistierenden adenoviralen Genexpression mittels immunmodulatorischer Proteine des Cytomegalievirus

## Beruflicher Werdegang

seit 09/05

Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Giessen-Marburg, Standort Marburg

## Publikationen

Lange H, Eberhart L. Kardiovaskuläre Nebenwirkungen von klassischen NSAR und COXibien. *Anästhesiol Intensivmed Schmerzther* 2007;42:514-7.

Lange H, Kranke P, Steffen P, Steinfeld T, Wulf H, Eberhart LHJ. Analgetikakombinationen zur postoperativen Schmerztherapie- Übersicht zu Effektivität und Nebenwirkungen. *Anästhesist* 2007;56:1001-1016.

Eberhart LHJ, Frank S, Lange H, Morin AM, Scherag A, Wulf H, Kranke P. Systematic review on the recurrence of postoperative nausea and vomiting after a first episode in the recovery room - implications for the treatment of PONV and related clinical trials. *BMC Anesthesiology* 2006; 6(14).

Eberhart L, Arndt C, Lange H, Koch T, Wulf H. A simplified risk score to predict difficult endotracheal intubation. *European Journal of Anaesthesiology (Oxford)* 24 (Suppl 39), 19AP3-9, 2007.



## 9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Heiner Greten aus der Medizinischen Klinik I und Poliklinik I des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für seine Bereitschaft, diese Arbeit als Doktorvater zu begleiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas Block, Leiter des Labors für Gentherapie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, für die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Er lehrte mich das wissenschaftliche Arbeiten, stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und war sowohl in fachlicher als auch menschlicher Sicht in jeder Phase meiner Arbeit an meiner Seite.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Peter Schäfer aus der Mikrobiologie, ohne dessen Kooperation und Ideengebung diese Arbeit nicht entstanden wäre sowie Herrn Professor Dr. Hans-Jörg Schäfer aus dem Institut für Pathologie für die Durchführung der histologischen Untersuchungen.

Allen Mitarbeitern des Labors für Gentherapie sei zudem ein herzlicher Dank für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfsbereitschaft ausgesprochen. Philipp Breuch, Seda Cinar, Jürgen Müller, Henning Ortlepp und Doris Pankoke sorgten stets für eine gute Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei Holger Wulff für seine Unterstützung im wissenschaftlichen und freundschaftlichen Sinne.

Viel Dank gebührt zudem meinen Eltern, ohne deren Unterstützung in jeder Hinsicht mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

**Eigenständigkeitserklärung:**

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.

Marburg, den 17.04.2008