

E. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie und der Biochemie entstanden die Techniken wie Amplifikation, Ligation, Transfektion und Expression, mit denen in der vorliegenden Arbeit ein Protein aus dem Adenovirus Typ 2 isoliert und in *E.coli*-Zellen exprimiert werden sollte. Adenoviren stellen eine gute Voraussetzung für den Transfer von Genen dar. Sie haben ein sehr breites Wirtsspektrum und sie benötigen keine sich replizierenden Zellen. Nachteile ergeben sich durch die Tatsache, daß das Virusgenom nicht stabil in das Wirtsgenom integriert wird, und somit die Expressionszeit durch Elimination der Virus-DNA nach einigen Zellzyklen beschränkt ist; ein weiteres Problem ergibt sich bei wiederholter Anwendung durch Bildung von Antikörpern gegen die Adenoviren. Ziel dieser Arbeit war es zum einen, die oben genannten Probleme bei der Verwendung von adenoviralen Vektoren dadurch zu umgehen, daß nicht das gesamte Virus, sondern nur ein Protein als Vektor dient. Zum anderen, dieses Protein nicht auf herkömmlichen Wege durch Züchtung großer Viruskulturen und Herausschneiden des Proteins aus denselben zu isolieren, sondern es sollte versucht werden, die für das gesuchte Protein kodierende Sequenz mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion zu amplifizieren, das Produkt mit einem vorbereiteten Vektor zu ligieren, dies wiederum in *E.coli*-Zellen zu transfizieren und so das Protein zu exprimieren. Dieses adenovirale Protein faßt die Vorzüge des adenoviralen Vektorsystems zusammen, während die Nachteile ausgeklammert werden. Es handelt sich bei diesem um das Protein VII, einem sog. Kernprotein, mit einem Molekulargewicht von ca. 18.500 Dalton und einem hohen Gehalt an Arginin (ca. 23 %) und Alanin (ca. 20 %). Dieses Protein liegt gebunden an DNA im Nukleokapsid. Aufgrund seines Aufbaus, hat das Protein VII die Möglichkeit DNA zu binden; außerdem konnte gezeigt werden, daß es die Zielzelle finden und penetrieren kann. Demgegenüber besteht bei einem Gentransfer mit diesem Protein nicht die Gefahr einer Immunreaktion und sie besitzen eine größere Stabilität, was der Expressionszeit zu gute kommt.

Bei der Expression bzw. Amplifikation ergaben sich verschiedene Schwierigkeiten. Erstens konnte nur eine geringe Menge der DNA-Sequenz amplifiziert werden; es kam immer wieder zu Störungen bei der Polymerase-Kettenreaktion in den verschiedenen Phasen des Experimentes. Zweitens ergab sich, daß durch die Klonierung der Proteinsequenz in den vorbereiteten Vektor eine Punktmutation im Bereich des Leserahmens entstanden war. Aufgrund der Probleme bei der Polymerase-Kettenreaktion konnte die Klonierung leider nicht reproduziert werden. Die Expressionsversuche in den *E.coli*-Zellen waren ebenfalls negativ, was zum einen auf die Mutation, als auch auf generelle Schwierigkeiten bei Expressionen wie die Codonnutzung, der hohen Bindungskraft der DNA-Stränge und den daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der Polymerase-Kettenreaktion zurückzuführen ist.

Es ist also leider nicht gelungen, die für das Protein VII kodierende DNA mit Hilfe von Kassettenvektoren und Expressionszellen zu klonieren. Nichtsdestoweniger muß

die Forschung der Gentherapie dieses Protein im Auge behalten. Nicht nur, daß es viele Vorteile gegenüber den bisher verwendeten Gentransfermodellen hat, es birgt auch weniger Gefahren für den Empfänger, d.h. den zu behandelnden Patienten, da keine Gefahr für Pathogenität geschweige denn Onkogenität besteht. Es berücksichtigt somit alle wichtigen Aspekte der modernen Gentherapie: Effektivität, im Sinne von Quantität und Qualität, Sicherheit und den ethischen Anspruch unserer Gesellschaft.