

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
1. Medizinische Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. A.W. Lohse

Verlängerte Genexpression adenoviraler Vektoren durch MHC I Homologa

Dissertation

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

Henning Ortlepp

aus Pinneberg

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 14.12.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof Dr. W. Fiedler

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof Dr. F. Thaiss

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	1
2. Einleitung.....	2
2.1. Gentherapie	2
2.1.1. Allgemein	2
2.1.2. Vektoren.....	2
2.2. Adenoviren.....	4
2.2.1. Allgemein	4
2.2.2. Aufbau.....	5
2.2.3. Struktur des Genoms	6
2.2.4. Lebenszyklus	7
2.2.5. Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie	8
2.3. Reaktionen des Immunsystems auf virale Infektionen	10
2.3.1. Allgemein	10
2.3.2. MHC-Komplexe.....	11
2.3.3. Resistenzmechanismen des Zytomegalievirus	12
3. Material und Methoden	15
3.1. Material	15
3.1.1. Chemikalien	15
3.1.2. Molekularbiologische Enzyme, Standards und Proteine	16
3.1.3. Puffer und Lösungen für die Zellkultur	16
3.1.4. Wasser.....	17
3.1.5. Reagenzienkits	17
3.1.6. Verbrauchsmaterialien	17
3.1.7. Geräte	18
3.1.8. Plasmidvektoren.....	18
3.1.9. Bakterien.....	19
3.1.10. Zelllinien.....	19
3.2. Klonierung der Plasmide	20
3.2.1. Kultur von Bakterien.....	20
3.2.2. Transformation kompetenter Bakterien	21
3.2.3. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	21
3.2.4. Analyse von Plasmid-DNA	23

3.2.5. Quantifizierung von DNA durch Bestimmung der optischen Dichte (OD).....	23
3.2.6. Restriktionsverdau und Gelelektrophorese	24
3.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden	25
3.2.8. Ligation	26
3.3. Zellkultur	26
3.3.1. Splitten von Zellen.....	27
3.3.2. Kryokonservierung von Zellen.....	27
3.3.3. Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	28
3.4. Generierung von Adenoviren in 293-Zellen	28
3.4.1. Calcium-Präzipitation der Plasmide	28
3.4.2. β -Gal-Kontrolle zur Einschätzung der Transfektionseffizienz.....	29
3.4.3. Agarose-Overlay der transfizierten Zellen.....	30
3.4.4. CPE-Assay.....	31
3.4.5. Amplifikation und Aufreinigung von Adenoviren	31
3.4.6. Plaque-Assay zur Titration der Viren.....	34
3.5. Expressionsnachweis <i>in vitro</i>	35
3.5.1. Infektion	35
3.5.2. Herstellung von Lysaten.....	35
3.5.3. Proteinassay	36
3.5.4. Luciferase-Assay.....	36
3.5.5. Sequenzierung der Schnittstellen	37
3.6. Expressionsnachweis <i>in vivo</i>	38
3.6.1. Haltung der Versuchstiere.....	38
3.6.2. Durchführung der Tierversuche	38
3.6.3. Herstellung von Lysaten aus Lebergewebe	39
3.6.4. Luc-Assay	40
4. Ergebnisse.....	41
4.1. Klonierung der Plasmide.....	41
4.2. Herstellung der adenoviralen Vektoren.....	45
4.3. Expressionsnachweis <i>in vitro</i>	48
4.4. Expressionsnachweis <i>in vivo</i>	50
5. Diskussion.....	51
6. Zusammenfassung	60

7. Literaturverzeichnis.....	61
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	69
9. Abkürzungsverzeichnis.....	70
10. Danksagung	72
11. Lebenslauf	73

1.

1. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die Persistenz der durch adenovirale Vektoren erzeugten Genexpression durch ein immunmodulatorisches Protein verlängert werden kann. Dazu soll ein adenoviraler Vektor generiert werden, der das dem murinen Cytomeglie-Virus entnommene immunmodulatorische Gen m144 mit dem Marker-Gen Luciferase koexprimiert. Das immunmodulatorische Gen kodiert für ein Protein, das dem MHC-I-Komplex der murinen Körperzelle homolog ist. Dadurch soll die primäre Immunantwort des immunkompetenten Tieres auf die Infektion der Körperzellen mit den adenoviralen Vektoren inhibiert werden.

Zunächst soll ein Plasmid hergestellt werden, das die Expressionskassette mit den beiden Genen m144 und luc beinhaltet sowie einen Teil des adenoviralen Genoms. Anschließend soll nach der Methode von Graham *et al.* (1995) durch Rekombination des Expressionsplasmids mit einem weiteren Plasmid in der embryonalen Nierenepithelzelllinie 293 ein Adenovirus erzeugt werden. Das so gewonnene Adenovirus soll amplifiziert und aufgereinigt werden.

Es folgt nun die Charakterisierung des Adenovirus durch Quantifizierung der Luciferaseexpression *in vitro*. Anschließend soll durch systemische Injektion des Virus in immunkompetente balb/c Mäuse die Expression der Luciferase und die Dauer der Genexpression im Lebergewebe untersucht werden.

2. Einleitung

2.1. Gentherapie

2.1.1. Allgemein

Das menschliche Genom enthält 50 000-100 000 Gene. Mutationen können jedes dieser Gene betreffen und alle Genprodukte, das heißt Proteine, können strukturell verändert sein: von einer genetisch bedingten Strukturänderung betroffen sein können neben Enzymen Transport- und Rezeptorproteine in Zellmembranen, Proteohormone oder Transkriptionsfaktoren, Transportproteine im Blut, Signaltransduktionsproteine, Onkogene, Antionkogene oder Proteine, die an Blutgerinnung oder Infektabwehr teilnehmen. Genetische Änderungen spielen bei der Mehrzahl der Erkrankungen des Menschen (Krebs, Herz-Kreislaufkrankungen, Diabetes, Nervenkrankheiten, Autoimmunprozesse, Infektionsanfälligkeit) eine Rolle. Die Gentherapie ist ein relativ junger Ansatz zur kausalen Therapie solcher Erkrankungen. Ziel der Gentherapie ist die Änderung des Krankheitsverursachenden Genotyps. Durch den Transfer der korrekten Erbinformation in den Körper soll der vorhandene Defekt, ob erworben oder angeboren, ausgeglichen oder behoben werden.

Um genetische Information erfolgreich in Zellen zu transferieren bedient man sich verschiedener Transportwege, so genannter Vektoren. Dabei ist die Größe der transportierbaren Gene durch die Transportkapazität der Vektoren limitiert. Es eignen sich besonders von Introns befreite Gene zum Transfer. Des Weiteren ist die Spezifität des Vektors für die Zielzelle und die Expression des zu übertragenden Genes in der Zielzelle von Bedeutung. Letztendlich ist die Sicherheit der Experimente von entscheidender Bedeutung, um die Nebenwirkungen bei der Anwendung an Menschen so gering wie möglich zu halten.

2.1.2. Vektoren

Einen Überblick über die Hauptgruppen der eingesetzten Viren findet sich in Tabelle 1 nach Thomas et al. (2003)

Tabelle 1: Virale Vektoren in der Gentherapie

Viraler Vektor	Charakteristika	Vorteile	Nachteile
Retroviren	<ul style="list-style-type: none"> • RNA-Virus • Integration in das Wirtsgenom • Bis 8 kb Kapazität für Fremd-DNA 	<ul style="list-style-type: none"> • persistierende Genexpression in sich teilenden Zellen • niedriges inflammatorisches Potential 	<ul style="list-style-type: none"> • nur Infektion von sich teilenden Zellen • Integration kann maligne Transformation hervorrufen • Relativ niedrige Titer erreichbar ($10^6 - 10^7$ Partikel/ml)
Lentiviren	<ul style="list-style-type: none"> • RNA-Virus • Integration in das Wirtsgenom • bis 8 kb Kapazität für Fremd-DNA 	<ul style="list-style-type: none"> • persistierende Genexpression in den meisten Geweben • niedriges inflammatorisches Potential 	<ul style="list-style-type: none"> • Integration kann maligne Transformation hervorrufen
Adeno-assoziierte Viren	<ul style="list-style-type: none"> • ssDNA-Virus • 90% des Genoms episomal, 10% in Wirtsgenom integriert • < 5 kb Kapazität für Fremd-DNA 	<ul style="list-style-type: none"> • nicht inflammatorisch • nicht pathogen 	<ul style="list-style-type: none"> • geringe Transferkapazität
Adenoviren	<ul style="list-style-type: none"> • dsDNA-Virus • Genom liegt in der Wirtszelle episomal vor • bis 8 kb Kapazität für Fremd-DNA (bei helper-abhängigen Viren bis zu 30 kb) 	<ul style="list-style-type: none"> • sehr effiziente Transduktion der meisten Gewebe • Herstellung in hohen Titern möglich (10^{12} Partikel/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> • Kapsid kann eine starke inflammatorische Reaktion des Immunsystems auslösen • nur verübergehende Genexpression
Herpesvirus 1	<ul style="list-style-type: none"> • dsDNA-Virus • bis 40 kb Kapazität für Fremd-DNA (bei Amplicon 150 kb) 	<ul style="list-style-type: none"> • große Verpackungs-kapazität • starker Tropismus zu Neuronen 	<ul style="list-style-type: none"> • kann inflammatorische Reaktion des Immunsystems auslösen • in nicht-neuronalen Zellen nur transiente Transgenexpression

Neben physikalischen Methoden kommen in erster Linie Viren als Vektoren für den Gentransfer in eukaryotische Zellen in Frage. Die physikalischen Methoden wie die Elektroporation, die direkte Injektion von nackter Plasmid-DNA oder Transfer durch Liposomen haben sich bis jetzt meist als ineffektiv erwiesen (Romano *et al.* 2000). Bei den Viren kommen zwei verschiedene Gruppen in Frage: Viren, deren Erbinformation sich in das Genom des Wirts integriert (Retroviren und Lentiviren), oder Viren, deren Erbinformation episomal im Zellkern der Wirtszellen persistiert (Adeno-assoziierte Viren, Adenoviren, Herpesviren).

Ein idealer Vektor für die Gentherapie sollte folgende Eigenschaften besitzen:

- In der Herstellung hohe Konzentrationen möglich ($>10^8$ Partikel/ml)
- Einfache und reproduzierbare Herstellung
- Hohe Effizienz beim Einbringen des Therapiegens in die Zielzellen
- Spezifische Infektion der Zielzellen
- Regulierbare Genexpression (regulierbare Promotoren)
- Keine Immunantwort gegen den Vektor
- Keine Pathogenität des Vektors

Derzeit erfüllt noch kein viraler Vektor alle diese Eigenschaften.

2.2. Adenoviren

2.2.1. Allgemein

Adenoviren wurden 1953 zuerst in adenoidem Gewebe entdeckt und entsprechend benannt (Rowe *et al.* 1953). Sie werden eingeteilt in die Mastadenoviridae, welche Säugetiere infizieren, und die Aviadenoviridae, welche verschiedene Vogelarten befallen. Bei den Mastadenoviridae sind inzwischen 41 Typen bekannt, die sehr verschiedene Krankheitsbilder verursachen können. Die Infektionen verlaufen meist selbstlimitierend, in adenoidem Gewebe können die Viren aber auch über Monate persistieren und später reaktiviert werden.

Wichtig sind die „grippalen Infekte“ des oberen, seltener des unteren Respirationstrakts. Je nach Virustyp, aber auch vermutlich entsprechend der individuellen Disposition des Infizierten, äußern sich die respiratorischen Infektionen in einer Rhinitis oder abakteriellen Pharyngitis, aber auch als akute influenzaähnliche Infektion oder sogar, besonders bei Kleinkindern sowie immunsupprimierten und multimorbiden Patienten, als unter Umständen tödlich verlaufende Pneumonie.

Die Augeninfektionen, die allein, aber häufig auch kombiniert mit Pharyngitis auftreten, reichen von einer folliculären Konjunktivitis bis zu einer manchmal mit bleibender Visusminderung verlaufenden Keratokonjunktivitis.

Außerdem verursachen Virusstämme 40 und 41 intestinale Infektionen. Bei Kleinkindern gehören die Adenoviren nach den Rotaviren zu den häufigsten Durchfallerregern.

Die Infektion verbreitet sich bei den respiratorischen Manifestationen meist durch Tröpfcheninfektion, aber auch als Schmutz- und Schmierinfektion. Augeninfekte werden durch Badewasser, aber auch iatrogen durch ungenügend sterilisierte augenärztliche Instrumente übertragen. Die enteralen Erscheinungsformen werden meist fäkal-oral übertragen.

Im Tierexperiment konnte einigen Typen, insbesondere Typ 12, 18 und 31, ein onkogenes Potential nachgewiesen werden, welches sich allerdings beim Menschen bis heute nicht bestätigen ließ. (Kayser *et al.* 1998, S. 423f). Allerdings konnten Härtl *et al.* (2008) zeigen, daß die Adenovirus-Typen 2,5 und 12 in der Lage sind, eine Transformation der infizierten Zellen durch die Antagonisierung der Apoptose herbeizuführen. Somit ist ein gewisses dem Wildtyp-Adenovirus Typ 5 ein gewisses onkogenes Potential zu unterstellen.

2.2.2. Aufbau

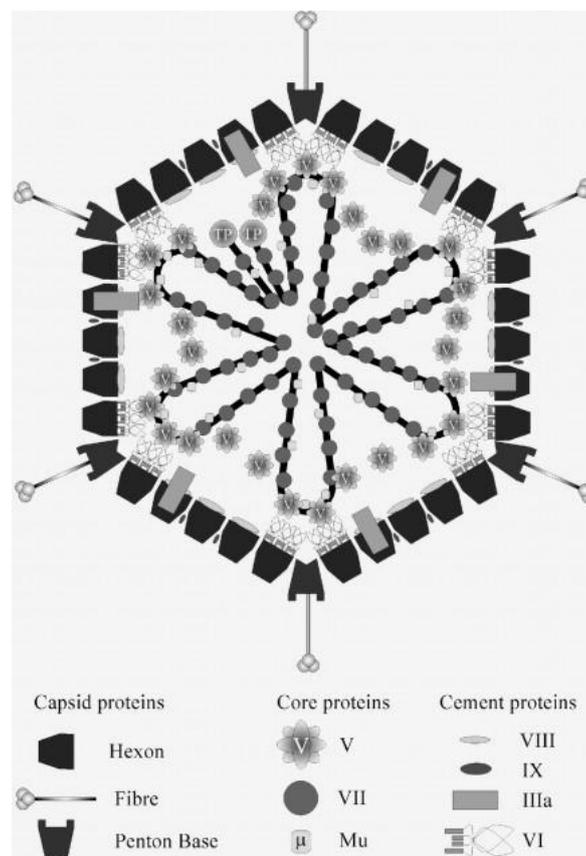


Abbildung 1: Struktur eines Adenovirus (Quelle: Russell 2000)

Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Viren, die eine Ikosaederstruktur aufweisen, einen Durchmesser von etwa 60-90 nm haben und keine Hüll-

membran besitzen. Das lineare Genom ist etwa 36 kb lang (Löffler *et al.* 1998, S. 303).

Das Kapsid wird aus 20 gleichseitigen Dreiecken und 12 Scheitelpunkten gebildet, aus denen jeweils eine Faser herausragt. Es besteht aus 252 Untereinheiten: 240 Hexonproteine, die die Oberflächen und Kanten der gleichseitigen Dreiecke ausmachen und 12 Pentonbasisproteine, die die Scheitelpunkte darstellen, sowie Fiberproteinen (Stewart *et al.*, 1993). Das Hexonprotein setzt sich aus drei Molekülen des Polypeptids II zusammen und ist mit den Polypeptiden VI, VIII und IX assoziiert. Jede Pentonbasis besteht aus 5 Molekülen Polypeptid III und jedes Fiberprotein aus 3 Molekülen Polypeptid IV. Die Polypeptide V (180 Kopien/Partikel) und VII (1070 Kopien/Partikel) sind mit der DNA verbunden.

2.2.3. Struktur des Genoms

Das lineare nicht segmentierte Genom des Adenovirus besteht aus einer dsDNA mit einer Größe von etwa 36 kb. Die Größe variiert mit der Gruppenzugehörigkeit. Am Anfang des Genoms befindet sich das zur Replikation notwendige ITR und die so genannten Verpackungssequenzen, welche auf der DNA vorhanden sein müssen, damit diese in adenovirale Partikel verpackt werden können (Schmid und Hearing 1998).

Das Genom wird in Transkriptionseinheiten unterteilt, wobei zunächst Transkripte vor („early“) und nach („late“) der DNA-Replikation unterschieden werden. Es existieren 5 frühe (E1A, E1B, E2, E3, E4) und eine späte Transkriptionseinheit, welche posttranskriptionell prozessiert wird. Im Allgemeinen gilt, dass die frühen Transkriptionseinheiten regulatorische und die späte Transkriptionseinheit strukturelle Proteine kodieren. Die E1-Region kodiert für zwei Transkriptionsfaktoren, welche den Zellstoffwechsel in Hinblick auf die Virusreplikation beeinflussen, die E2-Genprodukte stellen die Maschine für die Virusreplikation zur Verfügung (Russell 2000). Eine Suppression der wirtseigenen Immunantwort wird von der E3-Region bewirkt (Russell 2000). Die E4-Gene erleichtern hauptsächlich den Stoffwechsel der viralen mRNA, fördern aber auch die Replikation der viralen DNA und unterdrücken die Proteinbiosynthese des Wirts (Russell 2000).

2.2.4. Lebenszyklus

Der Lebenszyklus der Adenoviren kann in zwei Phasen aufgeteilt werden. Die frühe Phase umfasst den Eintritt des Virus in die Wirtszelle und den Weg des Virusgenoms in den Zellkern. Durch diese frühen Ereignisse werden die Zellfunktionen so beeinflusst, dass die späte Phase, also die Replikation der viralen DNA sowie die anschließende Transkription und Translation des Virusgenoms, erleichtert wird. Das führt zur Anhäufung der Strukturproteine im Zellkern und der Reifung der infektiösen Partikel. Die frühe Phase hat in einer empfänglichen Zelle eine Dauer von etwa 6 bis 8 h, die späte von etwa 4 bis 6 h (Russell 2000).

Der für die Adsorption des Virus an die Wirtszelle verantwortliche Teil des Kapsids ist der Kopf des Fiberproteins (Chrobozech *et al.* 1995). Damit bindet das Virus an den Coxsackie/Adenovirus-Rezeptor (CAR), der zur Immunglobulinsuperfamilie gehört (Tomko *et al.* 2000). Das Polypeptid III der Pentonbasisproteine enthält die integrinbindende Sequenz RGD (Arg-Gly-Asp). Verteilt auf jede der 12 Seitenflächen des Ikosaeders sorgen die Pentobasen für zwölf potentielle Anhaftungsstellen für die Integrine. Über Bindung Pentobasisproteine an $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$ -Integrine wird eine Clathrin-vermittelte Endozytose und damit die Internalisierung eingeleitet (Mathias *et al.* 1998). Nach Aufnahme in Endosomen entgeht das Virusgenom dem Abbau in den Lysosomen, da die adenoviralen Kapsidproteine den Abbau durch lysosomale Nucleasen verhindern. Durch Ruptur der Phagolysosomenmembran wird das Nucleocapsid in das Cytosol freigesetzt, durch die virale Protease L3/p23 das Viruskapsid angedaut und so durch die Kernporen in den Nucleus transportiert (Greber *et al.* 1996).

In der späten Phase wird nun im Kern durch zelluläre Transkriptionsfaktoren das E1A-Gen prozessiert. Dadurch wird die Transkription der weiteren frühen Gene, E1B bis E4, eingeleitet. Ein Komplex aus E1B und E4 induziert wiederum die Expression der späten Transkriptionseinheiten durch Aktivierung des Major Late Promotors. Dabei wird ein 28kb langes RNA-Molekül transkribiert, welches mehrfach gespleißt wird. Die fünf Spleißprodukte codieren die Struktur- und Stabilitätsproteine. Die Anwesenheit von Verpackungssequenzen enthaltender DNA im Zellkern leitet die Zusammensetzung der Core- und

Kapsidstrukturen ein (Hearing *et al.* 1987). Das Adenovirus Death Protein bewirkt eine Auflösung der Kernmembran und Zytolyse mit Freisetzung der verpackten Kapside. Es entstehen 10^4 - 10^5 Viren pro Zelle.

2.2.5. Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie

Adenoviren können ein großes Spektrum von Zelltypen infizieren. Dabei kommen sowohl sich teilende, als auch ruhende Gewebe in Betracht. Sie vermitteln eine hohe Genexpression. Außerdem zeichnen sich die Adenoviren für die Gentherapie dadurch aus, dass ihre Präparation und Aufreinigung technisch im Vergleich zu anderen möglichen Vektoren relativ einfach ist. Diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass Adenoviren als Vektoren für Gene häufig eingesetzt werden.

Das Fehlen eines schwerwiegenden Krankheitsverlaufs weist allerdings darauf hin, dass das humane Immunsystem sehr erfolgreich in der Kontrolle der adenoviralen Infektion arbeitet. Somit sind die gentherapeutischen Anwendungsmöglichkeiten durch eine starke wirtseigene Immunantwort begrenzt.

Das Wildtypvirus hat nur eine Kapazität von 2 kb für den Transfer fremdgenetischen Materials ohne signifikante Effekte auf Stabilität oder Infektiosität (Bett *et al.* 1993), die Einführung längerer Sequenzen setzt also die Entfernung einiger oder sämtlicher viraler Gene voraus. Die publizierten Manipulationen des adenoviralen Genoms sind sehr vielfältig. Tabelle 2 gibt nur einen kurzen Überblick.

Tabelle 2: Adenovirale Vektoren in der Gentherapie

Generation	Deletion	Kapazität in kb	Vorteile	Nachteile
I.	<ul style="list-style-type: none"> • E1 • E1/E3 	<ul style="list-style-type: none"> • 6,5 • 7,8 	<ul style="list-style-type: none"> • Herstellung in hohen Titern ist schnell und leicht 	<ul style="list-style-type: none"> • starke Immunantwort • Entstehung von Replikationskompetenten Adenoviren theoretisch möglich
II.	<ul style="list-style-type: none"> • E1/E2/E3 • E1/E2/E4 	<ul style="list-style-type: none"> • 8,5 • 9,5 	<ul style="list-style-type: none"> • stark reduzierte Expression von Strukturproteinen • keine Bildung von Replikationskompetenten Adenoviren möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlängerung der Genexpression <i>in vivo</i> fraglich • Thermolabil: Virus-synthese nur in sehr engen Temperaturbereich möglich

III. („gutless“)	• E1-E4/ L1-L5	• bis 36	• Hohe Kapazität • Verlängerte Genexpression <i>in vivo</i>	• Kontamination mit essentialem Helper-Adenovirus • Herstellung in hohen Titern aufwendig
Replikations- kompetente Adenoviren	• E1B	• bis 2	• Replikation und Ausbreitung <i>in vivo</i> kann ineffizienten Transfer nach iatrogenen Inokulation ausgleichen	• Restriktion einer ausschließlichen Permissivität malignen Zellen fraglich

Die Methode zur Generierung der in dieser Arbeit erzeugten Adenoviren der ersten Generation basierte auf der Arbeit von Bett *et al.* (1994). Das E1/E3-deletierte adenovirale Genom war auf zwei Plasmide aufgeteilt. Durch Entfernen der für die Replikation essentiellen Early-I-Gen-Region (E1-Region) aus dem Virusgenom wurde eine Vermehrung *in vivo* verhindert. Die zusätzliche Deletion der E3-Region senkte die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination mit einem Wildtypadenovirus, mit dem der Patient zufällig infiziert sein könnte (Block *et al.* 1997). Das Plasmid pBHG-10 enthielt dabei fast alle für die Herstellung infektiöser adenoviraler Partikel essentiellen Sequenzen und wurde über Calciumphosphatpräzipitation in die Verpackungszelllinie transfiziert. Es handelte sich dabei um eine menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293, die stabil mit den linken 11% des adenoviralen Genoms transfiziert war und u.a. die in den Vektoren deletierte E1-Region *in trans* zur Verfügung stellte (Graham *et al.* 1977). Dadurch war die Möglichkeit der Virusreplikation nur in der Verpackungszelllinie gegeben und nicht in anderen Zellen, die nicht über die E1-Region in ihrem Genom verfügten.

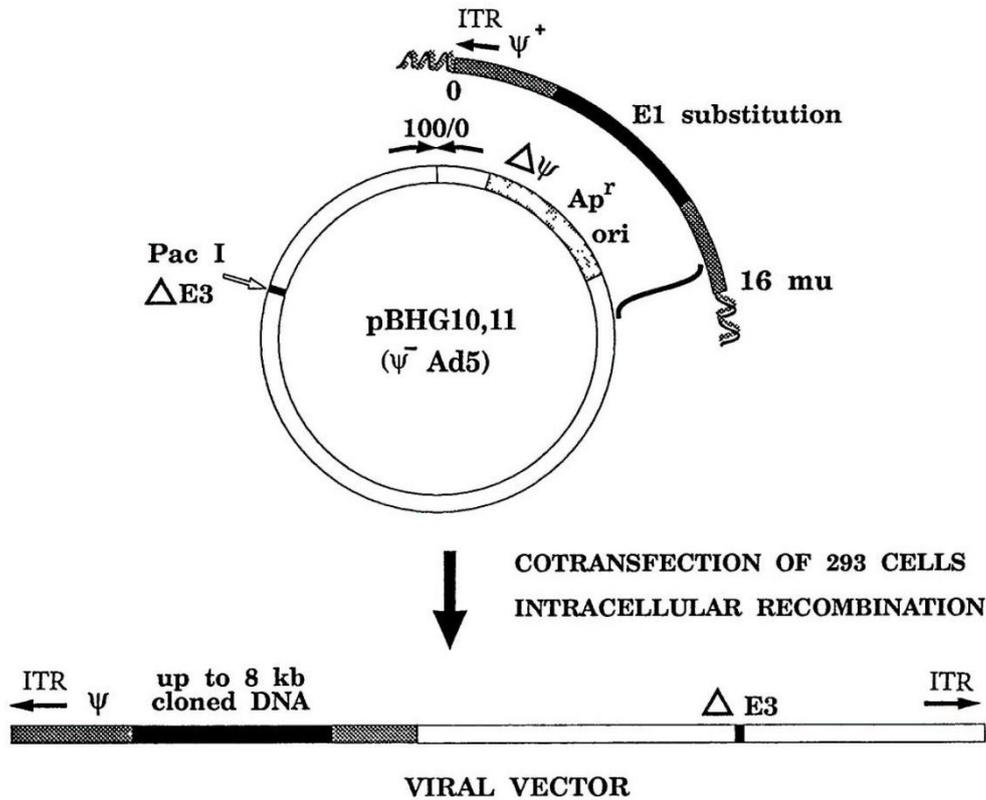


Abbildung 2: Generierung von adenoviralen Vektoren (Quelle: Bett *et al.* 1994)

Das Plasmid pBHG-10 enthielt allerdings nicht das zur Herstellung kompletter Viruskapside notwendige Verpackungssignal. Infektiöse Partikel konnten nur entstehen, wenn ein Shuttle-Plasmid co-präzipitiert wurde. Dieses Plasmid wies homologe adenovirale Bereiche mit pBHG-10 auf, die die deletierte E1-Region flankieren. Dort fand sich auch der Platz für die Expressionskassette des fremden genetischen Materials. Durch homologe Rekombination wurden die beiden Plasmide derart verknüpft, dass ein vollständiges Genom eines replikationsdefizienten, infektiösen adenoviralen Vektors entstand und die Fremd-DNA in seiner deletierten E1-Region trug.

2.3. Reaktionen des Immunsystems auf virale Infektionen

2.3.1. Allgemein

Im Laufe der Evolution haben mehrzellige Organismen vielfältige Strategien entwickelt, um das Eindringen und die Ausbreitung von einzelligen Lebensformen wie Bakterien, Viren oder Parasiten abzuwehren. Das Abwehrsystem

des Menschen wird dabei eingeteilt in die angeborene, unspezifische sowie die erworbene, spezifische Abwehr.

Zur angeborenen Abwehr gehören die physikalischen Barrieren wie die Haut und die Mukosa, welche den Körper strukturell gegen die Umwelt abschließen. Dazu kommen chemische Barrieren wie pH-Wert, Lipide, Enzyme, Komplementfaktoren, Interleukine und Akutphasenproteine, wodurch den eindringenden Organismen ein ungünstiges Milieu entgegengesetzt wird. Ein weiterer unspezifischer Abwehrbestandteil wird zellgetragen durch Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen vermittelt. Diese Zellen bekämpfen und neutralisieren als körperfremd erkannte Zellen und Substanzen unspezifisch durch Zelllyse oder Phagozytose.

Die erworbene Abwehr lässt sich weiter aufteilen in zelluläre und humorale Bestandteile. Die zelluläre spezifische Abwehr wird durch die Lymphozyten ausgeführt. Es werden T-Zell- und B-Zell-Lymphozyten unterschieden, in Abhängigkeit des Ortes ihrer immunologischen Prägung. T-Zellen werden im Thymus, B-Zellen im Knochenmark (Bone marrow) geprägt. Zytotoxische T-Zellen erkennen körperfremde Proteine an Zelloberflächen und leiten die Zelllyse der entsprechenden Zellen ein. T-Helfer-Zellen unterstützen B-Zellen in der Erkennung von löslichen körperfremden Proteinen und stimulieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern. Zusammen mit Lymphokinen und Interleukinen, mit denen die einzelnen Funktionen des Immunsystems koordiniert werden, bilden die hochspezifischen Antikörper den humoralen Zweig der Abwehr (Kayser *et al.* 1998, S. 43).

Im Zusammenhang mit der Frage nach der Persistenz der Genexpression von rekombinanten adenoviralen Vektoren sind zum einen die NK-Zellen, zum anderen die zytotoxischen T-Zellen und das immunologische Geschehen am MHC-I-Komplex von besonderem Interesse.

2.3.2. MHC-Komplexe

T-Zellen sind nicht in der Lage, frei gelöste Proteine zu binden. Dazu ist die Präsentation der Proteine durch ein Trägermolekül notwendig. Das geschieht durch die Bindung des Proteins an die Bindungsstelle des Major Histokompatibility Complex (MHC)-Moleküls und anschließende Präsentation an der Zelloberfläche. Durch Interaktion mit weiteren membrangebundenen

Proteinen auf der Körperzelle und der T-Zelle löst die T-Zelle weitere Reaktionen aus (Kayser *et al.* 1998, S. 60).

MHC-Komplexe werden in zwei Klassen eingeteilt. Klasse I tritt in Interaktion mit CD8-positiven T-Zellen und präsentiert Proteine, die endogen von der Körperzelle produziert werden. Dabei kann es sich um körpereigenes Protein handeln, aber auch im Falle einer viralen Infektion um körperfremdes virales Protein. Erkennt die T-Zelle das Protein als fremd, dann vermittelt sie durch Lymphokine die Lyse der infizierten Zelle, wodurch die Vermehrung der infizierenden Viren verhindert werden soll. Eine weitere Funktion des MHC-I-Komplexes ist die Interaktion mit NK-Zellen. NK-Zellen reagieren auf veränderte Expression von Molekülen an der Zelloberfläche, insbesondere MHC-I-Komplexe. Zellen, die eine geringe Anzahl von MHC-I-Komplexen exprimieren, werden von NK-Zellen erkannt und es wird die Zytokinvermittelte Lyse der Zelle eingeleitet (Farrell *et al.* 1999). Im Umkehrschluss lässt sich feststellen, dass der MHC-I-Komplex die Aktivität der NK-Zellen inhibiert.

MHC-Komplexe der Klasse II dienen der Präsentation von löslichen Antigenen an der Oberfläche von B-Zellen und interagieren mit CD4-positiven T-Zellen, den T-Helfer-Zellen. Wenn die T-Zelle das präsentierte Antigen als fremd erkennt, regt sie die B-Zelle zur Produktion von Antikörpern gegen das Fremdprotein an.

2.3.3. Resistenzmechanismen des Zytomegalievirus

Das Zytomegalievirus gehört zur Gruppe der Herpesviren, welche morphologisch praktisch identisch, biologisch sowie in Bezug auf die verursachten Krankheitsbilder jedoch recht unterschiedlich sind. Das CMV ist durch ein enges Wirtsspektrum und eine langsame Vermehrung gegenüber Wildtyp-Adenoviren, häufig unter Riesenzellbildung und langsam einsetzender, später Zytopathologie gekennzeichnet. Die Erstinfektion verläuft in den allermeisten Fällen inapparent, sogar wenn die Infektion früh, peri- oder postnatal erfolgt. Das Virus bleibt anschließend in mononukleären Zellen latent. Eine Reaktivierung kann asymptomatisch verlaufen, es können sich aber auch Symptome zeigen, die in der Regel harmlos sind, wie mononukleoseartige Krankheitsbilder oder leichte Hepatitiden sowie weitere, fieberhafte Erkran-

kungen. Das Virus ist sehr weit verbreitet, über 90% der erwachsenen Bevölkerung ist infiziert. Bei AIDS-, Transplantations- oder Malignompatienten kann eine CMV-Neuinfektion oder eine Reaktivierung zu schwersten, generalisierten Infektionen mit letalem Ausgang führen, dabei sind vor allem Hirn und insbesondere Retina befallen, hepatische und pulmonale Manifestationen sind seltener. Ebenfalls gefürchtet ist die intrauterine Infektion, die in 10% der Fälle zu zum Teil schwersten Missbildungen führt. (Kayser *et al.* 1998, S. 429ff).

Das murine CMV ist dem humanen CMV in seinen biologischen Eigenschaften sehr ähnlich, so dass ersteres als Modell für das humane Virus eingesetzt werden kann (Rawlinson *et al.* 1996). Beide Viren verursachen schwere Infektionen bei immunkompromittierten oder immunologisch unreifen Wirtsorganismen mit ähnlichen klinischen Syndromen (Craighead *et al.* 1992).

Die Primärinfektion mit CMV wird normalerweise effektiv durch das Immunsystem kontrolliert und verursacht deshalb keine ausgeprägten Krankheits-symptome. Allerdings ist die immunologische Kontrolle nicht in der Lage, das Virus komplett zu beseitigen. Das virale Genom persistiert in einer nichtproduktiven Form an spezifischen Stellen des infizierten Wirtes mit einer minimalen Genexpression (Hengel *et al.* 1998). Um diese permanente Koexistenz im Wirtsorganismus zu etablieren, nutzt das CMV verschiedene Strategien.

Sowohl die murine als auch die humane Form des CMV sind in der Lage, die Synthese und die Reifung der MHC-I-Komplexe der infizierten Zelle an diversen Ansatzstellen zu inhibieren. Das Spektrum der Mechanismen reicht von der Hemmung der Assoziation der MHC-I-Komplexe über die Degradation bis zur Hemmung des Transportes des Komplexes zur Zelloberfläche.

Des Weiteren wird vom CMV die Wirtsreaktion zur Steigerung der MHC-I-Komplexsynthese inhibiert. Durch Interferone und TNF- α wird vom Wirt eine Stimulation der der Synthese hervorgerufen, es wird angenommen, dass das CMV diese mediatorgesteuerte Immunantwort verhindern kann (Hengel *et al.* 1998).

Außerdem wird davon ausgegangen, dass das CMV durch Imitation von Mediatoren eine entzündungshemmende Signallage zu erreichen versucht, zum Beispiel durch Förderung der TGF- β -Sekretion (Hengel *et al.* 1998).

Ein weiterer Mechanismus der murinen Form des CMV ist die Expression eines MHC-1-Komplex-Homologes m144, von dem angenommen wird, dass es die Aktivität von NK-Zellen inhibieren kann (Rawlinson *et al.* 1996; Farrell *et al.* 1997; Chapman *et al.* 1998), sowie die reduzierte T-Zell-Aktivierung durch fehlende Antigenpräsentation.

Schließlich wird eine Modifikation von Oberflächenproteinen der infizierten Zelle angenommen, die eine Aktivierung des Komplementsystems zu verhindern, dass eine Lyse der Zelle verursachen würde (Hengel *et al.* 1998)

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galacto-Pyranosid	Merck: #1.24655
Agarose	Merck: #1.01236
Ampicillin	Böhringer: #835269
Borsäure	Merck: #1.12015
Bromphenolblau	Merck: #1.11746
Cell Culture Lysis Reagent 5x	Promega: #E153A
Cäsiumchlorid	Fisher Biotec: #BP1595/1
Calciumchlorid-dihydrat	Merck: #1.02083
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck: #1.02950
Ethanol absolut	Merck: #1.00983
Ethidiumbromid	Merck: #80220704
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck: #1.12029
Ficoll 400	Merck: #1.00498
Glucose	Merck: #1.08337
Glutaraldehyd 25%	Merck: #8.20603
Glycerin, wasserfrei	Merck: #1.04093
Hefeextrakt	Merck: #1.03753
Isopropanol	Merck: #1.09634
Kaliumacetat	Merck: #1048301000
Kaliumchlorid	Merck: #1.05001
Kaliumferricyanid ($K_3Fe[CN]_6$)	Merck: #1.04984
Kaliumferrocyanid ($K_4Fe[CN]_6$)	Merck: #1.04973
LB-Agar	Gibco: #22700-025
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Merck: #1.05835
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Merck: #1.05886
MOPS	Fluka: #69947
N,N-Dimethylformamid	Merck: #1.03053
Natriumchlorid	Baker: #2781000
Di-Natrimhydrogenphosphat-dihydrat	Merck: #1.06580

Natriumdodecylsulfat, (SDS)	Merck: #1137600100
RNAse A	Roche: #109 169
Sea Plaque Agarose	Biozym: #840101
Tris (Hydroxymethylaminomethan)	Gibco: #15504-020
Triton-X 100	Fluka: #28468
Trypton	Merck: #1.10859
Tween 20	Fluka: #93773
Xylenecyanol	Merck: #1.10590

3.1.2. Molekularbiologische Enzyme, Standards und Proteine

BamH I	Boehringer-Roche: #567604
Bgl II	Boehringer-Roche: #567639
Hind III	Boehringer-Roche: #656321
Kpn I	Boehringer-Roche: #899186
Not I	Boehringer-Roche: #1014714
Sac I	Boehringer-Roche: # 669792
Sal I	Boehringer-Roche: #567663
Xba I	Boehringer-Roche: #674257
Xho I	Boehringer-Roche: #899194
Ligase (T4)	Boehringer: #799009
Ligase-Puffer (10x)	Boehringer: #1243292
Molecular Weight marker II	Böhringer: #236250
Molecular Weight marker VII	Böhringer: #1209264
Rekombinante Luciferase	Promega: #E1701
T4 DNA-Ligase	Boehringer: #799009

3.1.3. Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Aqua ad iniectabilia	Braun: #25/12211273/1100
Dulbecco´s Phosphate-buffered saline	Gibco: #14040-174
Dulbecco´s Phosphate-buffered saline w/o Ca Mg, (PBS)	Gibco: #14190-169
Dulbecco´s Modified Eagle Medium with high Glucose (HGDMEM)	Gibco: #41965-039
Einfriermedium für 293-Zellen	Gibco: #11101-011

Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco: #10084-168
HEPES Pufferlösung	Gibco: #15630-056
Horse Serum	Gibco: #26050-047
L_Glutamin 200 mM (100x)	Gibco: #25030-024
Modified Eagle Medium (MEM), 2x	Gibco: #21935-028
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco: #15140-114
Trypsin-EDTA	Gibco: #25300-096

3.1.4. Wasser

Wasser wurde mit einem Destillator Bi-Dest 2304 der Firma GFL (Burgwedel) doppelt destilliert und autoklaviert oder steril filtriert verwendet.

3.1.5. Reagenzienkits

DC Protein-Assay	Biorad: # 500-0112
Luciferase Assay System	Promega: #E1501
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN: #12163
QIAGEN Gelextraction Kit	QIAGEN: #28704

3.1.6. Verbrauchsmaterialien

Gewebekulturschalen 144mm	Nunc
Gewebekulturschalen 94mm	Greiner
Gewebekulturschalen 60mm	Nunc
Kryotubes	Nunc
Falkontube 50 ml	Falkon
Polystyrene-tubes 100*14mm	Nunc
Zellkultur-6-well-Plate	Greiner
Zellkultur-24-well-Plate	Greiner
Zentrifugenröhrchen ultra clear 14 x 95mm	Beckman
Dialysemembran Slide-A-Lyzer	Pierce
Zellschaber	Greiner
96-well-Plate	Nunc
Luminometer-Tubes 5 ml	Sarstedt
Reagenzröhrchen PP	Nerbe plus
Einwegspritzen 1 ml, 10 ml, 50 ml	Braun, Melsungen

Sterilfilter, Porenweite 0,22 µm	Schleicher & Schuell
Reajtinsgefäß 0,5ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Pipetten (2 µl, 20 µl, 100µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson
Pipetten, 8fach und 12fach Multichannel	Eppendorf

3.1.7. Geräte

Auflichtmikroskop	Hund
Autoklav Sanoclaf	Wolf
Brutschränke Zellkultur HeraCell	Heraeus
Brutschränke Bakterienkulturen	Köttermann
Elektrophoresegelkammer und Powersupply	BioRad
Feinwaage HR-120	AND
Luminometer Lumat LB 9507	EG&G Berthold
Magnetrührer	Cenco
pH-Meter pH 358	WTW
Schüttler 3005	GFL
Spektralphotometer	BioRad
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Ultrazentrifuge Typ L7-35	Beckman-Coulter
UV-Kammer zur Genanalyse und Software Geldoc 2000	Biorad
Vortexer	Braun
Wasserbad	Braun
Zentrifuge Type 5804R	Eppendorf

3.1.8. Plasmidvektoren

pGL3 basic	Promega, Heidelberg
pBS	Promega, Heidelberg
pcDNA3m144	H. Farrell, Animal Health Trust, Suffolk, UK
pIRES	Clontech, Palo Alto, USA
pAd.CMVpA	S.C.L. Woo, Mt. Sinai School of Med., NY, USA
pBHG-10	F. Graham, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

3.1.9. Bakterien

Kompetente Bakterien DH5 α Gibco: #18258-012

3.1.10. Zelllinien

293 HEK ATCC, Manasas, USA

HepG2 ATCC, Manasas, USA

Komplettmedium für 293/HepG2

HGDMEM 500 ml

FCS 50 ml (hitze-inaktiviert)

L-Glutamin 200mM (100x) 5,5 ml

Penicillin/Streptomycin (100x) 5,5 ml

3.2. Klonierung der Plasmide

3.2.1. Kultur von Bakterien

Die für diese Arbeit benötigten Plasmide wurden in *Escherichia coli* des Stammes DH5 α vermehrt. Da alle verwendeten Plasmide Resistenzgene gegen Ampicillin enthielten, konnte durch Zugabe von Ampicillin zu Wachstumsmedien oder Nährböden eine Selektion der gewünschten Plasmid-tragenden Bakterien erfolgen. Die Bakterien wurden in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten vermehrt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in einem Brutschrank, flüssige Kulturen wurden mit 100-200 rpm durch einen Schüttler bewegt.

Zur Kryokonservierung Plasmid-tragender Bakterien wurden 930 μ l der Bakteriensuspension 60 min auf Eis inkubiert, mit 70 μ l DMSO versetzt und bei -80°C gelagert.

Ampicillin (1000x)	5g Ampicillin 50 ml 10 mM Tris (pH 8,0) steril filtriert
LB-Medium	10 g Trypton-Wasser 10 g NaCl 5 g Hefe-Extrakt auf 1l A. dest. autoklaviert nach Abkühlen mit 1 ml Ampicillin (1000x) versetzt
LB-Agar-platten	32 g LB-Agar in 1l A.dest. autoklaviert bei 50 °C mit 1 ml Ampicillin (1000x) versetzt auf 96 mm Petrischalen gegossen (Schichtdicke etwa 3 mm)

3.2.2. Transformation kompetenter Bakterien

Um Plasmid-DNA in kompetente Bakterien einzuschleusen, wurde zu 30 μ l Bakteriensuspension 1 μ l aufgereinigte Plasmid-DNA gegeben, durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C erfolgte die Zugabe von 1 ml SOC-Medium (siehe unten). Es folgte 1 h Inkubation bei 37°C unter Schütteln im Brutschrank. Die transformierten Klone wurden für 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert, der Überstand bis auf 100 μ l verworfen und auf Ampicillin-haltigem LB-Agar-Platten zur Selektion ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten selektionierte Klone vom Agar gepickt und nach Inokulation in 8-10 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium über Nacht im Schüttler (200-300rpm) bei 37°C inkubiert werden. Aus diesen Kulturen wurde Minipräparation zur Kontrolle der transformierten Plasmide durchgeführt.

SOC-Medium	20 g Trypton-Wasser
	5 g Hefe-Extrakt
	0,5 g NaCl
	in 950 ml A. dest.
	versetzt mit 250 ml 250 mM KCl
	pH-Wert auf 7,0 eingestellt
	autoklaviert
	Zugabe von 20 ml steriler 1M Glucoselösung

3.2.3. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer alkalischen Lyse unterzogen und die Proteine durch Ansäuerung ausgefällt. Die DNA wurde über eine Säule isoliert und durch Alkohol präzipitiert und ausgefällt.

A) Minipräparation

Zur Gewinnung kleiner Mengen DNA zur Analyse wurden 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Bakteriensuspension in einem Eppendorf-cap 1 min bei 13k rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in 100 μ l Puffer 1 (siehe unten) durch Whirlen resuspendiert und die Zellen mit 200 μ l Puffer 2 (siehe unten) auf Eis lysiert.

Durch Zugabe von 150 µl Puffer 3 (siehe unten) wurden die Proteine aus dem Lysat gefällt. Anschließend wurde 10 min bei 4°C und 13k rpm zentrifugiert, der Überstand zur Präzipitation der DNA mit dem zweifachen Volumen Ethanol versetzt und 2-3 min bei RT inkubiert. Durch weitere 10 min Zentrifugation bei 4°C und 13k rpm wurde die DNA ausgefällt. Das Pellet wurde mit 1 ml eisgekühltem 70% Ethanol gewaschen und 3 min bei 13k rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet 10 min luftgetrocknet und in 50 µl A. dest gelöst. Die Lösung konnte für Analysen mittels Restriktionsverdau und gel-elektrophoretischer Trennung verwendet oder bei –20°C aufbewahrt werden.

Puffer 1	50 mM Glucose 25 mM Tris-Cl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) 100 µg RNase
Puffer 2	0,2 N NaOH 1% SDS in A. dest.
Puffer 3	60 ml 5 M Kaliumacetat 11,5 ml Eisessig 28,5 ml A. dest.

B) Maxipräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen DNA für weitere Klonierungen oder zur Generierung adenoviraler Vektoren wurden die Säulen und Puffer des QIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. 1l oder 2l ampicillin-haltiges LB-Medium wurde mit Plasmid-tragenden Bakterien beimpft und über Nacht inkubiert. Die Suspension wurde nach Bestimmung der optischen Dichte 5 min bei 4°C und 8000 rpm abzentrifugiert. Zur Lyse und Fällung der Proteine wurde das Pellet in 15 ml 4°C kaltem Puffer 1 resuspendiert, nach Zugabe von 15 ml Puffer 2 geschwenkt, für 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit 15 ml 4°C kaltem Puffer 3 vermischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde das Gemisch 15 min bei 8000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Lysat

wurde auf eine zuvor mit QBT-Puffer (siehe unten) äquilibrierte Säule gegeben, zweimal mit 30 ml QC-Puffer (siehe unten) gewaschen, danach mit 15 ml auf 50°C erwärmten QF-Puffer (siehe unten) aus der Säule eluiert und in einem Corex-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Nach Fällung der DNA mit 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation für 45 min bei 10k rpm und 4°C mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Es wurde bei 10k rpm und 4°C für 15 min abzentrifugiert, nach Abgießen des Überstandes das Pellet in steriler Umgebung luftgetrocknet und steril in 500 µl A. dest. aufgenommen. Es folgten Bestimmung der optischen Dichte, Analytik durch Restriktionsverdau und elektrophoretische Trennung. DNA-Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

QBT-Puffer	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol 0,15% Triton X-100
QC-Puffer	1,0 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol
QF-Puffer	1,25 M NaCl 50 mM Tris-CL, pH 8,5 15% Isopropanol

3.2.4. Analyse von Plasmid-DNA

3.2.5. Quantifizierung von DNA durch Bestimmung der optischen Dichte (OD)

Die OD der präparierten DNA- Lösungen wurden mit einem Photometer bei drei Wellenlängen gemessen (260 nm, 280 nm, 320 nm). Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm Hierzu wurde eine Probe von 5 µl der zu messenden DNA-Lösung mit 95 µl A. dest. (1:20) verdünnt. Die optischen Dichten der Proben wurden in einer Quarzküvette gegen 0,1x TE-Puffer (pH 7,6) (siehe unten) gemessen. Eine

doppelsträngige DNA-Lösung mit einer Konzentration von 50 ng/μl weist bei 260 nm eine Absorption von 1 auf, so dass eine Konzentrationsbestimmung möglich ist. Eine hohe Absorption bei 280 nm ist ein Hinweis auf eine Proteinverunreinigung, da aromatische Aminosäuren bei 280 nm absorbieren (Glaser *et al.*, 1995). Der 260 nm/280 nm Quotient sollte deshalb über 1,8 betragen. Eine hohe Absorption im Bereich um 320 nm wird meist durch eine Lichtstreuung von Partikeln hervorgerufen.

$$K = \frac{50 * R * Vf}{1000}$$

K: Konzentration (μg/μl)

R: OD

Vf: Verdünnungsfaktor

10x TE-Puffer, pH 7,6

100 mM Tris-CL, pH 7,6

10 mM EDTA, pH 8,0

3.2.6. Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Zur Kontrolle von präparierter DNA wurden die Plasmide mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Durch anschließende elektrophoretische Auftrennung konnte eine Analyse der Fragmentlängen erfolgen.

Zum Restriktionsverdau wurden etwa 1-2 μg DNA mit 10 U Endonuklease, 2 μl 10x Puffer und einem Restvolumen A.dest. in einem Gesamtansatz von 20 μl für 2 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Zur Trennung der DNA-Fragmente wurde ein Gel aus 1% (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer (siehe unten) hergestellt. In einem Gießstand wurde die in TBE-Puffer durch Erhitzen gelöste Agarose gegossen, wobei mit Kämmen Taschen im Gel zur Aufnahme der Proben erzeugt wurden. Für den optischen Nachweis der Nukleinsäuren enthielt das Gel 500 ng/ml Ethidiumbromid. Die Proben wurden mit etwa 20% Ladungspuffer (siehe unten) versetzt und in die Taschen pipettiert. Eine Bestimmung der Fragmentlängen erfolgte durch paralleles Auftragen von Standards (Boehringer: molecular weight marker II, VII). In einer mit 1x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer wurde an

das beladene Gel eine Spannung von etwa 80 V angelegt, bis die Proben aus den Taschen gelaufen waren. Anschließend wurde die Spannung auf 100 bis 110 V erhöht und die Proben innerhalb von 1-4 h in ihre Fragmente aufgetrennt. Abschließend erfolgte eine photographische Aufnahme bei einer ultravioletten Durchleuchtung mit einer Digitalkamera bei 302 nm Wellenlänge und die elektronische Speicherung und Weiterverarbeitung.

TBE-Puffer (10x)	108 g Tris 55 g Borsäure 2mM EDTA (pH 8,0) auf 1l A. dest. autoklaviert
Ladungspuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% Xylenecyanol 15% Ficoll 400 in A. dest.

3.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden

Um definierte Fragmente von Plasmiden zu gewinnen und in andere Plasmide einzufügen, wurden die Plasmide mit geeigneten Restriktions-Endonukleasen verdaut und die benötigten Fragmente über präparative elektrophoretische Trennung gewonnen. Diese Fragmente konnten mit Ligasen in andere Plasmide eingefügt werden (siehe unten).

A) Restriktionsverdau zur Gewinnung definierter Plasmidabschnitte

Zur Fragmentisolierung wurde etwa 10 µg DNA mit etwa 50 U der entsprechenden Restriktions-Endonukleasen verdaut. Zu dem entsprechenden Volumen der DNA wurden das Volumen der Nuklease, sowie 10 µl des zur Nuklease gehörenden 10x Puffers gegeben und mit A. dest. auf ein Gesamtvolumen von 100 µl ergänzt. Der Ansatz wurde über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

B) Präparative Gelelektrophoretische Trennung von Plasmidfragmenten

Die Trennung zur Gewinnung der DNA-Fragmente erfolgte in derselben Weise wie die Trennung zur Analyse der Plasmid-DNA (siehe oben). Die zu iso-

lierenden Banden wurden bei Durchleuchtung mit ultraviolettem Licht durch Vergleich mit ebenfalls aufgetragenem Standard (siehe oben) identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Dabei wurde auf eine möglichst kurze und niederintensive Bestrahlung der DNA mit UV-Licht geachtet, um eine Schädigung der DNA und eine mögliche Verminderung der Ausbeute zu vermeiden.

C) Isolierung einzelner DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde das QIAGEN Gelextraction Kit verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die dadurch gewonnene DNA-Lösung konnte nach Bestimmung der optischen Dichte direkt zur Ligation verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.2.8. Ligation

Die Verbindung zweier DNA-Fragmente über eine Ligase setzte kompatible Enden der Fragmente voraus. Durch entsprechende Auswahl der restriktiven Fermente konnte die Generierung solcher kohäsiver Enden für eine „sticky-end“-Ligation gewährleistet werden. Ein Ligationsansatz bestand aus den zu verknüpfenden DNA-Fragmenten in Mengen, die dem molekularen Verhältnis von 1:3 oder 1:5 entsprachen. Zugegeben wurde 1 U der T4-Ligase sowie 2 µl des 10x Ligase-Puffers. Ergänzt durch ein Restvolumen A.dest ergab sich ein Gesamtansatz von 20 µl. Dieser Ansatz wurde für 2 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Transformation des bei der Ligation entstanden Plasmids in *E. coli* (siehe oben) zur Vermehrung und Analyse durchgeführt.

3.3. Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit eukaryonten Zellen wurden in einer sterilen Arbeitsumgebung durchgeführt. Zur Verwendung kamen Zellen der Linie 293 und HepG2. Die Zellen wurden zur Vermehrung auf 144mm Petrischalen kultiviert und in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 96% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Zelllinie 293 leitet sich von einem embryonalen Nierenzelltumor des Menschen ab. Sie ist stabil transfiziert mit 11 % des Genoms vom

Adenovirus Typ5 und enthält die E1a Region. Dadurch stellt sie die Umgebung für die Generierung und Vermehrung von E1-defizienten Adenoviren dar.

Die Zelllinie HepG2 ist eine hepatozelluläre Karzinomzelllinie des Menschen.

3.3.1. Splitten von Zellen

Um adhärent wachsende Zellen wie 293- oder HepG2-Zellen vermehren zu können, müssen sie mit Trypsin-EDTA von ihrem Wachstumsuntergrund gelöst werden.

Bei einer Konfluenz der Zellen von 90-95% auf der Petrischale wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde 4ml Trypsin-EDTA vorsichtig auf die Zellen gegeben und 2-3 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden vorsichtig von der Platte gespült und in einem 50ml Falcontube mit FBS-haltigem Medium gesammelt (FBS = fetales Rinderserum). Durch das FCS wurde das Trypsin bereits neutralisiert. Anschließend wurden sie für 10 min bei 2500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nun konnte der Trypsin-EDTA-haltige Überstand abgesaugt werden ohne das Zellpellet zu zerstören. Das Pellet wurde in 5 ml Komplettmedium resuspendiert bis eine Einzelzellsuspension vorlag. Die Suspension wurde auf mehrere Kulturschalen verteilt, die zuvor mit jeweils 20ml Komplettmedium bestückt wurden. Meist wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet.

3.3.2. Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen dauerhaft lagern zu können wurden sie kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen einer 144mm-Zellkulturschale nach dem Trypsinieren in 4ml Einfriermedium resuspendiert und in 1ml Aliquots in Kryotubes verbracht. In einem Isopropanolbad wurden sie langsam (1°C/min) von -20°C auf -80°C heruntergekühlt. Für eine dauerhafte Konservierung wurden sie anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum erneuten Kultivieren wurden die Zellen nach schnellem Auftauen samt Einfriermedium auf Zellkulturschalen mit Komplettmedium verbracht. Über Nacht adhärten die Zellen im Inkubator auf der Schale und es konnte am Folgetag das Medium ausgewechselt werden, um Zell-toxische Komponenten wie DMSO zu eliminieren.

3.3.3. Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Um definierte Zellzahlen aussäen und die Vitalität der Zellen beurteilen zu können, wurden sie mit Trypan-Blau gefärbt. Dazu wurden 90 µl einer Zellsuspension mit 10 µl einer wässrigen Trypan-Blau-Lösung (0,4%) versetzt, durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Der Farbstoff penetriert nur avitale Zellen mit geschädigter Zellmembran, vitale Zellen färben sich dadurch nicht an. Mit Hilfe einer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden in den 4 in 16 Kleinquadrate unterteilten Großquadranten die nicht gefärbten Zellen gezählt. Um die Konzentration eines ml der Suspension zu erhalten wurde das Ergebnis mit 10^4 multipliziert.

$$c = n * 10^4 * v$$

c: Anzahl der Zellen im Gesamtvolumen

n: Ausgezählte Zellzahl in der Zählkammer

v: Gesamtvolumen der Zellsuspension

3.4. Generierung von Adenoviren in 293-Zellen

Die Methode zur Erzeugung E1 und E3 defizienter Adenoviren basierte auf den Arbeiten von Graham und Prevec (1995) und Bett *et al.* (1994). Die nachfolgenden Schritte wurden in einer S2-Sicherheitsumgebung ausgeführt, da Adenoviren humanpathogen sind und die Möglichkeit bestand, dass sich durch Rekombination mit wildtyp-Adenoviren Typ 5 replikationsfähige rekombinante Adenoviren bilden konnten. Des Weiteren war darauf zu achten, dass alle Arbeiten mit den Adenoviren unter möglichst geringer UV-Licht-Belastung durchgeführt wurden, da Adenoviren unter dem Einfluss von ultraviolettem Licht ihre Infektiosität verlieren können. Es wurden Zellen der Linie 293 so vorbereitet, dass sie am Tage des Versuchs auf 20 94mm-Zellkulturschalen eine Konfluenz von 90-95% erreichten.

3.4.1. Calcium-Präzipitation der Plasmide

Es wurden 20 Polystyrene-tubes mit je 1,5 ml HeBS (siehe unten) beschickt. Die Plasmide wurden in äquimolarem Verhältnis in die Tubes hinzu gegeben, wobei ein Tube als Positivkontrolle pRC.CMV.β-Gal und ein weiteres als Negativkontrolle kein Plasmid enthielt. Unter Whirlen erfolgte die tropfenweise Zugabe von je 75µl 2,5 M CaCl₂ (siehe unten) und nach 30 min Inkubation

bei RT wurde ein feines Präzipitat sichtbar. Die Lösungen wurden nun auf die zuvor mit FCS-freiem Medium gespülten 293-Zellen gegeben und für 4,5 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit fand eine Endozytose der Präzipitate durch die Zellen statt.

HeBS	HEPES 5g NaCl 8g KCl 0,37g Na ₂ HPO ₄ dihydrat 0,125g Glucose 1g auf 1l A.dest. einstellen des pH-Werts auf 7,1 autoklaviert und gelagert bei 4°C
CaCl ₂ 2,5 M	36,75g in 100ml autoklaviertes A.dest. steril filtriert und gelagert bei 4°C

3.4.2. β -Gal-Kontrolle zur Einschätzung der Transfektionseffizienz

Nach der Inkubationszeit wurde das Medium der Positivkontrolle gewechselt und die Schale zur weiteren Inkubation in den Brutschrank verbracht. Am Folgetag wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in eiskaltem Glutaraldehyd (0,5% in PBS) fixiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen mit 4 ml X-Gal-Färbelösung (siehe unten) überschichtet und für 1-24 h bei 37°C inkubiert. Der Anteil angefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl ist ein Maß für die Effektivität der Transfektion.

X-Gal-Färbelösung	MgCl ₂ 1,3 mM NaCl 15 mM HEPES 44 mM (pH 7,4) Kaliumferricyanid (K ₃ Fe[CN] ₆) 3,0 mMol Kaliumferrocyanid (K ₄ Fe[CN] ₆) 3,0 mMol
-------------------	--

0,5 mg/ml X-Gal
auf 40 ml A. dest.

3.4.3. Agarose-Overlay der transfizierten Zellen

Die restlichen Schalen wurden nach 4,5 h Inkubation im Brutschrank nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen. Um entstehende Adenoviren eindeutig identifizieren zu können und zur Ernährung der Zellen wurde der Zellrasen mit 20ml Agarose-Overlay je Schale überschichtet. Der Overlay bestand zu gleichen Teilen aus Lösung 1 und 2 (siehe unten). Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Schalen weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle 5 Tage erfolgte eine weitere Überschichtung der Zellen mit 8 ml Overlay-Lösung je Schale. Nach 10 Tagen wurden die Schalen regelmäßig nach Anzeichen für eine Virusentstehung untersucht. Durch die Virusentstehung und Vermehrung kam es zum Untergang der betroffenen Zelle. Durch die Zelllyse wurden die viralen Partikel freigesetzt und konnten die benachbarten Zellen infizieren. Durch die Agarose-Beschichtung breitete sich das Virus nur auf die benachbarten Zellen aus. Diese Areale waren als aufgehellte Stellen im sonst leicht trüben Zellrasen mit dem Auge auszumachen. Solche Plaques wurden mit dem Lichtmikroskop untersucht auf cytopathische Zellen.

Nach etwa 20 Tage konnte das Experiment beendet werden, da ab dem Zeitpunkt keine weiteren Plaque-Bildungen mehr zu erwarten waren.

Agarose-Overlay	Lösung 1	Sea Plaque Agarose 1g in 100ml A. dest. autoklaviert ins Wasserbad bei 44°C
	Lösung 2	MEM (2x) 100 ml Penicillin/Streptomycin (100x) 2ml L-Glutamin 200 mM (100x) 2 ml Hefe-Extrakt (5%) 2 ml HEPES-Puffer 1 ml

unmittelbar vor Gebrauch: 10% Horse Serum (hitze-inaktiviert)

3.4.4. CPE-Assay

Um zu validieren, ob ein Virus die Plaques hervorgerufen hatte, wurde ein Test auf den cytopathischen Effekt (CPE) des Virus durchgeführt. Dabei sollte sich zeigen, ob der Überstand des Plaques infektiöse Partikel enthielt, die in der Lage waren, weitere Zellen zu lysieren.

Dazu wurden in eine 24-well-Plate einen Tag vor Beginn des Experimentes $2 \cdot 10^5$ Zellen der Linie 293 pro well ausgesät. Der Plaque-verdächtige Bereich einer 94mm-Zellkulturschale wurde samt Agarose mit Hilfe einer sterilen 1ml Filtertips ohne Spitze in ein Eppendorf-Tube überführt und mit 1ml HGDMEM bei -80°C eingefroren. Das Tube wurde anschließend im Wasserbad bei 37°C möglichst schnell aufgetaut, noch zweimal im Trockeneis/Ethanol-Bad schockgefroren und im Wasserbad wieder aufgetaut. Dadurch sollten die infizierten lytischen Zellen aufgebrochen und die enthaltenen Viren freigesetzt werden. Die Agarose und der Zellrest wurden durch Zentrifugation über 2 min bei 500 rpm entfernt. Nachdem das Medium von den Zellen der 24-well-Plates abgesaugt war, wurde 400 μl des virenhaltigen Überstandes eines Plaques in ein Well der Plate gegeben und für 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 600 μl Komplettmedium erfolgte weitere Inkubation. Nach 1-5 Tagen war bei Anwesenheit eines Virus die vollständige Lyse des Zellrasens zu erwarten. Bei positivem Ergebnis wurde der Inhalt der Wells in Eppendorf-Tubes überführt und das Zellpellet nach Zentrifugation über 5min bei 2500 rpm für die Infektion größerer Zellmengen weggefroren. Der Überstand wurde zum Test auf die Genexpression der entstandenen Viren separat eingefroren.

3.4.5. Amplifikation und Aufreinigung von Adenoviren

A) Amplifikation

Das Zellpellet des CPE-Assay wurde in 2 ml HGDMEM aufgenommen und zum Aufschließen der Zellen einem dreimaligen Zyklus von Schockfrieren in Trockeneis/Ethanol-Bad und Auftauen im Wasserbad bei 37°C ausgesetzt. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (2500rpm für 5min) konnte mit dem

Überstand eine 94mm Zellkulturschale infiziert werden, die vorher bis zu einer Konfluenz von 90-95% mit 293-Zellen kultiviert wurde. Dazu wurde das Medium der Zellen abgesaugt und mit den 2ml virushaltigem Überstand des CPE-Assays für 1h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand wieder abgesaugt und durch 10ml Kompletmedium ersetzt. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurde der Zellrasen der Schale vollständig lytisch, von der Schale abgespült und in einem 50ml Falcontube gesammelt.

Die Zellen wurden analog zum Zellpellet des CPE-Assays aufgeschlossen und mit dem Überstand zwei 144mm Kulturschalen 293-Zellen infiziert. Mit dem Überstand der beiden Schalen wurden nun ihrerseits 16 144mm Schalen infiziert und schließlich mit deren Überstand zweimal 50 144mm Schalen infiziert. Nach kompletter Lyse der Zellen auf den Schalen wurde das Zellpellet aller 2*50 Schalen in 4 50ml Falcontubes mit je 1ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gesammelt und bei -80°C eingefroren.

B) Aufreinigung

Die Zellpellets von 50 Schalen wurden einem dreimaligen Zyklus von Einfrieren im Trockeneis/Ethanol-Bad und Auftauen im 37°C warmen Wasserbad zugeführt. Anschließend wurden die Pellets in einem 50ml Falcontube gesammelt und das Volumen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) auf 36ml Volumen ergänzt. Um den Überstand vom Detritus der Zellen zu befreien wurden zwei Zentrifugationen für jeweils 5 min bei 2500 rpm durchgeführt, wobei jeweils der Überstand in ein neues Tube überführt wurde.

Es wurden drei CsCl-Lösungen unterschiedlicher Dichte hergestellt:

- a) 25,3 g CsCl in einem Volumen von 50 ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) ergab eine Dichte von 1,5 g/ml,
- b) 30 ml von a) auf ein Endvolumen von 42 ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) aufgefüllt ergab eine Dichte von 1,35 g/ml,
- c) 11 ml von b) auf ein Endvolumen von 11 ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) aufgefüllt ergab eine Dichte von 1,25 g/ml.

Die Dichten wurden mittels Wiegen und gegebenenfalls Auffüllen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) mit einer Toleranz von 0,005 g/ml auf die Vorgaben eingestellt. Aus den Lösungen wurde ein Stufengradient hergestellt, indem 0,5 ml der Lösung mit der Dichte 1,5 g/ml zuerst mit 3,0 ml der Lösung b) und anschließend mit 3,0 ml der Lösung c) in 6 14 x 95mm

Zentrifugenröhrchen überschichtet wurde. Auf den Stufengradienten wurden je Röhrchen 6 ml des zwischenzeitlich auf Eis gelagerten Überstandes des virenhaltigen Zelllysates vorsichtig pipettiert. Die Röhrchen wurden mit PBS austariert, in den Rotor SW 40Ti gehängt und in die Ultrazentrifuge verbracht. Dort wurden die viralen Partikel in einer ersten Zentrifugation über 1 h im Vakuum bei 34.000 rpm und 10°C von Zellresten und leeren viralen Kapsiden getrennt. Nach der Zentrifugation war das Virus in einer blauweißlich schimmernden Bande an der Grenzschicht zwischen der 1,25- und der 1,35-dichten Lösung sichtbar. Mit Hilfe einer sterilen Kanüle und einer 5ml Spritze wurde das Zentrifugenröhrchen punktiert und die Bande in etwa 0,5ml Volumen abgenommen. Die gesammelten Banden der 6 Röhrchen wurden in einem Falcontube gepoolt, mit CsCl-Lösung der Dichte 1,35 g/ml auf 24 ml Volumen aufgefüllt und auf zwei weitere Zentrifugenröhrchen verteilt. Nach Austarieren wurden die Röhrchen wieder in die Ultrazentrifuge verbracht und für 20-24 h im Vakuum bei 35.000 rpm und 10°C ein zweites Mal zentrifugiert. Dabei bildete sich in den Röhrchen ein kontinuierlicher Dichte-Gradient in der CsCl-Lösung aus, welcher eine feinere Reinigung der Viren ermöglichte. Anschließend konnte die Virusbande wieder durch Punktion aus den Röhrchen gewonnen werden (siehe Abb. 12).

Um die CsCl-Lösung vollständig aus der Virenlösung zu entfernen, wurde eine Dialyse der Lösung durchgeführt. Dazu wurde die Viruslösung zwischen die Membranen eines Slide-A-Lyzers gespritzt und für 24h gegen Dialyse-Puffer (siehe unten) lichtgeschützt bei 4°C dialysiert. Der Dialyse-Puffer wurde ständig mit einem Magnetrührer durchmischt und alle 8 Stunden gewechselt.

Im Anschluß an die Dialyse wurden die Viren mit einer Kanüle aus dem Slide-A-Lyzer geborgen und in 200µl-Portionen in Eppendorf-Tubes erst im Trockeneis/Ethanolbad schockgefroren und schließlich bei -80°C lichtgeschützt gelagert.

Dialyse-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM MgCl ₂
	10% Glycerin
	autoklaviert

gekühlt auf 4°C

3.4.6. Plaque-Assay zur Titration der Viren

Zur Ermittlung der Menge an infektiösen Partikeln einer Virusaufreinigung wurde ein Plaque-Assay durchgeführt. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde der Titer ermittelt, angegeben in der Einheit pfu/ml.

Dazu wurden 293-Zellen auf 20 60mm Gewebekulturschalen ausgesät, so dass die Zellen zu Beginn des Versuchs eine Konfluenz von 90-95% aufwiesen. Es wurden 200µl der Viruslösung in 1,8ml Komplettmedium (ohne FCS) verdünnt (1:10). Davon wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, in dem immer 200µl der vorhergehenden Verdünnung mit 1,8ml FCS-freiem Medium vermischt wurden bis zu einer Verdünnung der Stammlösung von 1:10¹². Die vorbereiteten 60mm Schalen mit 293-Zellen wurden mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und nach Absaugen des PBS mit 0,5 ml Virusverdünnung überschichtet. Die Verdünnungen 10⁶ bis 10¹² wurden auf je zwei Schalen, im Bereich von 10⁸ bis 10¹¹ auf je drei Schalen gegeben. Zwei Schalen wurden als Negativkontrolle nur mit je 2ml FCS-freiem Medium versehen. Alle Schalen wurden nach vorsichtigem Schwenken in den Brutschrank verbracht und bei 37°C und 5% CO₂ für eine Stunde inkubiert. Dabei wurde alle 10-15 min. die Viruslösung durch vorsichtiges Schwenken auf den Zellen gleichmäßig verteilt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der virenhaltige Überstand abgesaugt und die Schalen vorsichtig mit 8ml Agarose-Overlay überschichtet. Die Zubereitung des Agarose-Overlays entsprach der Lösung für die Überschichtung der 293-Zellen nach Transfektion mit Plasmiden. Nach Erstarren der Agarose wurden die Schalen weiter bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator aufbewahrt. Nach 7 Tagen erfolgte eine weitere Überschichtung der Zellen mit nochmals 5ml Agarose-Overlay.

Nach 10 und 14 Tagen wurden die Platten auf das Vorhandensein von Plaques untersucht. Die Anzahl der Plaques wurde auf den Schalen ermittelt. Es wurden die Schalen mit den Verdünnungen für die Auswertung ausgewählt, auf denen zwischen 30 und 300 Plaques entstanden waren. Zur Berechnung des Titers wurde folgende Formel angewandt:

(durchschnittliche Anzahl von Plaques auf der Schale) * (Verdünnung der Viruslösung der Schale) / (0,5ml Volumen der Viruslösung der Schale) =
Plaque forming Units (pfu) / ml

3.5. Expressionsnachweis *in vitro*

3.5.1. Infektion

Zur Herstellung von Lysaten wurden Zellen der Linie HepG2 in die Wells einer 6-well-Plate ausgesät, so dass sich in jedem Well $1 \cdot 10^6$ Zellen befanden. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank waren die Zellen adhärent und bildeten einen Monolayer in den Wells. Es wurden Verdünnungen der Viren mit Kompletmedium ohne FCS hergestellt, wobei für eine multiplicity of infection (m.o.i.) von 1 die Zahl der infektiösen Partikel der zu infizierenden Zellen entsprechen musste. Es kamen m.o.i. von 1,3,10,30,100 und 300 zum Einsatz. Die Virusverdünnungen wurden so angesetzt, dass jeweils drei Wells mit je 500 μ l nach Absaugen des Mediums in den Wells infiziert werden konnten. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank wurden die Virusverdünnungen abgesaugt und durch 2ml Kompletmedium mit FCS ersetzt.

3.5.2. Herstellung von Lysaten

48h nach Infektion der Zellen im Brutschrank wurde der Überstand der Zellen abgenommen und bei -80°C eingefroren. Es wurde 1ml kaltes PBS hinzugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber von Boden des Wells gekratzt und in Eppendorf-Caps überführt. Nach Zugabe von nochmals 0,5ml kalten PBS in die Wells wurde der Rest der Zellen abgekratzt und in die Eppendorf-Caps gegeben. Nun wurden die Caps bei 300 rpm und 5°C für 5 min. zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Zellpellets in je 100 μ l CCLR (1x) durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach 10 min Inkubation der Eppendorf-Caps auf Eis wurde nochmals für 10 min. bei 13500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurden von den Pellets getrennt und alles bei -80°C eingefroren.

3.5.3. Proteinassay

Zur Bestimmung der Proteinmenge von Lysaten wurde der DC Proteinassay von Biorad verwendet. Durch Zugabe von 20 µl Reagenz S zu jedem der für den Assay benötigten ml Reagenz A wurde die Arbeitslösung A' unmittelbar vor dem Assay hergestellt. Es wurden Protein-Eichlösungen mit einem BSA-Standard in CCLR (cell culture lysis reagent) (1x) hergestellt in den Proteinkonzentrationen 1,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml und 0 mg/ml. Je 5 µl der Standard-Lösungen und der Proben wurden in eine 96-well-Plate pipettiert, die Standards in Doppel-, die Proben in Dreifach-Werten. Es wurden nacheinander je 25µl Reagenz A' und je 200µl Reagenz B in jedes Well pipettiert, die Luftblasen anschließend mit einer sauberen Pipettenspitze entfernt. Nach 15 min. Inkubation bei RT konnten die Absorptionen bei 750nm ermittelt werden.

Mit den Absorptionen der Proteinstandards wurde eine Eichkurve erstellt anhand derer der Proteingehalt der Proben errechnet werden konnte.

3.5.4. Luciferase-Assay

Zum Nachweis der Aktivität der Adenoviren wurde ein Markergen in die Expressionskassette der Vektoren kloniert. Es kam dabei das Gen des Enzyms Luciferase zum Einsatz, eines der am häufigsten verwendeten Reportergene (Naylor 1999). Es handelt sich um die modifizierte Version der Luciferase cDNA des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (de Wet *et al.* 1985). In der Anwesenheit von ATP, O₂ und Mg²⁺ katalysiert Luciferase unter Lichtemission (562nm) die oxidative Decarboxylierung von D-(-)Luciferin (Bronstein *et al.* 1994). Zur Messung der Enzymaktivität wurde das Luciferase Assay System (Promega) verwendet.

Die Überstände der Zelllysate wurden auf Eis aufgetaut. Das Luciferase Assay Reagent wurde in dem Luciferase Assay Buffer aufgelöst und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Zur Messung der Proben wurden 20µl Lysat in ein Luminometer-Tube gegeben. Im Luminometer wurden 100µl Luciferase Assay Reagent dazugegeben und nach 2 sek. Intervall für 10 sec. die Aktivität der Luciferase bestimmt.

3.5.5. Sequenzierung der Schnittstellen

Der genotypische Expressionsnachweis wurde durch eine Sequenzierung der Schnittstellen der Expressionskassette durchgeführt. Dazu wurde die DNA aus virushaltigem Zellkulturüberstand aufgereinigt, durch PCR die Schnittstellenbereiche amplifiziert und anschließend sequenziert.

A) Isolation der viralen DNA im CPE-Überstand

Die Isolation der adenoviralen DNA erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch das Qiamp Blood Kit. Die viralen Kapsidproteine wurden hierbei durch SDS denaturiert und durch Protease K verdaut, so dass die virale DNA durch Zentrifugation an eine mit Silicagel beschichtete Membran gebunden und durch einen pH-Umschwung eluiert werden konnte. Sie diente der PCR-Amplifikation als Matrize.

400 µl aus dem Zellkulturüberstand der lytischen 293-Zellen wurden zur Isolation eingesetzt. Die Isolation der adenoviralen DNA erfolgte nach den Protokollen des Herstellers (Qiagen).

B) PCR-Amplifikation und Sequenzierung

Die verwendete Methode basierte auf dem Prinzip des Kettenabbruchs- bzw. Didesoxynucleotidverfahrens (Sanger *et al.* 1977).

Der Sequenzierungsansatz bestand aus der aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigten DNA, 15 pMol des jeweiligen Primers, 2 µl BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix und 6µl 2,5x Sequencing Buffer. Es wurde folgendes Sequenzierungsprogramm im Thermozykler durchgeführt:

25 Zyklen:	
96°C	10 sek.
50°C	5 sek.
60°C	4 min.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einem Standard 1,5 ml Eppendorftube mit 80 µl 0,3 M Natriumacetat aufgefüllt, mit 300µl Ethanol versetzt und fünf min. bei RT inkubiert. Durch zehnmündige Zentrifugation bei 13k rpm wurde die DNA pelletiert und anschließend luftgetrocknet.

Die Sequenzierung erfolgte durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie des UKE. Es wurde sowohl die Sense, als auch die Antisenseorientierung sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden auf

Kongruenz untereinander und auf Kongruenz mit der errechneten Sequenz untersucht.

Verwendete Primer (MWG-Biotech):

Sense-Orientierung:

Primer 1: 5'-CTT CGA CGC AGG TGT CG-3'

Primer 2: 5'-ACA ACG TCT GTA GCG ACC-3'

Primer 3: 5'-GAA CAG AGG AAG ACG CG-3'

Antisense.Orientierung:

Primer 1: 5'-AAG GGT CGC TAC AGA CG-3'

Primer 2: 5'-TTG AGT TGT TTT GCA TTT TAT CTA GC-3'

Primer 3: 5'-ATC GAT GTC GAC TCG AGG-3'

Mit diesem Primer-design konnten die Übergänge zwischen den ORFs der Luciferase, der IRES und dem m144 geprüft werden.

3.6. Expressionsnachweis *in vivo*

3.6.1. Haltung der Versuchstiere

Für die Tierversuche wurden weibliche Mäuse der Gattung balb/c verwendet. Dabei handelt es sich um immunkompetente Mäuse mit weißem Fell. Die Tiere wurden von dem staatlich anerkannten Versuchstierzüchter (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Experimente wurden gemäß Tierschutzbestimmungen in dafür ausgewiesenen Räumen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter S2-Sicherheitsbedingungen nach dem Gentechnikgesetz durchgeführt. Die Tiere wurden in Gruppen zu 6 Tieren unter Standard-Bedingungen gehalten und wöchentlich umgesetzt. Sie erhielten Trinkwasser ohne weitere Zusätze und übliches Futter für Nagetiere. Zur Differenzierung der einzelnen Tiere einer Gruppe wurden die Tiere durch Stanzen von Ohrlöchern markiert.

3.6.2. Durchführung der Tierversuche

Die Virusdosen wurden den Mäusen systemisch über die paarig angelegte Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden einzeln aus den Käfigen genommen, gewogen und in eine Injektionsröhre gebracht. In dieser Röhre konnte die Maus fixiert werden und durch eine Öffnung an der sicher verschließba-

ren Klappe war ihr Schwanz frei zugänglich. Dadurch war ein sicherer Halt der Maus gewährleistet, um die Injektionen vornehmen zu können.

Zur Injektion des gewünschten Volumens der Viruslösung wurde eine Hamilton-Glasspritzen mit 100 µl Injektionsvolumen verwendet. Diese wurden über Nacht in eine 70%ige Ethanollösung gelegt und anschließend für 24 h in PBS gereinigt. Zur Punktion wurden s.c.-Kanülen verwendet. Die Viruslösung wurde in die Spritzen aufgezogen, die Kanüle fest aufgesetzt und entlüftet.

Zur Erleichterung der Venenpunktion wurde der Schwanz der in der Injektionsröhre fixierten Maus in etwa 40°C warmes Wasser getaucht. Durch die Wärmewirkung wurde eine gute Dilatation der Venen für ein paar Minuten erreicht. Es konnte nun eine der Schwanzvenen punktiert und das Zielvolumen langsam appliziert werden. Nach Erreichen des Zielvolumens wurde die Kanülenspitze noch einen Moment in der Vene belassen, damit die applizierte Virusdosis nicht durch den austretenden Blutstropfen verkleinert wurde.

Nach Ablauf der Versuchsdauer für die entsprechenden Tiergruppen wurden die Tiere terminiert. Dazu wurden sie in einem großen Glasgefäß einem Gasgemisch aus 80% Kohlendioxid und 20% Sauerstoff ausgesetzt. Dadurch wurde nach wenigen Minuten Exposition eine kurze Narkose der Mäuse erreicht. Während dieser konnte eine cervikale Dislokation durchgeführt werden. Es wurde nun eine Laparatomie durchgeführt und die Leber vorsichtig herauspräpariert.

Bei einem Teil der Mäuse wurde ein Leberlappen in verschließbaren Reagenzröhrchen durch Formalin fixiert. Der Rest der Leber wurde in Reagenzröhrchen durch Trockeneis/Ethanolbad schockgefroren. Anschließend wurden die Lebern bei -80°C gelagert. Es wurde das Lebergewicht der einzelnen Leberteile ermittelt und zum Gesamtlebergewicht der jeweiligen Maus zusammengeführt.

3.6.3. Herstellung von Lysaten aus Lebergewebe

Um die Aktivität der Luciferase in dem Lebergewebe zu ermitteln wurden die Lebern auf Eis langsam aufgetaut. Es wurde in jedes Röhrchen das dreifache Volumen CCLR(1x) hinzugefügt. Mit Hilfe eines UltraTurrax wurden die Lebern homogenisiert. Der Stab des UltraTurrax wurde, um Kontaminationen zwischen den einzelnen Proben zu vermeiden, mit 1N NaOH, absoluten

Ethanol und A.dest gereinigt. Anschließend wurden die Tubes mit den homogenisierten Lebern bei 5000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Nun wurden je 1,5 ml des Überstandes in je ein Eppendorf-Cap überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 20 min. Die Überstände wurden nochmals in neue Eppendorf-Caps überführt und bei -80°C für die Luciferasebestimmung aufbewahrt.

3.6.4. *Luc-Assay*

Die Überstände der Leberhomogenate wurden auf Eis aufgetaut. Das Luciferase Assay Reagent wurde im Luciferase Assay Buffer aufgelöst und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Zur Messung der Proben wurden 20µl Lysat in ein Luminometer-Tube gegeben. Im Luminometer wurden 100µl Luciferase Assay Reagent dazugegeben und nach 2 sek. Intervall für 10 sec. die Aktivität der Luciferase bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung der Plasmide

Es wurde der ORF (open reading frame) des m144 aus dem Vektor pcDNA3m144 mit den Restriktionsendonukleasen Xba1 und Not1 verdaut.

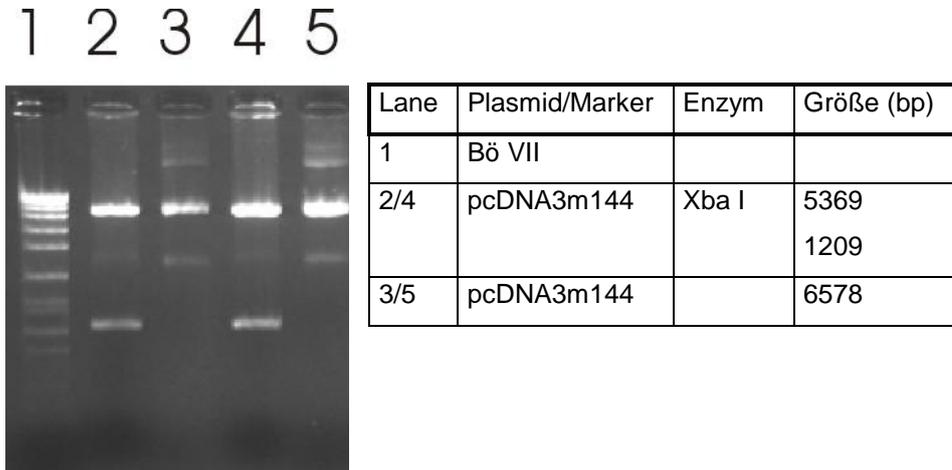


Abbildung 3: Kontrollverdau pcDNA3m144 mit Xba I

Nach gelelektrophoretischer Trennung der Fragmente wurde das 1209 bp große Fragment des ORF isoliert. Das Plasmid pIRES wurde ebenfalls mit Xba1 und Not1 verdaut und aufgereinigt. Nun konnte das m144 durch Ligation hinter die IRES eingefügt werden und es entstand das Plasmid pIRESm144. Die Plasmide mehrerer Ampicillin-resistenter Kolonien wurden durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und XbaI getestet und ein vielversprechender Klon zur weiteren Analyse ausgesucht. Die Korrektheit des Klones konnte dabei bestätigt werden.

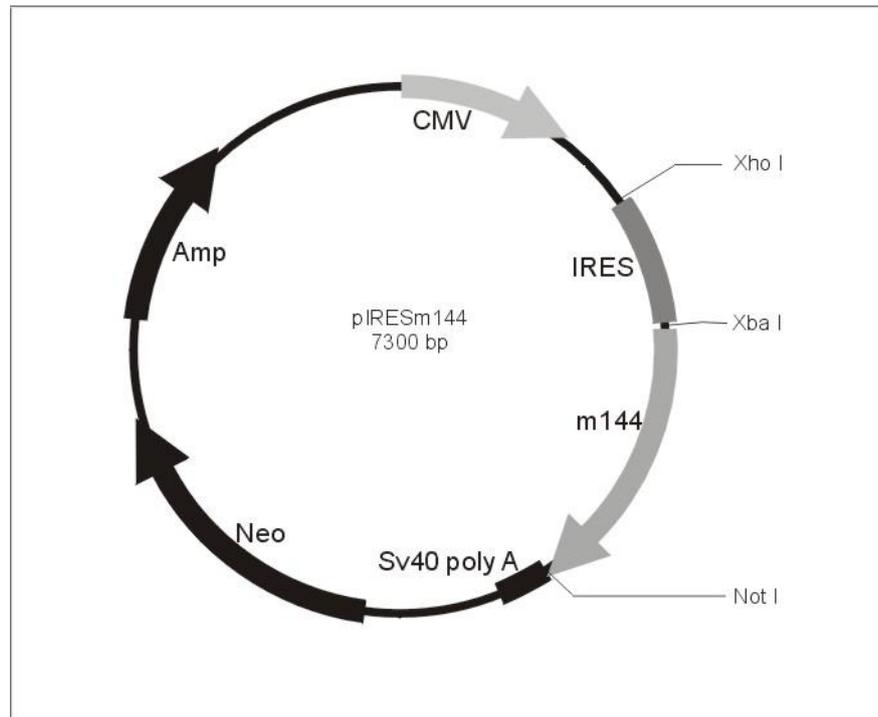


Abbildung 4: Plasmidkarte pIRESm144

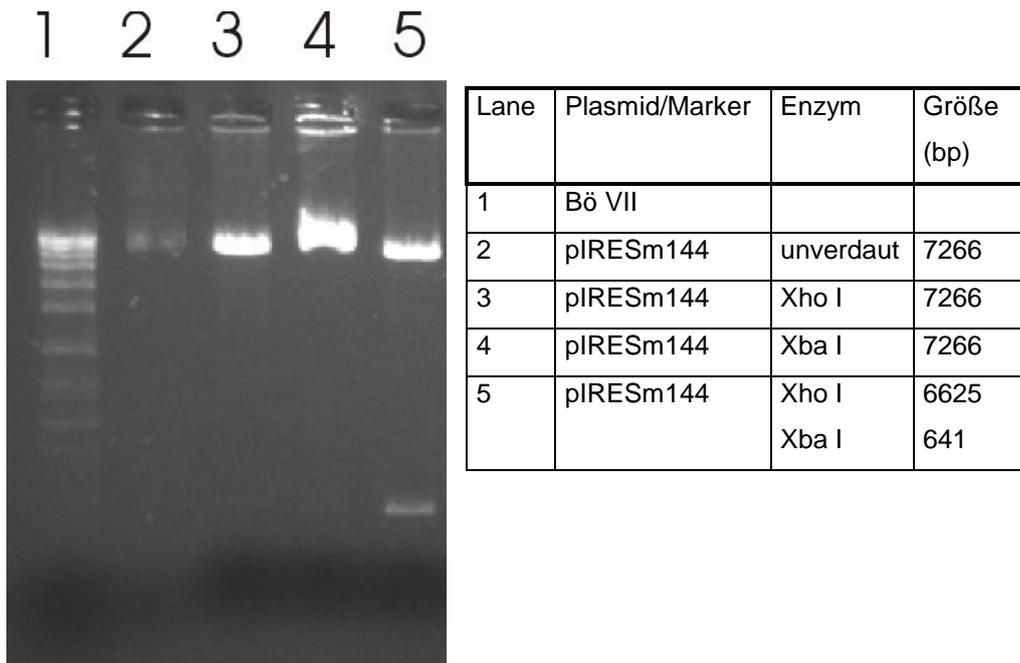


Abbildung 5: Kontrollverdau pIRESm144

Aus dem Vektor pGL3basic wurde durch Verdau mit Xba1 und Sac1 das luc-Gen isoliert und in den Klonierungsvektor pBS zwischenkloniert und der Vektor pBS-luc generiert. Dieser Schritt war notwendig, um das Luciferase-Gen mit Schnittstellen der Restriktionsendonuklease Xho1 auf beiden Seiten zu flankieren.

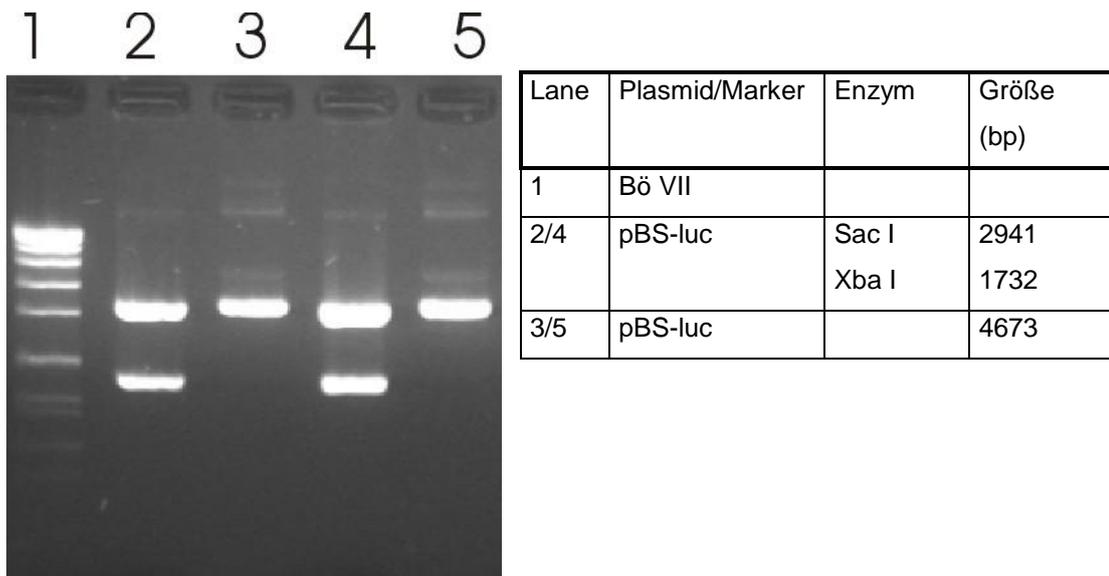


Abbildung 6: Kontrollverdau pBS-luc Xba1 Sac1

Durch Verdau mit Xho1 konnte das Gen wieder aus pBS-luc isoliert werden, in den ebenfalls mit Xho1 geschnittenen Vektor pIRESm144 eingefügt werden und das Plasmid plucIRESm144 entstand. Zur Kontrolle der richtigen Orientierung des Luciferase-Gens wurde der plucIRESm144 zur Kontrolle mit Bgl II verdaut. Bei richtiger Orientierung ergaben sich Fragmente von der Größe 1097 und 7939 bp, bei falscher Orientierung 2860 und 6176 bp. Es konnte schließlich ein Klon mit der richtigen Orientierung gewonnen werden.

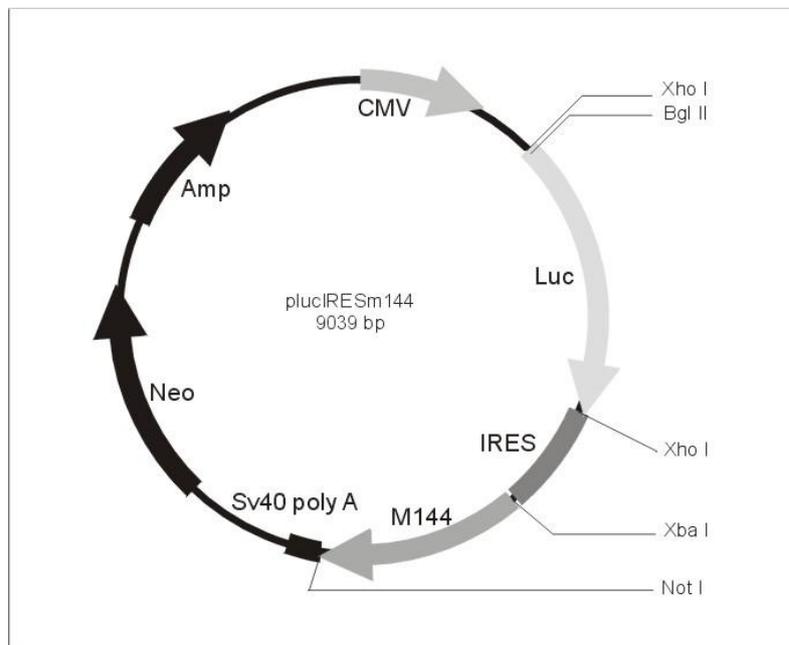


Abbildung 7: Plasmidkarte plucIRESm144

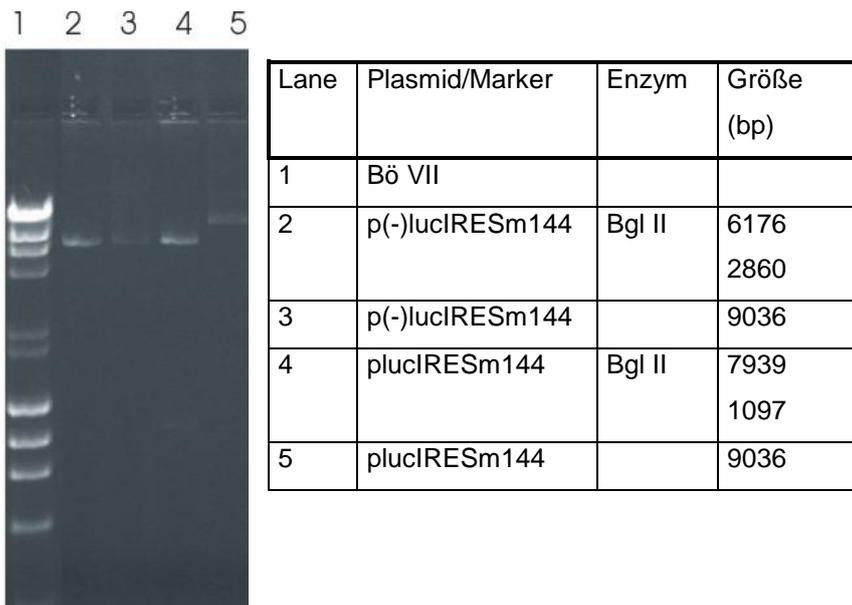


Abbildung 8: Kontrollverdau plucIRESm144

Aus diesem Klon wurde mit Hilfe von NotI und BglII die Expressionskassette mit dem Luciferase-Gen, der IRES-Verbindung und dem m144 ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde die Expressionskassette in den Vektor pAd.CMVpA kloniert. Der so gewonnene Vektor pAd.CMV-lucIRESm144pA enthielt nun die Expressionskassette, den CMV-Promotor und die homologen Sequenzen, die für die Rekombination bei der Virusentstehung notwendig waren.

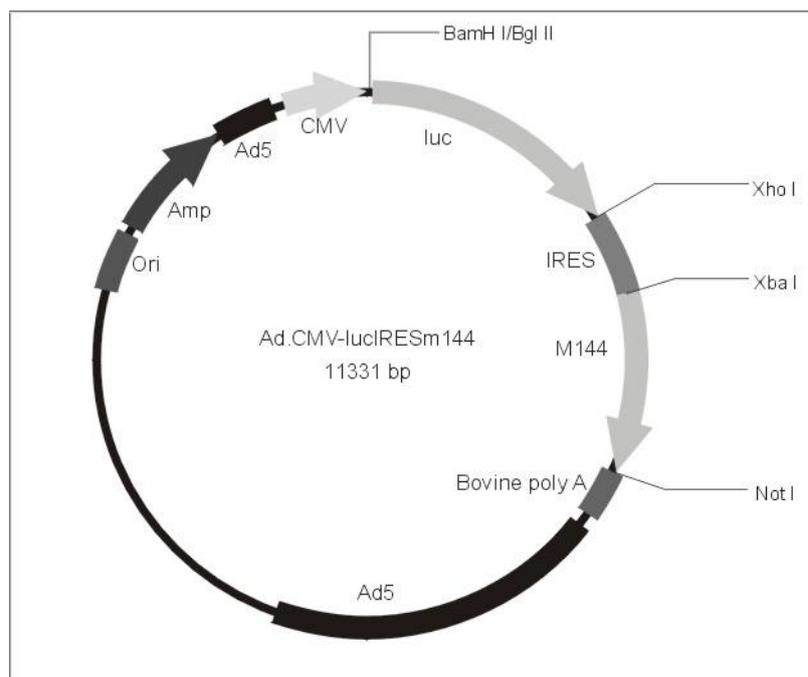


Abbildung 9: Plasmidkarte pAd.CMV-lucIRESm 144

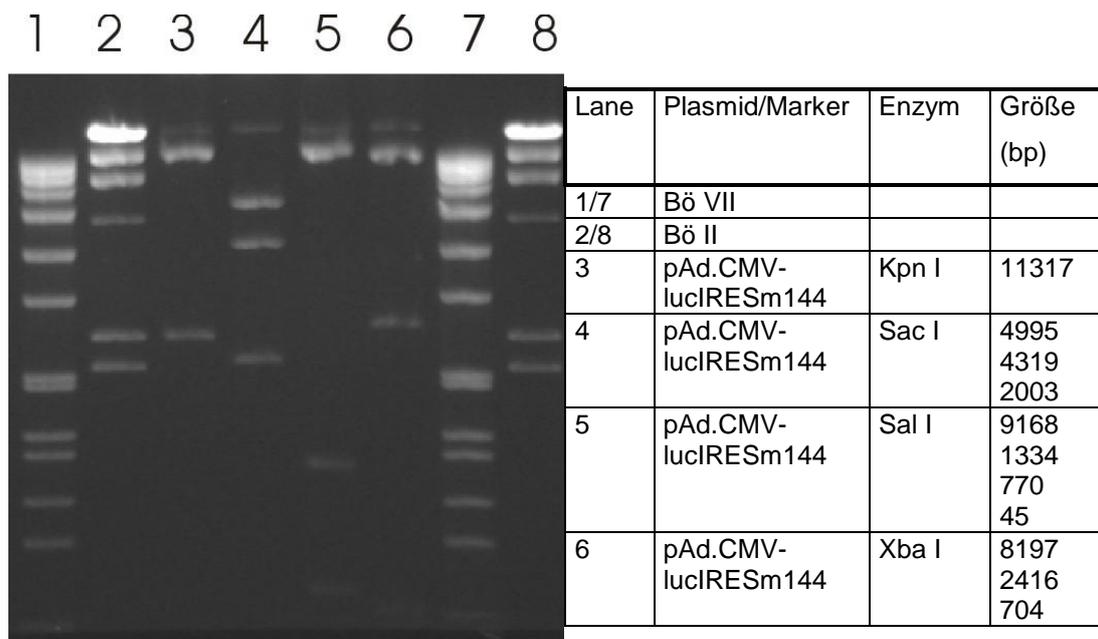


Abbildung 10: Kontrollverdau pAd.CMV-lucIRESm144

4.2. Herstellung der adenoviralen Vektoren

Die beiden benötigten Plasmide pAd.CMV-lucIRESm144 und pBHG10 wurden in je 4 Litern E.coli-Kultur in LB-Flüssigmedium vermehrt und über Maxipräparationen aufgereinigt. Mittels Präzipitation mit Ca^{2+} wurde die DNA in 293-Zellen eingeschleust. Die Zellen enthielten die E1-Region des adenoviralen Genoms stabil transfiziert. Die beiden Plasmide pAd.CMV-lucIRESm144pA wurden in äquimolaren Verhältnis eingesetzt, auf 900 μl pro Ansatz mit A.dest verdünnt und mit 100,0 μl Calciumchlorid-Lösung versetzt. Es ergab sich ein Gesamt-DNA-Gehalt von 25,1 μg pro Ansatz. 20 Schalen wurde je mit einem Ansatz der Calcium-Präzipitat-Lösung für 4,5h inkubiert, anschließend wurden die Schalen mit je 20 ml einer 0,5% Agarose-Lösung überschichtet und weiter inkubiert. Es wurde außerdem eine Schale mit einer Calciumlösung ohne DNA als Negativkontrolle mitgeführt. Zur Einschätzung der Transfektionseffizienz wurde eine Schale mit 20 μg pRC.CMV. β -GAL per Ca^{2+} -Präzipitation transfiziert und am Folgetag nach β -Gal gefärbt. Dabei ergab sich für den Versuch eine eher unterdurchschnittliche Transfektionseffizienz von etwa 6%.

In den Zellen in die durch Endozytose beide Plasmide aufgenommen wurden, konnte eine Rekombination der DNA erfolgen und so ein E1-/E3-defizientes Adenovirus entstehen. Unter der Agaroseschicht konnten die durch Zellyse freigesetzten Viruspartikel nur die direkt umgebenen Nachbar-

zellen infizieren und so einen durch die veränderte Zellmorphologie der lytischen Zellen erkennbaren Plaque verursachen.

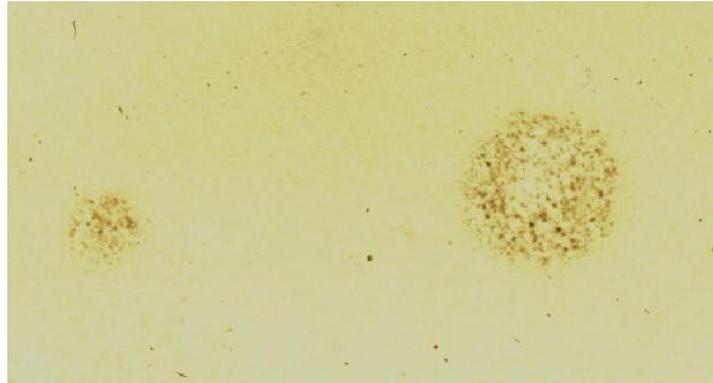


Abbildung 11: Adenovirale Plaques

Nach 11 Tagen wurde auf einer der 20 Schalen eine solche Plaque entdeckt und nach zwei Tagen weiterem Wachstums von der Platte gepickt. Es wurde ein CPE-Assay durchgeführt und nach 50 Stunden waren die Zellen vollständig lysiert. Aus dem Überstand des CPE-Assays ließ sich erfolgreich Luciferase nachweisen.

Das Virus wurde über Zellkultur amplifiziert und dabei wurde bei jedem Schritt die Luciferase-Aktivität des Kulturüberstandes überprüft. Die Überstände der 100 Schalen wurden über Ultrazentrifugation mit einem CsCl-Stufengradienten und einem kontinuierlichen CsCl-Gradienten sowie anschließender Dialyse aufgereinigt. Es konnten schließlich etwa 10 ml Viruslösung gewonnen und eingefroren werden.

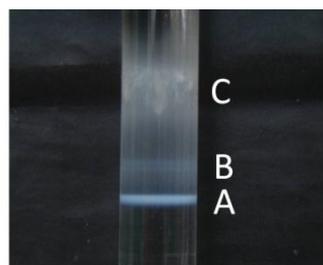


Abbildung 12: Virusbande nach der Ultrazentrifugation. Es ist die untere bläulich weiße Virusbande (A) zu erkennen. Darüber findet sich eine schwache Bande mit leerem Viruskapsiden (B) und ganz oben Zelldetritus/Zellproteine (C).

Das Virus Ad.CMV-luc war im Labor schon vorhanden und sollte als Kontrollvektor in den nachfolgenden Experimenten dienen. Um ausreichende Mengen für die Versuche zur Verfügung zu haben, wurde parallel ebenfalls eine Amplifikation durch Zellkultur durchgeführt und nach anschließender Aufreinigung konnte eine Ausbeute von 8ml Viruslösung erzielt werden.

Anschließend wurde der Titer beider Viruslösungen durch Plaque-assays bestimmt. Es wurden 60mm-Zellkulturschalen mit 293-Zellen mit seriellen Virusverdünnungen infiziert und durch Überschichtung mit Agaroselösung fixiert. Nach 10 Tagen konnten die Titer nach Auszählen der entstandenen Plaques unter der Agaroseschicht und unter Berücksichtigung der Verdünnung der Viruslösung ermittelt werden.

Tabelle 3: Titration von Ad.CMV-lucIRESm144 und Ad.CMV-luc

Ad.CMV-lucIRESm144				
Exponent Verdünnung				Mittelwert
8	33	32	30	31,6
9	3	3	8	4,6
10	1	0	1	
11	0	0	0	
Titer: $6,3 \cdot 10^9$ p.f.u./ml				
Ad.CMV-luc				
Exponent Verdünnung				Mittelwert
7	>10 0	>10 0	>10 0	
8	9	6	3	6
9	3	2	0	1,67
10	0	0	0	
Titer: $1,2 \cdot 10^9$ p.f.u./ml				

4.3. Expressionsnachweis *in vitro*

Zur Charakterisierung der Adenoviralen Vektoren wurden HepG2-Zellen mit den Vektoren Ad.CMV-lucIRESm144 und Ad.CMV-luc infiziert. Es wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen pro well einer 6-well-plate in halb-logarithmischen aufsteigenden Schritten mit Viren infiziert, wobei die Anzahl der infektiösen Partikel in Verhältnis zu den zu infizierenden Zellen gesetzt wurden (m.o.i). Es wurde jede m.o.i. in dreifacher Ausführung durchgeführt. Nach einer Infektionszeit von 48 h wurden aus den Zellen Lysate hergestellt und die Aktivität der Luciferase im Überstand ermittelt. Anschließend wurde der Proteingehalt der Lysate durch einen Proteinassay ermittelt, um die Luciferaseaktivität der Proben auf das Gesamtprotein beziehen zu können. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Viren in HepG2 über den gesamten Dosisbereich nicht signifikant unterschiedliche Mengen Luciferase exprimieren.

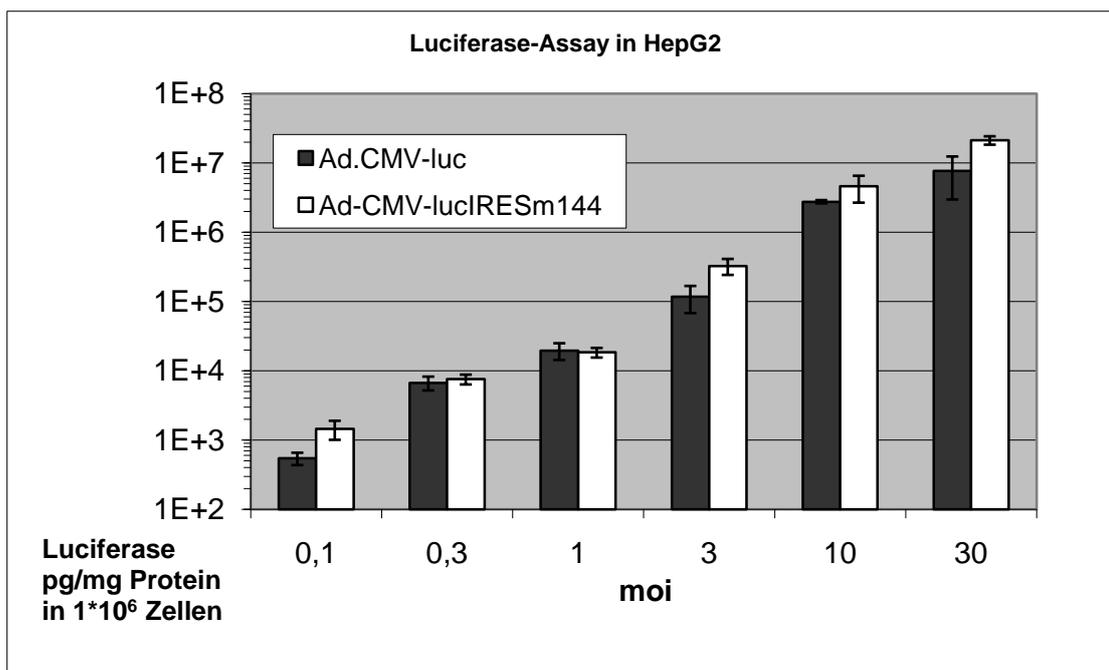


Abbildung 13: Luciferase-Assay in HepG2

Aus dem virushaltigen Überstand der infizierten 293-Zellen wurde die virale DNA extrahiert. Durch PCR wurden die den ORF des m144 flankierenden Bereiche des viralen Genoms amplifiziert und anschließend sequenziert. Dabei konnte der ORF des m144 erfolgreich in viralem Genom nachgewiesen werden.

Xba I Start m144

CAC AAC CCG GGA TCC TCT AGA ATG AGG GCT CTG GCG CTG ATA TGC GTG GTG TGG GTG TGT
TGG CGA GAG AGT TGC GCT CGC CAC GGG ACA GAG GAC TCG TCC GAG TCC GGA CTG CGG
TAC GCA TAC ACG TTG GTG GTC GAC GGC ACC GCA AAT ACG CGC CGT TGT TTT GGG ACC GGA
CAC GTC GAC GGG GAA GCC TTT GTG GGA TAC TCC AAT AAC AAG ACA CAC GGG ATC GGT AGA
TGG GTG AAC GCA TCT CAC GTA GAG GAA GAG AAC AAA GAG TTC GTG AGG CAG TGT AAG GAA
CTG CAA GCC GAG CTA GAT AAA ATG CAA AAC AAC TCA AAG GTG ATC GGC GTC AAG ACC GTA
CAA CTA GAC GTC GGT TGT ACA TCT AAG ATC GAG AAA CAT TAC GCG TAT GAC GGC AAC GAA
ACC GAG GAT GAT ACG GCT ACG TCC GCC AGT GAA CGA GAC CGT GAC TGT CAG AAA AAA CTA
ACT GAA TAT AGG AAA CTC GTA CTC GCG TCC GCC GTA TCA CCA CAG CTG GAA GTC GAG AGA
CGG TCC TCG GGT CGC GAG GGC GGC ATG AGA CTA CCG TGT TTC GCT AGG GAC TAC TAT CCC
GCC GAT TTA GAG ATT CGG TGG TGG AAA GAT GAT GGC GGT GGT GGT GCG CTG CCT CAA ACG
TCA AAA CAA CAC CAC GAC CCG CTA CCG TCC GGT AAC GGG CTC TAC CAAAAA CAT ATC GAC
GTC TAC GTG GAC GGA GGC TTG GAG CAC GTG TAC TCG TGT CGA GTC AAG GGT ATC GCG ACC
AAG CTC GAA CTG CAG ATC GTG AGG TGG AAG GGC TAC GCG AGA GGC GCG GGG AAC TCG
GTC GTC CTG TTG GCC CTG TTC ATA CCC GCG AGC GTC ATG GCG GCG GTC GTG GTC GGT
AGC GTG TTG ATA CCG AAG AAG AGC AAG GAA CAG AGG AAG ACG CGT AGG AGG TTC GGA
CGG CGC TCG GGA CAG GAG TCT AAA CGG CCG TCC TAC CAG GTG AAG AGA CGC GCG GAA
CCG CCA TGC GAC CTA CCG ATG ACC ATC TGG TTC CGC GGC GAC AAC GTG ATG AGC ACT CAG
GTC GAG GCC TGT CCG GCG TAT GCC GTC ACG ATG TCC GCC CGC GAG TTG TCG GAC GCC

Ende m144 EcoRI

TGG TCG AAC GGG GAC GGT CCG ATC GTC ACG GTC CCG GAT CCC AGC ATT TGAATT CTG CAG

EcoRV Not I

ATA TCC ATC ACA CTG GCG GCC GCT CGA GCA TGC A

Abbildung 14: Sequenzierung der Schnittstellen der ORF m144

4.4. Expressionsnachweis *in vivo*

Zum Nachweis der Luciferaseexpression *in vivo* wurden immunkompetente balb/c-Mäuse mit je $1 \cdot 10^8$ p.f.u. Ad.CMV-lucIRESm144 systemisch über Injektion in die Schwanzvene infiziert. Es wurden je 12 Tiere für einen Zeitpunkt infiziert. Die Tiere wurden nach 3, 7 und 14 Tagen durch zervikale Dislokation terminiert. Es wurden die Lebern herauspräpariert und gewogen, ein Leberlappen zur histologischen Untersuchung in Formalin fixiert, ein weiterer Leberlappen homogenisiert und auf Luciferaseaktivität untersucht. Die Luciferaseaktivität wurde bezogen auf das Lebergewicht in Gramm. Es konnte die Funktionalität des Virus in Bezug auf die Expression von Luciferase in dem gewonnenen Lebergewebe nachgewiesen werden.

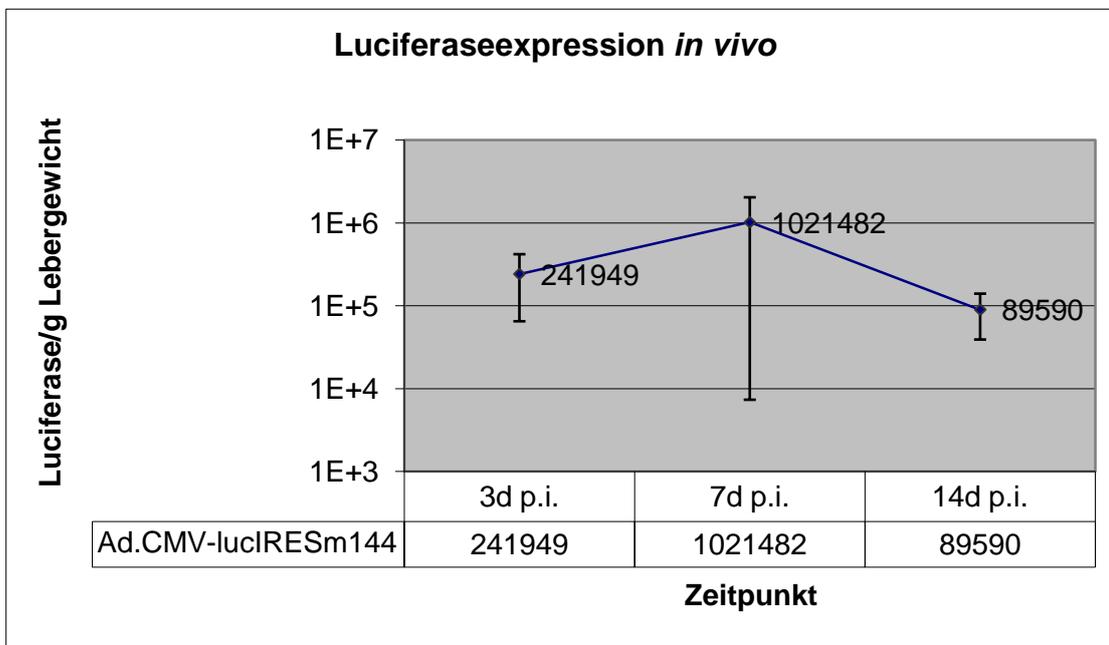


Abbildung 15: Luciferase-Assay *in vivo*

5. Diskussion

Eine wesentliche Einschränkung bei der Verwendung von Adenovirusvektoren für die Gentherapie somatischer Erkrankungen ist, dass die Transgenexpression in den meisten Geweben nach spätestens 4-6 Wochen signifikant abfällt (Barr *et al.* 1995; Davidson *et al.* 1993). Die Hauptursache hierfür liegt neben der fehlenden Integration in der zellulären Immunantwort gegen die ebenfalls exprimierten adenoviralen Proteine (Yang *et al.* 1994; Yang *et al.* 1995). Zum einen führt die Infektion durch Adenoviren zu einer Aktivierung von NK-Zellen durch Induktion von INF- γ (Ruzek *et al.* 2002). Die genauen Mechanismen der Zytokininduktion sind noch nicht bekannt. Des Weiteren wird durch die MHC-I-Komplex-vermittelte Präsentation der adenoviralen Proteine ein Angriff der CD8 positiven, zytotoxischen T-Zellen ausgelöst, wodurch es zur Lyse der infizierten Zelle kommen kann.

Das Kapsid des adenoviralen Vektors selbst stellt ebenfalls ein starkes Antigen dar und induziert als spezifische Antwort des Immunsystems eine Antikörperbildung. Dadurch ist eine Re-Injektion von adenoviralem Vektor zur Verlängerung der Transgenexpression nicht geeignet, da eine überschießende Immunreaktion hervorgerufen wird (Yang *et al.* 1994). Da es sich beim humanpathogenen Adenovirus Serotyp 5 um ein in Virus mit einem hohen Durchseuchungsgrad in der Bevölkerung handelt, ist das Vorhandensein von präformierten neutralisierenden Antikörpern im Probanden darüber hinaus sehr hoch und ein hoher Anteil der Infektionsdosis wird vor Erreichen der Zielzelle bereits neutralisiert. Es konnte gezeigt werden (Croyle *et al.* 2001), dass durch die chemische Veränderung der Kapsidbestandteile durch covalente Bindung von Polyethylenglykol nach der Virusgeneration die Erkennung der systemisch applizierten Vektoren vor Erreichen der Zielzellen signifikant reduziert werden kann. Durch die chemische Veränderung des Viruskapsids wird allerdings auch der Gewebetropismus der Viren beeinflusst, so das veränderte Expressionslevel der Transgene dadurch bedingt werden können (Kreppel *et al.* 2008). Allerdings wird durch die Umgehung der Erkennung der Vektoren durch das Immunsystem vor Erreichen der Zielzellen eine wiederholte Virusapplikation möglich, die möglicherweise eine weitere Verlängerung der Transgenexpression bewerkstelligen kann.

Allerdings beeinflusst auch die Beschaffenheit des Transgens die Immunantwort und kann sowohl humorale, als auch zelluläre Reaktionen auslösen. Michou *et al.* (1997) beschrieben, dass von transfizierten Zellen sezernierte Transgene eine Antikörper-basierte Immunreaktion auslösen können, so dass ein Verlust der Transgenexpression eintritt, ohne dass das genetische Material das adenovirale Vektors abgeräumt wird. Ebenfalls wird das Transgen über MHC-I-Komplexe an der Oberfläche der infizierten Zellen präsentiert und kann so eine T-Zell-vermittelte Lyse der infizierten Zellen und damit einen Verlust der Transgenexpression bewirken.

Die Schlüsselposition bei der Abwehr einer viralen Infektion kommt allerdings nach Liu *et al.* (2000) den NK-Zellen zu. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in immunkompetenten Mäusen, als auch in T-Zell-defizienten Mäusen nach systemischer Infektion mit replikations-defizienten Adenoviren eine in ihrem Ausmaß vergleichbare Leberschädigung auftritt, wofür die NK-Zellen verantwortlich gemacht werden. Als Parameter dafür galt der Anstieg der Leberenzyme im Serum. Liu *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die NK-Zellen eine doppelte Rolle in der Induktion einer Infektions-assoziierten Leberschädigung übernehmen. Zum einen lysieren sie Hepatozyten in der Virus-infizierten Leber und sie stimulieren, wahrscheinlich über ihre Fähigkeit IFN- γ zu sezernieren, die Induktion einer Virus-spezifischen, T-Zell-vermittelten Immunantwort.

Um eine Verlängerung der adenoviralen Transgenexpression *in vivo* zu erreichen werden verschiedene Ansätze verfolgt.

Zum einen wurden „gutless vectors“ entwickelt, bei denen das adenovirale Gerüst auf das zur Expression der Transgene absolut Notwendigste reduziert ist (Hardy *et al.* 1997). Die Herstellung dieser Konstrukte ist jedoch technisch anspruchsvoll und die Replikation aufwendig. Die Herstellung erfordert den Einsatz von so genannten Helferviren. Dabei handelt es sich vom Prinzip her um adenovirale Vektoren der ersten Generation. Die Kontamination der Transgen-tragenden Vektoren mit dem Helfervirus während der Vektorgeneration ist allerdings nicht sicher auszuschließen und somit die Interaktion des Helfervirus an der Zielzelle und im Zielwirt nicht auszuschließen. Darüber hinaus sind die Effizienz der Transfektion und die Genexpression zum ge-

genwärtigen Zeitpunkt für therapeutische Applikationen unbefriedigend (Ferry *et al* 1998; Zou *et al.* 2000).

Bei einer anderen Strategie werden die Vektorstrukturen ihrer Vorteile wegen belassen. Stattdessen wird die Immunantwort des Wirtsorganismus unterdrückt. Es ist zwar tierexperimentell machbar, die humorale und zelluläre Immunantwort systemisch zu supprimieren (DeMatteo *et al.* 1996; Kay *et al.* 1997), Es werden dabei verschiedene Wege beschritten. DeMatteo *et al.* verlängerten im Tierversuch die Transgenexpression durch Thymektomie und eine anschließende Behandlung mit einem Anti-CD4-Antikörper, um eine Depletion der CD-4+ T-Lymphzyten zu erreichen. Ein weiterer Ansatz von DeMatteo *et al.* war die Depletion der CD4+-Zellen durch Behandlung der Versuchstiere mit einem Anti-Thymozyten-Serum. Es konnte durch diese Immunsuppression in den Versuchstieren eine Verlängerung der Expression von adenoviral transfizierten Genprodukten erzielt werden. Dies ist aber in Hinblick auf klinische Studien sehr problematisch, da mit einer Reihe von Nebenwirkungen durch die systemische Immunsuppression zu rechnen ist (Infektanfälligkeit, onkogenes Potential).

Eine neue Idee ist, um das Ziel der prolongierten oder gar persistierenden Genexpression zu erreichen, die Immunstimulation *lokal* zu verhindern, am besten direkt an der Antigen tragenden, adenoviral transfizierten Zelle. Schowalter *et al.* (1997) konnten zeigen, dass durch Infektion von Mäusen mit Adenoviren, die das Genprodukt CTLA4Ig exprimieren, welches die MHC-Komplex- gebundene Aktivierung von CTL inhibiert, eine Verlängerung der Persistenz der Genexpression eines Kontrollvirus herbeigeführt werden kann. Adenoviral exprimiertes CTLA4Ig konnten Olthoff *et al.* (1997) nutzen, um in Mäusen, die eine allogene Lebertransplantation erfahren hatten, eine T-Zell-bedingte Abstoßungsreaktion zu verzögern und so das Überleben der Tiere zu verlängern.

Viele Viren, einschließlich des Cytomegalievirus, unterdrücken die Expression von MHC-I-Komplexen an der Zelloberfläche, um der Zellyse durch die zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen zu entgehen (Berger *et al.* 2000). Durch diesen Eingriff des Virus in das Netzwerk des Immunsystems ist zwar eine Unterminierung der spezifischen zellgebundenen Immunabwehr möglich, allerdings wird dadurch eine Aktivierung des unspezifischen zellgebun-

denen Abwehrsystems eingeleitet. Nach Kärre *et al.* (1986) bewirkt eine Suppression des Levels der MHC-I-Komplex-Expression an der Zelloberfläche eine Aktivierung von NK-Zellen. MHC-I-Komplexe wirken auf NK-Zellen inhibierend (Lanier *et al.* 1997). Stimulation von aktivierenden Rezeptoren der NK-Zelle bewirkt eine Zell-Lyse, wenn die inhibierenden Rezeptoren der NK-Zelle nicht an eine adäquate Menge an MHC-I-Molekülen auf den Zielzellen binden können (Kärre *et al.* 1986).

Die murinpathogene Form des Cytomegalievirus ebenso wie seine humanpathogene enthalten in ihrem Genom Information für Proteine, die in ihrer Struktur den MHC-I-Komplexen der Wirtsorganismen homolog sind. Es konnte gezeigt werden, dass das murine Genprodukt m144 *in vitro* (Kubota *et al.* 1999) und *in vivo* (Farrell *et al.* 1997; Cretney *et al.* 1999) NK-Zellen inhibieren kann. Es wird angenommen, dass m144 die Funktion von MHC-I-Komplexen imitiert und die NK-Zell-Antwort des Wirts inhibiert, um eine frühe Beseitigung der durch CMV infizierten Zellen zu verhindern (Farrell *et al.*, 1997). Der Einbau des m144 in ein Adenovirus ist sehr vielversprechend, da nach Liu *et al.* (2000) die NK-Zellen die Schlüsselposition in der Abwehr viraler Infektionen haben, insbesondere in der Leber. Eine Elimination der NK-Zellen vor einer systemischen adenoviralen Infektion führt zu einer Schwächung der Leberschädigung, hemmt IFN- γ -Sekretion und verhindert die Induktion einer Virus-spezifischen T-Zell Antwort. Durch die Inhibition dieser frühen Ereignisse der antiviralen Immunreaktion kann eine verlängerte Viruspersistenz erwartet werden.

Die Entscheidung für m144 wurde aus verschiedenen Gründen getroffen. Zuerst ist durch das Vorhandensein des humanen Äquivalentes eine Übertragung in ein humanes Modell leicht möglich. Das UL18 des humanen CMV ist nach Chapman *et al.* (1998) nur zu 18% sequenzhomolog und unterscheidet sich ebenfalls in der strukturellen Zusammensetzung, es konnte aber sowohl für m144 (Farrell *et al.* 1997) als auch für UL18 (Reyburn *et al.* 1997) eine Inhibition der NK-Zell-Aktivität *in vivo* gezeigt werden.

Als alternative immunmodulatorische Gene kamen noch zwei weitere in Frage. Das Genom des murinen CMV beinhaltet m131/129, dessen Genprodukt für ein Chemokin-Homolog kodiert. Fleming *et al.* (1999) zeigten, dass bei Abwesenheit des Genes eine effektivere NK-Zell-vermittelte Bekämpfung der

infizierten Zellen in der Leber und der Milz stattfindet, so dass davon auszugehen ist, dass das Chemokin-Homolog eine inhibitorische Wirkung auf die NK-Zell-Aktivität hat. Problematisch ist bei diesem Gen die Übertragung auf ein Modell des Menschen, da eine direkte Vergleichbarkeit der Chemokinhomologa zwischen muriner und humaner CMV-Variante nicht gegeben ist (Saederup *et al.* 2002). Die Gene kodieren für unterschiedliche Subtypen der Chemokine und ein Modell zur Erforschung der humanpathogenen gibt es bisher nicht.

Das Genom des humanpathogenen CMV beinhaltet die Information für das Genprodukt US11. Wiertz *et al.* (1996) zeigten, dass durch das Genprodukt US11 die MHC-I-Komplex-Expression an der Zelloberfläche herabreguliert wird, da die Herstellung des aus mehreren Bestandteilen bestehenden MHC-I-Komplexes inhibiert wird. Dadurch wird die Zellyse durch zytotoxische T-Zellen umgangen, da eine verminderte Proteinpräsentation an der Zelloberfläche erfolgt. Dadurch könnte man zunächst einen verlängernden Effekt auf eine Transgenexpression vermuten. Zellen werden bei veränderten Leveln der MHC-I-Komplex-Expression von NK-Zellen erkannt und lysiert (Farrell *et al.* 1999), so dass in der Summe keine signifikante Expressionsverlängerung zu erwarten ist. Des Weiteren fehlt in diesem Fall für die Austestung im Tiermodell eine murine homologe Variante.

Somit war das Gen m144 am vielversprechendsten. Um die Expressionsdauer messen zu können wurde das Markerenzym Luciferase ausgewählt, da es eine Detektion mit einer hohen Sensitivität zulässt und durch simple, zügige Meßmethoden ermittelt werden kann. Es wurde die Wahl getroffen, beide Gene in ein Adenovirus zu klonieren und beide ORFs über eine IRES zu verbinden. Die IRES wurde aus dem Enzephalo-myokarditis-Virus (ECMV) entliehen, es erlaubt die Translation von zwei ORFs von einer Messenger-RNA (Rees *et al.* 1996). Ein alternativer Ansatz mit einem Markergen tragenden Adenovirus und einem weiteren m144 tragenden Virus wurde verworfen. Ein Effekt wäre bei solch einem Arrangement nur zu erwarten, wenn beide Viren dieselbe Zielzelle infizieren würden. Bei systemischer Applikation der Adenoviren wäre eine Steuerbarkeit hierfür nicht gegeben und der Anteil zufällig doppelt infizierter Zellen nicht ausreichend, um einen signifikanten Effekt erwarten zu können.

So wurde die Verknüpfung beider Gene durch eine IRES in einer Expressionskassette in nur einem Vektor gewählt. Dirks et al. (1993) zeigten eine dreifach schwächere Expression aus dem zweiten Cistron bei der systematischen Untersuchung der IRES abhängigen Expression der Reportergene Luciferase und sezernierter alkalischer Phosphatase. Zur Erhaltung der Vergleichbarkeit des m144 tragenden Vektors mit dem Kontrollvektor Ad.CMV-luc wurde das Markergen Luciferase an die erste Stelle kloniert und m144 in der zweiten, schwächer exprimierten Stelle untergebracht.

Als Alternative zur IRES für die Co-Expression zweier ORFs in einer Expressionskassette ist jetzt auch ein aus dem Maul-und-Klauenseuche-Virus (FMDV) entliehenes Peptid verfügbar, das zur Expression der beiden Genprodukte der ORFs in äquivalenten Verhältnissen führt (Fang *et al.* 2005). Die Konstruktion eines Vektors mit diesem Peptid als Linker zur Coexpression der Luciferase und des m144 wäre sehr vielversprechend, da der höhere Expressionslevel des m144 verglichen mit der IRES als Linker auch eine stärkere immunmodulatorische Wirkung erwarten läßt. Dieses Peptid stand zur Zeit des experimentellen Teils der Arbeit noch nicht zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Adenovirus Ad.CMV-lucIRESm144 erfolgreich generiert und aufgereinigt werden. Es ließ sich *in vitro* eine Luciferaseexpression in der Zelllinie HepG2 nachweisen, die mit der Expression des Virus Ad.CMV-luc vergleichbar ist. Auch in den Lebern von systemisch mit Ad.CMV-lucIRESm144 infizierten balb/c-Mäusen ließen sich signifikante Mengen Luciferase zu unterschiedlichen Zeitpunkten post infectionem nachweisen. Somit ist das Luciferasegen im Vektorsystem *in vivo* und *in vitro* funktionfähig. Der ORF des m144 konnte genotypisch durch Sequenzierung von PCR-Amplifikaten aus virushaltigem Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Der phänotypische Nachweis von m144 *in vitro* gelang nicht eindeutig. Aus Lysat von mit pcDNA3-m144 transfizierten Cos-7-Zellen, einer Nierenzelllinie des afrikanischen Grünaffens, die sich durch sehr gute Transfektions-Eigenschaften auszeichnet, konnte durch Dot-blot mit einem Antikörper gegen m144 (Quelle: P.J. Bjorkman, Division of Biology and Howard Hughes Medical Institute, California Institute of Technology, Pasadena, California, USA) das Genprodukt nachgewiesen werden. Auch auf adenoviraler Plasmidebene mit pAd.CMV-lucIRESm144 und aus Lysaten von

mit Ad.CMV-lucIRESm144 infizierten HepG2-Zellen konnte durch Dot-Blot das Genprodukt dargestellt werden. Allerdings wiesen diese Experimente ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf. Diese Daten konnten auch durch Westernblots unter Verwendung desselben Antikörpers nicht bestätigt werden. Eine Aufreinigung von Antikörper zur Detektion des Glykoproteins m144 aus dem Überstand einer Hybridomzellen-kultur (ATCC Katalog-NR.: CRL-2431, nach Chapman *et al.* 1998) war nicht erfolgreich. Es besteht noch die Alternative, durch einen funktionellen Test des Genproduktes von m144 *in vitro* die Funktionalität des generierten Adenovirus darzustellen. Eine nachweisbare Inhibition von aktivierten NK-Zellen durch geeignete, mit Ad.CMV-lucIRESm144 infizierte und somit m144 an der Zelloberfläche exprimierende Zellen wäre dafür zu erwägen.

Um die Eigenschaften des Virus Ad.CMV-lucIRESm144 *in vivo* weiter zu untersuchen sind weitere Experimente im Tiermodell notwendig. Um eine Aussage über die Kinetik einer möglichen Persistenzverlängerung des exprimierten Transgenes treffen zu können, ist der Vergleich der Aktivität von Luciferase aus Lebergewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten des m144 exprimierenden Virus mit einem Kontrollvirus Ad-CMV-luc anzustreben. Es konnte bereits im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das für m144 kodierende Adenovirus *in vivo* eine signifikant höhere Luciferaseaktivität im Lebergewebe nach 3, 7 und 14 Tagen nach Injektion generieren kann. Diese Daten geben einen ersten Hinweis. Es sollte nun die Dauer der Transgenexpression durch Langzeitverläufe zur Darstellung einer möglichen Verlängerung der Expressionsdauer gegenüber dem Kontrollvirus dargestellt werden. Auch sollte ein Vergleich der Transgenexpressionsdauer in infizierten immunsupprimierten oder immuninkompetenten Tieren angestrebt werden, um dort die unterschiedlichen Effekte auf die Expressionsdauer von m144-codierenden und m144-nicht-codierenden Vektoren zu ermitteln. Das in zukünftigen Experimenten gewonnene Lebergewebe sollte histologisch aufgearbeitet werden, um die Auswirkungen des immunmodulatorischen Glykoproteins m144 auf die zelluläre Immunantwort zu den verschiedenen Zeitpunkten untersuchen zu können. Insbesondere sind die frühen Untersuchungszeitpunkte zwischen Tag 2 und 5 dabei interessant, da nach Duncan *et al.* (1978) die adenovirale Genexpression in der

Leber nach 36 bis 48 h ein Maximum erreicht und der Leberenzymanstieg als Marker für die Leberschädigung durch die antivirale Immunantwort erst nach Tag 3 auftritt (Liu *et al.* 2000).

Es wurde bereits eine Fortsetzung der Versuche durchgeführt. So konnte Lange (2008) zu den Zeitpunkten 7, 14 und 20 Tagen nach systemischer Infektion eine signifikant höhere Transgenaktivität der Luciferase *in vivo* nachgewiesen werden. Allerdings war in der histologischen Aufarbeitung keine signifikant veränderte Entzündungszellinfiltration der Leber nachweisbar.

Es wäre die Untersuchung einer wiederholten Virusapplikation interessant. Nach Yang (1994) ruft die wiederholte Virusapplikation durch die Antigenität des Viruskapsids eine überschießende Immunreaktion des Wirtes hervor. Da die infizierte Zelle MHC-I-Komplex-vermittelt auch die Virusantigene dem eigenen zellulären Immunsystem präsentiert, ist die Frage interessant, ob durch die Kaschierung der Virusproteine in der Zelle durch die fehlende Präsentation durch m144 eine geringere Aktivierung des Immunsystems erfolgt und die Immunreaktion auf eine wiederholte Virusapplikation schwächer ausgeprägt ist.

Zu diskutieren ist bei der Kombination eines Adenovirus mit einem immunmodulatorischen Protein die Frage der Sicherheit des neuen Konstrukts. Die infizierte Wirtszelle entginge durch das Transgen m144 der Kontrolle des Immunsystems, eine Infektion oder maligne Entartung könnte nicht mehr erkannt und beseitigt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer spontanen somatischen Mutation einer infizierten Zelle ist allerdings als gering anzunehmen, ein onkogenes Potential ausgehend vom adenoviralen Vektorsystem ist nicht eindeutig belegt.

Bei einer nachgewiesenen signifikanten Verlängerung der Persistenz adenoviraler Transgenexpression im Mausmodell wäre eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen wünschenswert. Dazu besteht die Möglichkeit zur Konstruktion eines Adenovirus, welches das MHC-I-Komplex-Homolog des humanen CMV trägt. Das UL18 des humanen CMV übt nach Reyburn *et al.* (1997) eine ähnlich inhibierende Wirkung auf NK-Zellen aus, wie das m144. Somit besteht eine einfache Alternative für den menschlichen Organismus. Allerdings gibt es zwischen murinen und humanen Homolog strukturelle Unterschiede. Während das Genprodukt des murinen m144 nur β_2 -

Mikroglobulin bindet (Chapman *et al.* 1998, Natarajan *et al.* 2006), bindet das humane Äquivalent UL18 sowohl β_2 -Mikroglobulin als auch endogene Peptide (Browne *et al.* 1990; Fahnestock *et al.* 1995). Inwieweit sich daraus funktionelle Unterschiede ergeben ist noch unklar.

Wenn es durch den in Rahmen dieser Arbeit erzeugten Vektor möglich ist, eine signifikant verlängerte Luciferaseexpression in der Leber von infizierten Mäusen zu etablieren, wird der nächste Schritt ein Austausch des Markergens Luciferase gegen ein therapeutisches Gen sein. Denkbar wäre ein Modell zur Therapie des α 1-Antitrypsinmangels. A1-Antitrypsin (394 Aminosäuren), das zu den sogenannten Akute-Phase-Proteinen gehört, wird hauptsächlich von Hepatozyten und in geringerem Maße von Monozyten und Neutrophilen gebildet. Der Mangel an diesem Protein führt zu einer fehlenden Inhibition der körpereigenen Proteasen, welche sich dann gegen körpereigene Strukturproteine wenden, dabei in der Lunge die postmitotischen Alveolarzellen zerstören und zum Lungenemphysem führen (Löffler *et al.* 1998, S. 911f). Die gentherapeutische Therapie dieser monogenetischen Erkrankung mit Hilfe von adenoviralen Vektoren bietet sich an, da Adenoviren nach systemischer Applikation in erster Linie Hepatozyten infizieren. Des Weiteren steht ein Tiermodell in der Maus für diese Erkrankung zur Verfügung (Kushi *et al.* 2004).

6. Zusammenfassung

Die Dauer adenoviraler Transgenexpression zu gentherapeutischen Zwecken ist bis jetzt zeitlich durch die Tatsache limitiert, dass die transfizierten Zellen dem Immunsystem auffällig und durch dieses eliminiert werden. Durch die MHC-I-gebundene Präsentation der adenoviralen Proteine wird die NK-Zell und T-Zell vermittelte Lyse der infizierten Zellen eingeleitet. So ist die Expression von Transgenen in transfizierten Zellen auf die Dauer weniger Wochen begrenzt.

Durch Expression des m144, einem Gen aus dem murinen Cytomegalie-Virus, soll die vorzeitige Lyse der transfizierten Zellen verzögert, bzw. verhindert werden. Das membranständige Genprodukt inhibiert die Cytokinproduktion von NK-Zellen analog einem MHC-I-Komplex. So wird die Immunantwort in ihrer initialen Phase inhibiert. Es wurden die ORFs des Markerenzym Luciferase und des m144 unter Verbindung einer IRES in die Expressionskassette eines adenoviralen Plasmids kloniert, die Genexpression stand unter der Kontrolle durch den CMV-Promotor. Durch Co-Präzipitation des Plasmids mit dem restlichen E1/E3-deletierten adenoviralen Genom und Transfektion in die stabil E1-transfizierte Zelllinie nach Graham *et al.* (1995) konnte das Virus Ad.CMV-lucIRESm144 generiert werden. Nach Amplifikation und Aufreinigung konnte zur Charakterisierung dieses Viruskonstruktes die Expression des Markergens im Lysat von Ad.CMV-lucIRESm144 infizierten HepG2-Zellen durch einen Luciferase-Assay *in vitro* nachgewiesen werden.

In vivo konnte nach systemischer Applikation der Adenoviren in immunkompetente Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten signifikante Aktivität von Luciferase aus dem Lebergewebe nachgewiesen werden. Der Nachweis des immunmodulatorischen Glykoproteins des MCMV gelang nur gentypisch durch PCR-Amplifikation und anschließender Sequenzierung.

Mit dem generierten Adenovirus lässt sich in nachfolgenden Experimenten klären, ob sich durch die Expression des m144 in adenoviralen Vektoren eine Persistenz der Transgenexpression *in vivo* erreichen lässt.

7. Literaturverzeichnis

Barr, D., J. Tubb, et al. (1995). "Strain related variations in adenovirally mediated transgene expression from mouse hepatocytes in vivo: comparisons between immunocompetent and immunodeficient inbred strains." Gene Ther **2**(2): 151-5.

Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, et al. (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." Science **275**(5304): 1320-3.

Berger, C., S. Xuereb, et al. (2000). "Expression of herpes simplex virus ICP47 and human cytomegalovirus US11 prevents recognition of transgene products by CD8(+) cytotoxic T lymphocytes." J Virol **74**(10): 4465-73.

Bett, A. J., W. Haddara, et al. (1994). "An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8802-6.

Bett, A. J., L. Prevec, et al. (1993). "Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors." J Virol **67**(10): 5911-21.

Block, A., E. Windler, et al. (1997). "[Adenovirus gene therapy for liver metastases of gastrointestinal tumors. Development status and future perspectives]." Dtsch Med Wochenschr **122**(22): 728-32.

Bronstein, I., J. Fortin, et al. (1994). "Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays." Anal Biochem **219**(2): 169-81.

Browne, H., G. Smith, et al. (1990). "A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and beta 2 microglobulin." Nature **347**(6295): 770-2.

Chapman, T. L. and P. J. Bjorkman (1998). "Characterization of a murine cytomegalovirus class I major histocompatibility complex (MHC) homolog: comparison to MHC molecules and to the human cytomegalovirus MHC homolog." J Virol **72**(1): 460-6.

Chroboczek, J., R. W. Ruigrok, et al. (1995). "Adenovirus fiber." Curr Top Microbiol Immunol **199 (Pt 1)**: 163-200.

Craighead, J. E., W. B. Martin, et al. (1992). "Role of CD4+ (helper) T cells in the pathogenesis of murine cytomegalovirus myocarditis." Lab Invest **66**(6): 755-61.

Cretney, E., M. A. Degli-Esposti, et al. (1999). "m144, a murine cytomegalovirus (MCMV)-encoded major histocompatibility complex class I homologue, confers tumor resistance to natural killer cell-mediated rejection." J Exp Med **190**(3): 435-44.

Croyle, M. A., N. Chirmule, et al. (2001). "'Stealth' adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung." J Virol **75**(10): 4792-801.

Davidson, B. L., E. D. Allen, et al. (1993). "A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector." Nat Genet **3**(3): 219-23.

de Wet, J. R., K. V. Wood, et al. (1985). "Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7870-3.

DeMatteo, R. P., J. F. Markmann, et al. (1996). "Prolongation of adenoviral transgene expression in mouse liver by T lymphocyte subset depletion." Gene Ther **3**(1): 4-12.

Dirks, W., M. Wirth, et al. (1993). "Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells." Gene **128**(2): 247-9.

Duncan, S. J., F. C. Gordon, et al. (1978). "Infection of mouse liver by human adenovirus type 5." J Gen Virol **40**(1): 45-61.

Fahnestock, M. L., J. L. Johnson, et al. (1995). "The MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides." Immunity **3**(5): 583-90.

Fang, J., J. J. Qian, et al. (2005). "Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide." Nat Biotechnol **23**(5): 584-90.

Farrell, H. E., M. A. Degli-Esposti, et al. (1999). "Cytomegalovirus evasion of natural killer cell responses." Immunol Rev **168**: 187-97.

Farrell, H. E., H. Vally, et al. (1997). "Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo." Nature **386**(6624): 510-4.

Ferry, N. and J. M. Heard (1998). "Liver-directed gene transfer vectors." Hum Gene Ther **9**(14): 1975-81.

Fleming, P., N. Davis-Poynter, et al. (1999). "The murine cytomegalovirus chemokine homolog, m131/129, is a determinant of viral pathogenicity." J Virol **73**(8): 6800-9.

Glasel, J. A. (1995). "Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios." Biotechniques **18**(1): 62-3.

Graham, F. L. and L. Prevec (1995). "Methods for construction of adenovirus vectors." Mol Biotechnol **3**(3): 207-20.

Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.

Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology **52**(2): 456-67.

Greber, U. F., P. Webster, et al. (1996). "The role of the adenovirus protease on virus entry into cells." Embo J **15**(8): 1766-77.

Hardy, S., M. Kitamura, et al. (1997). "Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination." J Virol **71**(3): 1842-9.

Hartl, B., T. Zeller, et al. (2008). "Adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein can promote cell transformation by a mechanism independent from blocking p53-activated transcription." Oncogene **27**(26): 3673-84.

Hearing, P., R. J. Samulski, et al. (1987). "Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome." J Virol **61**(8): 2555-8.

Hengel, H., W. Brune, et al. (1998). "Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist." Trends Microbiol **6**(5): 190-7.

Karre, K., H. G. Ljunggren, et al. (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-8.

Kay, M. A., A. X. Holterman, et al. (1995). "Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4Ig administration." Nat Genet **11**(2): 191-7.

Kay, M. A., L. Meuse, et al. (1997). "Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody and CTLA4Ig enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4686-91.

Kayser, F. H., K. A. Bienz, et al. (1998). Medizinische Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart New York.

Kreppel, F. and S. Kochanek (2008). "Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: a scientific review and technical guide." Mol Ther **16**(1): 16-29.

Kubota, A., S. Kubota, et al. (1999). "Inhibition of NK cells by murine CMV-encoded class I MHC homologue m144." Cell Immunol **191**(2): 145-51.

Kushi, A., K. Akiyama, et al. (2004). "Disruption of the murine alpha1-antitrypsin/PI2 gene." Exp Anim **53**(5): 437-43.

Lanier, L. L., B. Corliss, et al. (1997). "Arousal and inhibition of human NK cells." Immunol Rev **155**: 145-54.

Liu, Z. X., S. Govindarajan, et al. (2000). "NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection." J Immunol **164**(12): 6480-6.

Löffler, G. and P. Petrides (1998). Biochemie und Pathobiochemie. Berlin Heidelberg New York, Springer.

Mathias, P., M. Galleno, et al. (1998). "Interactions of soluble recombinant integrin alpha5 beta1 with human adenoviruses." J Virol **72**(11): 8669-75.

Michou, A. I., L. Santoro, et al. (1997). "Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression." Gene Ther **4**(5): 473-82.

Natarajan, K., A. Hicks, et al. (2006). "Crystal structure of the murine cytomegalovirus MHC-I homolog m144." J Mol Biol **358**(1): 157-71.

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

Olthoff, K. M., X. Da Chen, et al. (1997). "Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4lg to liver allografts results in prolonged survival and local T-cell anergy." Transplant Proc **29**(1-2): 1030-1.

Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, et al. (1996). "Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus." J Virol **70**(12): 8833-49.

Rees, S., J. Coote, et al. (1996). "Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein." Biotechniques **20**(1): 102-4, 106, 108-10.

Reyburn, H. T., O. Mandelboim, et al. (1997). "The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells." Nature **386**(6624): 514-7.

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

Rowe, W. P., R. J. Huebner, et al. (1953). "Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture." Proc Soc Exp Biol Med **84**(3): 570-3.

Russell, W. C. (2000). "Update on adenovirus and its vectors." J Gen Virol **81**(Pt 11): 2573-604.

Ruzek, M. C., B. F. Kavanagh, et al. (2002). "Adenoviral vectors stimulate murine natural killer cell responses and demonstrate antitumor activities in the absence of transgene expression." Mol Ther **5**(2): 115-24.

Saederup, N. and E. S. Mocarski, Jr. (2002). "Fatal attraction: cytomegalovirus-encoded chemokine homologs." Curr Top Microbiol Immunol **269**: 235-56.

Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.

Schmid, S. I. and P. Hearing (1998). "Cellular components interact with adenovirus type 5 minimal DNA packaging domains." J Virol **72**(8): 6339-47.

Schowalter, D. B., J. C. Tubb, et al. (1997). "Heterologous expression of adenovirus E3-gp19K in an E1a-deleted adenovirus vector inhibits MHC I expression in vitro, but does not prolong transgene expression in vivo." Gene Ther **4**(4): 351-60.

Stewart, P. L., S. D. Fuller, et al. (1993). "Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy." Embo J **12**(7): 2589-99.

Tomko, R. P., C. B. Johansson, et al. (2000). "Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob." Exp Cell Res **255**(1): 47-55.

Wiertz, E. J., T. R. Jones, et al. (1996). "The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol." Cell **84**(5): 769-79.

Wulff, H., T. Krieger, et al. (2007). "Cloning and characterization of an adenoviral vector for highly efficient and doxycycline-suppressible expression of bioactive human single-chain interleukin 12 in colon cancer." BMC Biotechnol **7**: 35.

Yang, Y., H. C. Ertl, et al. (1994). "MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses." Immunity **1**(5): 433-42.

Yang, Y., F. A. Nunes, et al. (1994). "Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4407-11.

Yang, Y. and J. M. Wilson (1995). "Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo." J Immunol **155**(5): 2564-70.

Zou, L., H. Zhou, et al. (2000). "Prolonged transgene expression mediated by a helper-dependent adenoviral vector (hdAd) in the central nervous system." Mol Ther **2**(2): 105-13.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Virale Vektoren in der Gentherapie	3
Abbildung 1: Struktur eines Adenovirus	5
Tabelle 2: Adenovirale Vektoren in der Gentherapie.....	8
Abbildung 2: Generierung von adenoviralen Vektoren.....	10
Abbildung 3: Kontrollverdau pcDNA3m144 mit Xba I.....	41
Abbildung 4: Plasmidkarte pIRESm144	42
Abbildung 5: Kontrollverdau pIRESm144.....	42
Abbildung 6: Kontrollverdau pBS-luc Xba1 Sac1	43
Abbildung 7: Plasmidkarte plucIRESm144.....	43
Abbildung 8: Kontrollverdau plucIRESm144	44
Abbildung 9: Plasmidkarte pAd.CMV-lucIRESm 144	44
Abbildung 10: Kontrollverdau pAd.CMV-lucIRESm144.....	45
Abbildung 11: Adenovirale Plaques	46
Tabelle 3: Titration von Ad.CMV-lucIRESm144 und Ad.CMV-luc	47
Abbildung 12: Luciferase-Assay in HepG2.....	48
Abbildung 13: Sequenzierung der Schnittstellen der ORF m144	49
Abbildung 14: Luciferase-Assay <i>in vivo</i>	50

9.

9. Abkürzungsverzeichnis

#	Artikelnummer
°C	Grad Celsius
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AIDS	Acquired immune deficiency Syndrome; erworbene Immunschwäche
Amp(-R)	Ampicillin(-Resistenz)
β-Gal	Beta-Galactosidase
Bö II /VII	Böhringer molekular weight marker II / VII
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
c	zenti
CCLR	cell cuilture lysis reagent
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalivirus
CPE	cytopathischer Effekt
CTL	Cytotoxischer T-Lymphozyt
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DANN	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales Rinderserum
g	Gramm
h	Stunde
HeBS	HEPES Buffered Saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGDMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium with high Glucose
Ig	Immunglobulin
IFN-μ	Interferon-Gamma
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
ITR	Inverted terminal repeat
Kb	Kilobasen

λ	Wellenlänge
l	Liter
LB	(LB-Medium) Lauria-Bertani-Medium
luc	Luciferase
m	milli
M	Molar
μ	mikro
m.o.i.	multiplicity of infection
MEM	Modified Eagle Medium
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplexe)
min.	Minute
n	nano
N	Normal
NK	(NK-Zellen) Natürliche Killer-Zellen
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
P	piko
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pfu	Plaque forming units
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units (Einheiten)
rpm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/w	Volumen/Gewicht
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktopyramin

10. Danksagung

Ich danke PD. Dr. Andreas Block für die Aufgabenstellung und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Er begleitete die Arbeit und war immer ein Ansprechpartner für Fragen und Problemlösungen. Er stand mir stets mit Lob und konstruktiver Kritik bei und verstand es immer wieder meine Motivation zu stärken.

Des Weiteren danke ich Dr. Peter Schäfer aus der Mikrobiologie für die Mitentwicklung der Idee zu dieser Arbeit und für die konstruktive Unterstützung der Arbeit. Ebenso gilt Professor Dr. Hans-Jörg Schäfer aus dem Institut für Pathologie Dank für Unterstützung der Arbeit.

Für die sehr angenehme und entspannte Arbeitsatmosphäre danke ich der Arbeitsgruppe. Man fand immer Ansprechpartner für Problemlösungen und fühlte sich gut aufgehoben. Namentlich zu nennen sind: Florian Puls, Holger Wulff, Dragan Milasinovic, Iring Ellebrecht, Dana Igelmann, Susann Starke, Philipp Breuch und Seda Cinar. Doris Pankoke danke ich für ihre Unterstützung und die Verbreitung von entspannter Atmosphäre. Insbesondere Dank gilt Henning Lange für die Fortsetzung der Aufgabenstellung und die Überlassung seiner Daten.

Ebenso gilt Jürgen Müller besonderer Dank, da er die Arbeit mit Rat und Tat stets auch zu allen möglichen und unmöglichen Zeiten unterstützt hat.

Meiner Nina danke ich für ihre Unterstützung in allen Dingen...

Auch meiner Mutter möchte ich für Ihre Unterstützung und Ermöglichung meines Studiums und dieser Arbeit danken.

Des Weiteren gilt besonderer Dank meinem Vater, der stets mit großem Nachdruck die Fortsetzung dieser Arbeit unterstützt hat und die glücklicherweise vor seinem Tod die erste Fassung noch Korrekturlesen konnte. Diese Arbeit ist ihm gewidmet.

11. Lebenslauf

Name:

Henning Ortlepp

Geburtsdatum:

20.04.1977 in Pinneberg

Schulbildung:

Bis zum 15. Mai 1996 Gymnasium Blankenese in Hamburg, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst:

02.09.96 bis 30.09.97 als Pflegekraft auf einer gastroenterologischen Station des Krankenhaus Rissen in Hamburg

Studium der Humanmedizin:

1.4.1998– 3.11.2004 am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg

Erwerb der Approbation als Arzt mit dem 3. Staastexamen am 3.11.2004

Promotionsarbeit:

Seit Juni 2000 im Labor für Gentherapie bei Dr. Andreas Block und Dr. Peter Schäfer im Unversitätsklinikum Hamburg- Eppendorf: „Verlängerte Genexpression adenoviraler Vektoren durch MHC I Homologa

Bisherige Arbeitsverhältnisse:

15.01.2005-31.03.2009 Assitenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für die gesamte Innere Medizin in der medizinischen Klinik des St. Josef-Stift Delmenhorst, Chefarzt Dr. W. Pape.

Seit dem 15.05.2009 Assitenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für die gesamte Innere Medizin in der medizinischen Klinik I, Gastroenterologie des evangelischen Diakonie-Krankenhaus Bremen, Chefarzt Professor Dr. Martin Katschinski

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

Bremen, den