

**Strategien zur Langzeitexpression von
Transgenen in ruhenden und
proliferierenden Geweben vermittelt
durch adenovirale Vektoren mit hoher
DNA-Kapazität**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

FLORIAN KREPPEL
aus München

2003

1. Berichterstatter: PD Dr. Stefan Kochanek
 2. Berichterstatter: Prof.Dr. Jonathan Howard
- Vorsitzender: Prof. Dr. Mats Paulsson

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 12.02.2003

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt

- Herrn PD Dr. Stefan Kochanek, der mir diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht und mich fortwährend intensiv unterstützt hat,
- Herrn Prof.Dr. Jonathan Howard für die bereitwillige Begutachtung der Dissertationsschrift,
- Herrn Prof.Dr. Ulrich Schraermeyer und Dr. Thomas Luther für die fruchtbare Zusammenarbeit,
- Frau Renate Schaefer für die freundliche Bereitstellung des Durchfluscytometers,
- Frau Dr. Gudrun Schiedner für ihre große Diskussionsbereitschaft und die Teilhabe an ihrem Erfahrungsschatz,
- Frau Sabine Hertel und Frau Marion Johnston für ihre tatkräftige Unterstützung,
- Frau Elke Hammer für das geduldige Lektorat und die große Unterstützung außerhalb des Labors,
- sowie dem Boehringer-Ingelheim-Fonds für die ideelle und finanzielle Unterstützung und ein spannendes Seminar in Blaubeuren,
- und schließlich auch meinen Eltern.

Häufig verwendete Abkürzungen

Ad5	humanes Adenovirus Serotyp 5
APS	Ammoniumpersulfat
CIP	„calf intestine phosphatase“ (alkalische Kälberdarm-Phosphatase)
CMV	Cytomegalovirus „immediate early“ Promotor
CPE	cytopathischer Effekt
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DS	„dyad symmetry element“ Element des EBV-oriP
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EBNA-1	„Epstein-Barr virus nuclear antigen 1“
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendinitrioloessigsäure
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“ (modifiziertes, grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>)
FCS	„fetal calf serum“ (fötales Kälberserum)
FR	„family of repeats“ Element des EBV-oriP
HC-Ad-Vektor	adenoviraler Vektor mit hoher DNA-Kapazität
i.u./i.p.	„infectious units/particles“ (infektiöse Partikel)
MOI	„multiplicity of infection“ (hier: Zahl infektiöser Partikel/Zelle)
oriP	Replikationsursprung aus EBV
pfu	„plaque-forming units“ (Plaque-bildende Einheiten)
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
TBS	Tris-gepufferte Saline, synonym mit Tris-Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Gentransfer und Gentherapie	9
1.2	Adenoviren	10
1.2.1	Die Struktur des Adenovirus	10
1.2.2	Die genomische Organisation des Adenovirus	10
1.3	Adenoviren als Gentransfervektoren	11
1.3.1	Voraussetzungen	11
1.3.2	Erst- und Zweitgenerationsvektoren	11
1.3.3	Adenovirale Vektoren mit hoher DNA-Kapazität	13
1.4	Teil I - Titration von HC-Ad-Vektoren	15
1.4.1	Die zu bestimmenden Parameter und die Notwendigkeit ihrer Bestimmung	15
1.4.2	Bestimmung des infektiösen Titers	15
1.4.3	Bestimmung der Gesamtpartikelzahl	16
1.4.4	Bestimmung der Helferviruskontamination	16
1.4.5	Entwicklung eines Assays zur vollständigen Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen	16
1.5	Teil II - Stabile Transgenexpression über lange Zeiträume in ruhendem Gewebe - das retinale Pigmentepithel als Paradigma	17
1.5.1	Das retinale Pigmentepithel und die altersabhängige Makuladegeneration	17
1.5.2	Gentransfervektoren als alternative Therapieform	17
1.5.3	Evaluierung der Eignung von HC-Ad-Vektoren zur Vermittlung dauerhafter Transgenexpression im RPE	18
1.6	Teil III - Konstruktion eines HC-Ad-Vektorsystems zur stabilen Transgenexpression in proliferierenden Geweben	18
1.6.1	Allgemeine Problematik	18
1.6.2	Integrierende Hybridvektoren	19
1.6.3	Episomal replizierende HC-Ad-Vektoren	20
2	Zielsetzung	25

3	Material und Methoden	27
3.1	Materialien und Geräte	27
3.1.1	Materialien	27
3.1.2	Geräte	27
3.2	Arbeiten mit Bakterienkulturen	28
3.2.1	Flüssigkulturen von <i>E.coli</i>	28
3.2.2	Festkulturen von <i>E.coli</i>	28
3.2.3	Transformation von <i>E.coli</i>	28
3.2.4	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	29
3.3	Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren	30
3.3.1	Aufbewahrung von DNA-Lösungen	30
3.3.2	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	30
3.3.3	Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen	30
3.3.4	Restriktionsverdau von DNA	31
3.3.5	Phenolextraktion von DNA-Lösungen	31
3.3.6	Agarosegelelektrophorese von DNA	32
3.3.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	32
3.3.8	Erzeugung glatter Enden aus 5'-Überhängen	33
3.3.9	Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten	33
3.3.10	Ligationen	33
3.3.11	DNA-Sequenzierung	34
3.3.12	Polymerase-Kettenreaktion	34
3.3.13	Southern-Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	35
3.3.14	Detektion immobilisierter Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	35
3.4	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	36
3.4.1	Zellkulturmedien	36
3.4.2	Kultivierung eukaryotischer Zellen	37
3.4.3	Gefrierkulturen eukaryotischer Zellen	37
3.4.4	Transfektion eukaryotischer Zellen	38
3.4.5	Präparation von DNA aus eukaryotischen Zellen	38
3.4.6	Durchflusscytometrie mit eukaryotischen Zellen	38
3.4.7	Nachweis von β -Galactosidase in Zellen	39
3.5	Arbeiten mit adenoviralen Vektoren	39
3.5.1	Verwendete Produktionszelllinien	39
3.5.2	Aufbewahrung von Adenovirus	39
3.5.3	Infektion eukaryotischer Zellen mit Adenovirus	39
3.5.4	Erzeugung von Rohlysaten aus infizierten Produktionszellen	40
3.5.5	Erzeugung von Helferviren	40
3.5.6	Dichtegradientenzentrifugation von Rohlysaten	40
3.5.7	Entsalzung der Viren nach Dichtegradientenzentrifugation	41
3.5.8	Erzeugung von HC-Ad-Vektoren in seriellen Amplifikationen	41

Inhaltsverzeichnis

3.5.9	Erzeugung von HC-Ad-Vektoren mit hohem Titer	42
3.5.10	Präparation von DNA aus gereinigten Adenoviren	42
3.5.11	Plaque-Assay zur Titerbestimmung von Erstgenerationsvektoren	43
3.5.12	Titrierung von HC-Ad-Vektoren	43
3.6	Arbeiten mit Proteinen	44
3.6.1	Totalproteinpräparation aus Zellen	44
3.6.2	SDS-PAGE	45
3.6.3	Western-Transfer auf Nitrocellulosemembranen	45
3.6.4	Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrocellulosemembranen	46
3.7	Tierexperimentelle und immunhistologische Arbeiten	46
3.7.1	Isolierung primärer retinaler Pigmentepithelzellen	46
3.7.2	Subretinale Vektorinjektion	46
3.7.3	Scanning Laser Ophthalmoskopie (SLO)	46
3.7.4	Entnahme transduzierter Augen	47
3.7.5	Anfertigung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie	47
3.7.6	Immunhistochemischer Nachweis von EGFP	47
3.7.7	Immunologische Assays	47
4	Ergebnisse - Teil I	49
4.1	DNA-basierte Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen	49
4.1.1	Bestimmung des infektiösen Titers	49
4.1.2	Vergleich zwischen Reporter-gen-Assays und Slotblot zur Titerbestimmung	56
4.1.3	Bestimmung der Gesamtpartikelzahl	57
4.1.4	Bestimmung der Helferviruskontamination	60
4.1.5	Zusammenfassung für die Entwicklung des Slotblot-Assays	62
5	Diskussion - Teil I	64
5.1	DNA-basierte Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen	64
5.1.1	Bestimmung des infektiösen Titers	64
5.1.2	Vergleich zwischen Reporter-gen-Assays und Slotblot zur Titerbestimmung	65
5.1.3	Bestimmung der Gesamtpartikelzahl mittels Slotblot und Abgrenzung von physikalischen Methoden	66
5.1.4	Bestimmung der Helferviruskontamination	68
6	Ergebnisse - Teil II	70
6.1	Stabile Transgenexpression über lange Zeiträume in ruhendem Gewebe - das retinale Pigmentepithel als Paradigma	70
6.1.1	Konstruktion eines geeigneten Vektors	70
6.1.2	Transduktion von RPE-Zellen mit HC-AdFK7	71

Inhaltsverzeichnis

6.1.3	Dosisabhängige Transduktionseffizienz <i>in vivo</i>	71
6.1.4	Nachweis der Spezifität der Fluoreszenz	72
6.1.5	Nachweis der Langzeitexpression von <i>EGFP</i> mittels Fluoreszenz- mikroskopie in Flatmounts	72
6.1.6	Nachweis der Langzeitexpression von <i>EGFP</i> mittels Scanning Laser Ophthalmoskopie am lebenden Tier	74
6.1.7	Histologische Analyse der Integrität des Gewebes	75
6.1.8	Immunologische Analyse	76
6.1.9	Zusammenfassung für die HC-Ad-vermittelte Langzeitexpression im RPE	78
7	Diskussion - Teil II	79
7.1	Stabile Transgenexpression über lange Zeiträume in ruhendem Gewebe - das retinale Pigmentepithel als Paradigma	79
7.1.1	Langzeitexpression im RPE	79
7.1.2	Möglichkeiten zur Expression therapeutisch wirksamer Gene im RPE	80
8	Ergebnisse - Teil III	82
8.1	Konstruktion eines HC-Ad-Vektorsystems zur stabilen Transgenexpressi- on in proliferierenden Geweben	82
8.1.1	Rekombinase-vermittelte Zirkularisierung von HC-Ad-Vektoren . . .	82
8.1.2	Replizierende HC-Ad-Vektoren unter Selektionsbedingungen	91
8.1.3	Replikation von HC-Ad-Vektoren ohne Selektion	97
8.1.4	Modell zur mathematischen Beschreibung der Erhaltungs-Effizienz	117
8.1.5	Molekulare Analyse der Erhaltungsform von HC-AdSVEBNAw . .	122
8.2	Zusammenfassung	127
9	Diskussion - Teil III	129
9.1	Konstruktion eines HC-Ad-Vektorsystems zur stabilen Transgenexpressi- on in proliferierenden Geweben	129
9.1.1	Rekombinase-vermittelte Zirkularisierung von HC-Ad-Vektorgenom- en	129
9.1.2	Replizierende HC-Ad-Vektoren unter Selektionsbedingungen	129
9.1.3	Replikation von HC-Ad-Vektoren ohne Selektion	131
9.1.4	Modell zur mathematischen Beschreibung der Erhaltungseffizienz .	132
9.1.5	Molekulare Analyse der Erhaltungsform von HC-AdSVEBNAw . .	133
10	Zusammenfassung	136
11	Abstract	138

1 Einleitung

1.1 Gentransfer und Gentherapie

Somatische Gentherapie hat das Ziel, Erkrankungen durch das Einbringen neuen genetischen Materials in Körperzellen zu behandeln [1]. Dahinter steht im einfachsten Falle die Idee, dass die Funktion eines defekten Gens als Ursache für eine bestimmte Erkrankung durch Hinzufügen des gesunden, wildtypischen Allels wieder hergestellt werden kann. Darüber hinaus kann das eingebrachte genetische Material auch zur Zerstörung von Tumorzellen, zum Auslösen einer Immunreaktion gegen bestimmte Zellen oder zum Schutz vor Pathogenen eingesetzt werden. Schließlich ermöglicht der Transfer genetischen Materials in Körperzellen auch eine Markierung dieser Zellen, die zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden kann.

Das Einbringen genetischen Materials in Körperzellen erfordert sogenannte Vektoren. Dies sind Transportvehikel, die das genetische Material in Form von DNA oder RNA auf physikalischem, chemischem oder biologischem Weg in die Zielzellen einschleusen.

Um genetisches Material auf biologischem Weg in Zellen einzubringen, sind sogenannte virale Vektoren besonders geeignet. Diese viralen Vektoren basieren in der Regel auf rekombinanten Viren unterschiedlichen Typs und werden von allen Systemen bislang mit Abstand am häufigsten zu Gentransferzwecken eingesetzt. Unter den viralen Vektoren sind besonders die retro-, adeno- und adeno-assoziierten viralen Systeme hervorzuheben [2].

Der Einsatz von Gentransfervektoren ist derzeit noch mit einer Reihe von Problemen verbunden. So können unerwünschte toxische oder immunogene Nebenwirkungen auftreten. Auch die Persistenz des eingebrachten genetischen Materials in den Zielzellen und seine dauerhafte Wirkung sind nicht immer gewährleistet.

Die vorliegende Arbeit behandelt einen speziellen Typ adenoviraler Vektoren, die sogenannten Vektoren mit hoher DNA-Kapazität (HC-Ad-Vektoren) und gliedert sich in drei Teile.

Im ersten Teil wird zunächst eine Methode zur Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen entwickelt. HC-Ad-Vektorpräparationen bestehen produktionsbedingt aus infektiösen Partikeln, nicht-infektiösen Partikeln und Helferviruspartikeln. Sowohl für die experimentelle Laborarbeit als auch für einen klinischen Einsatz ist die genaue Bestimmung dieser drei Kenngrößen von HC-Ad-Vektorpräparationen unabdingbar. Bislang existieren hierfür aber keine verlässlichen Methoden.

Im zweiten Teil wird die Eignung dieses Vektortyps zur Langzeitexpression im retinalen Pigmentepithel geprüft. Das retinale Pigmentepithel besteht überwiegend aus ruhenden, postmitotischen Zellen und kann von einer Reihe verschiedener Erkrankungen betroffen sein. Gentransfervektoren, die eine langzeitige Expression des in dieses Gewebe eingebrachten genetischen Materials erlauben, könnten zur Entwicklung neuer Therapieformen führen.

Im dritten Teil wird schließlich eine Fortentwicklung des HC-Ad-Vektorsystems vorgenommen, die stabile Transgenexpression auch in proliferierenden Geweben ermöglicht. Da eine Vielzahl therapeutisch relevanter Gewebe eine natürliche Proliferationsrate aufweist, wird hierdurch die Zahl der möglichen Einsatzgebiete für HC-Ad-Vektor-basierte Systeme stark erweitert.

Für das tiefere Verständnis des eingesetzten Vektortyps werden im Folgenden die bevorzugten Eigenschaften adenoviraler Vektoren anhand der Biologie des Adenovirus herausgearbeitet, verschiedene adenovirale Vektorsysteme vorgestellt und verglichen und das Konzept der mit dieser Arbeit geschaffenen Neuentwicklungen beschrieben.

1.2 Adenoviren

1.2.1 Die Struktur des Adenovirus

Das Adenovirus besteht aus einem ikosaedrischen Proteinkapsid mit einem Durchmesser von 70-100 nm. Dieses Kapsid setzt sich primär aus Hexon-, Penton- und Fiberproteinen zusammen und beherbergt ein einzelnes, doppelsträngiges DNA-Molekül mit einer Größe von ungefähr 36000 bp [3]. Das Hexonprotein bildet in Form von 240 Homotrimeren die 20 Flächen des Kapsids. Die Proteine VI, VIII und IX assoziieren mit Hexon und stabilisieren die Kapsidstruktur. Die zwölf Scheitelpunkte des Kapsids bestehen aus Homopentameren des Pentonproteins und je einem Fibertrimer. Die Fibertrimere bilden stangenähnliche Strukturen, die nach außen gerichtet sind. Das DNA-Molekül im Inneren des Kapsids ist um das Histon-ähnliche Protein VII gewickelt. Die 5'-Enden der beiden DNA-Stränge sind kovalent mit dem Terminalen Protein verknüpft.

1.2.2 Die genomische Organisation des Adenovirus

Das doppelsträngige DNA-Genom des Adenovirus wird in 100 gleich große Einheiten, sogenannte „map units“ (mu) eingeteilt. Auf der Basis von Transkriptionsanalysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion wurde das Genom zudem in frühe („early E“) und späte („late L“) Regionen eingeteilt [3]. Diese Einteilung ergibt sich aus dem Zeitpunkt der Expression der einzelnen Regionen des Genoms relativ zum Start der DNA-Replikation. Zu den frühen Genen, die vor dem Start der Replikation exprimiert werden, zählen die vier unabhängigen Regionen des Genoms *E1*, *E2*, *E3*, *E4*. *E1* besteht aus *E1A* und *E1B*. Die Genprodukte der *E1A*-Region sind essenziell für die Expression

aller anderen viralen Gene [3]. Dieses Gen ist das erste, das bereits unmittelbar nach Infektion exprimiert wird. Ungefähr sechs Stunden später startet die Replikation des viralen Genoms und die späten Regionen werden exprimiert. Deren Expression wird im wesentlichen durch den „major late“ Promotor (MLP) gesteuert und liefert die Kapsidkomponenten, die für die Assemblierung von Virionen erforderlich sind [3].

Die Enden des adenoviralen Genoms bestehen aus invertierten Sequenzwiederholungen, den sogenannten ITRs („inverted terminal repeats“). Diese beinhalten den adenoviralen Replikationsursprung. Das jeweilige 5'-Ende der beiden DNA-Stränge ist kovalent mit Terminalem Protein verbunden. Dieses dient während der unidirektionalen Replikation als Primer [3].

An den linken ITR grenzt eine als Verpackungssignal Ψ bezeichnete DNA-Sequenz. Für die Verpackung der Genome in Kapside ist diese Sequenz essenziell [3].

1.3 Adenoviren als Gentransfervektoren

1.3.1 Voraussetzungen

Adenoviren bieten eine Reihe wichtiger Voraussetzungen für den Einsatz als Gentransfervektoren [2][4]. Die Serotypen 2 und 5 sind nahezu vollständig charakterisiert, nicht assoziiert mit schweren Erkrankungen und es ist keine Onkogenität bekannt. Sie infizieren eine große Anzahl ruhender und sich teilender Zellen unterschiedlichen Typs. Exemplarisch sind hier Fibroblasten, Hepatozyten und Neurone zu nennen. Die Infektion erfolgt primär über den sogenannten Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR) und eine Interaktion mit $\alpha_V\beta_3$ - $\alpha_V\beta_5$ -Integrinen der Zelloberfläche [5]. Das lineare, doppelsträngige DNA-Genom liegt nach Infektion episomal vor und integriert nur mit niedrigen Raten ins Genom der Wirtszelle [3]. Schließlich sind die Virionen relativ stabil und das Genom wird nur mit niedrigen Raten rearrangiert, so dass es mit rekombinanten DNA-Techniken leicht zu manipulieren ist.

1.3.2 Erst- und Zweitgenerationsvektoren

Die Idee zur Deletion von Regionen des Adenovirusgenoms, die für die adenovirale Replikation essenziell sind, und der Einsatz von Produktionszellen, die die deletierten Funktionen *in trans* bereitstellen, führte zur Entwicklung der ersten rekombinanten, replikationsdefizienten Gentransfervektoren auf adenoviraler Basis. Da die Genprodukte der *E1*-Region essenziell für die Replikation der Viren sind, wurden zunächst Deletionen der *E1A*- und *E1B*-Region vorgenommen [6]. Mithilfe der 293-Zelllinie konnten aus diesen teildeletierten Genomen replikationsdefiziente adenovirale Vektoren hergestellt werden. Die 293-Zelllinie ist durch Transformation humaner embryonaler Zellen, vermutlich neuronalen Ursprungs [7], mit sonifizierter Adenovirus-DNA entstanden und beinhaltet ein großes Fragment des linken Endes von Ad5. Dieses Fragment besteht aus den linken 11

map units von Ad5, das heißt unter anderem aus dem linken ITR, dem Verpackungssignal und den *E1A*- und *E1B*-Regionen [8][9]. Die für die adenovirale Replikation essenziellen Funktionen können also durch die Zelllinie *in trans* bereitgestellt werden. So lassen sich mit diesen Zellen replikationsdefiziente adenovirale Vektoren in hohem Titer produzieren [6]. Die Deletionen in der *E1*-Region dieses Vektortyps erlauben zudem das Einbringen von Transgenen in das Vektorgenom. Allerdings ist der verfügbare Platz auf ca. 4,5 kB begrenzt. Daher wurden weitere Deletionen im Adenovirusgenom vorgenommen. An erster Stelle sind hier Deletionen in der *E3*-Region zu nennen. Diese Region ist für die Produktion der Vektoren *in vitro* nicht essenziell, so dass Vektoren mit dieser zusätzlichen Deletion ebenfalls in 293-Zellen produziert werden können und eine Aufnahmekapazität von 8 kB für Transgene besitzen [10]. Vektoren mit Deletionen in der *E1*- und *E3*-Region werden als Erstgenerationsvektoren bezeichnet.

Als problematisch hat sich die große Sequenzüberlappung zwischen den in die 293-Zelllinie integrierten Ad5-Sequenzen und den produzierten *E1/E3*-deletierten Vektoren erwiesen. Auf Grund dieser Überlappungen kann es während der Vektorproduktion zu homologer Rekombination zwischen der Vektor-DNA und der chromosomalen DNA der Zelllinie kommen, bei der replikationskompetente Adenoviren entstehen. Diese unerwünschten replikationskompetenten Virionen kontaminieren die Vektorpräparationen und können durch einen Wachstumsvorteil sehr schnell sogar bis zu 100% einer Vektorpräparation ausmachen [11]. Daher wurden verschiedene weitere Produktionszelllinien entwickelt, bei denen es keinen Überlappungsbereich zwischen den Vektorsequenzen und der Zelllinie gibt, so dass die Entstehung replikationskompetenter Viren durch homologe Rekombination ausgeschlossen ist [12][13].

Nach Transduktion mit Erstgenerationsvektoren ist in vielen Zellen eine schwache Expression der auf dem Vektor verbliebenen viralen Gene feststellbar, die trotz der Deletion der *E1*-Region auftritt [14][15]. Die Gründe hierfür sind unklar, wahrscheinlich sind *E1*-ähnliche, zelleigene Funktionen verantwortlich. Die so synthetisierten viralen Proteine üben eine toxische Wirkung auf die betroffenen Zellen aus [16]. Bei Einsatz von Erstgenerationsvektoren *in vivo* kommt es meist zu einem Anstieg der Transgenexpression während der ersten sieben Tage nach Administration des Vektors. Diese Transgenexpression sinkt allerdings nach 2-4 Wochen auf nicht nachweisbare Niveaus ab. Lediglich in einem stark immunprivilegierten Organ wie dem Gehirn, ist Transgenexpression auch über einen längeren Zeitraum zu beobachten [17][18]. In vielen Fällen geht das Absinken der Transgenexpression mit einer starken Infiltration zytotoxischer T-Lymphozyten einher [19][20], so dass davon ausgegangen werden kann, dass die transduzierten Zellen, möglicherweise auf Grund der Expression viraler Proteine, in relativ kurzer Zeit durch das Immunsystem eliminiert werden.

Um die Toxizität und Immunogenität der Vektoren zu reduzieren und eine größere Aufnahmekapazität für Transgene zu schaffen, wurden sogenannte Zweitgenerationsvektoren entwickelt. Diese tragen zusätzlich zu den *E1/E3*-Deletionen weitere Deletionen in der *E2*- oder *E4*-Region und werden in Zelllinien produziert, die diese Regionen trans-

komplementieren [21]. Über die Auswirkungen dieser zusätzlichen Deletionen auf die Immunogenität der Vektoren herrscht bislang keine endgültige Klarheit. In einigen Studien wurde mit diesem Vektortyp aber eine reduzierte Immunogenität und verlängerte Transgenexpression beobachtet [15].

1.3.3 Adenovirale Vektoren mit hoher DNA-Kapazität

Für eine Vielzahl potenzieller gentherapeutischer Anwendungen ist eine lange Expression des eingebrachten Transgens bei gleichzeitig möglichst niedriger Toxizität und Immunogenität der Vektoren unabdingbar. Die Toxizität und Immunogenität adenoviraler Vektoren der ersten und zweiten Generation lassen eine erfolgreiche gentherapeutische Anwendung unwahrscheinlich erscheinen. Ebenso bedeutend ist das Risiko möglicher Interaktionen zwischen adenoviralen Funktionen und den Funktionen anderer Viren, die in den transduzierten Zellen vorhanden sein oder nachträglich erworben werden können [22]. Die Wirkung solcher Interaktionen ist schwer vorhersagbar und es muss davon ausgegangen werden, dass sie ein bedeutendes Risiko darstellen.

Daher wurde konsequent die Weiterentwicklung adenoviraler Vektoren betrieben. Das Ziel war ein Vektor, der keine kodierenden viralen Sequenzen mehr besitzt und somit die Probleme, die sich aus der Expression adenoviraler Funktionen in der Zielzelle ergeben, nicht mehr aufweisen sollte. Die Entwicklung führte über einige Zwischenschritte [23] zu den sogenannten Vektoren mit hoher DNA-Kapazität („High-Capacity adenoviral vectors“, HC-Ad-Vektoren)[22]. Diese HC-Ad-Vektoren besitzen keine kodierenden viralen Gene mehr. Dies ist möglich, da lediglich die ITRs und das Verpackungssignal *in cis* für die Propagation und Verpackung von DNA in adenoviralen Systemen erforderlich sind [24][3]. Die Effizienz der Verpackung solcher DNA-Moleküle ist am höchsten bei Molekülen mit einer Größe von 28-36 kB [25]. Um diese Größe zu erreichen, kann humane, intronische Füll-DNA in die Vektoren eingebaut werden. In der vorliegenden Arbeit werden zu diesem Zweck eine 20 kB große, intronische Region aus dem humanen *HPRT*-Lokus (HUMHPRTB, Map-Positionen 1777-21729) sowie eine 6,5 kB große, intronische Region aus dem C346-Kosmid (HUMDXS455A, Map-Positionen 10205-16750) verwendet.

Das bislang wahrscheinlich effizienteste und in der vorliegenden Arbeit eingesetzte System zur Produktion der Vektoren arbeitet mit einem Helfervirus. Dieses Helfervirus AdLC8cluc ist ein *E1/E3*-deletiertes Adenovirus, das in *E1*-transkomplementierenden Zellen replizieren und die für die Vektorproduktion notwendigen Faktoren *in trans* bereitstellen kann, so dass die oben beschriebenen HC-Ad-Vektormoleküle repliziert und verpackt werden [26]. Um zu verhindern, dass die Helfervirusgenome selbst verpackt werden, ist das Verpackungssignal Ψ des Helfervirusgenomes durch loxP-Rekombinationssequenzen, den Erkennungssequenzen für die cre-Rekombinase des Bakteriophagen PI, flankiert. Die Produktionszellen für die HC-Ad-Vektoren synthetisieren stabil diese Rekombinase, so dass das Verpackungssignal mit hoher Effizienz (99%) aus dem Helfervirusgenom

exzidiert wird und die Genome nicht in Kapside verpackt werden können. Als Produktionszellen dienen in der vorliegenden Arbeit 293-cre66-Zellen, eine 293-basierte Zelllinie, die stabil das Gen für die cre-Rekombinase exprimiert (Schiedner, unpublished). Die Exzision der Verpackungssignale der Helfervirusgenome gelingt nicht zu 100%, so dass mit diesem Produktionssystem immer einige Virionen entstehen, die das Helfervirusgenom tragen. Das Helfervirusgenom ist 36 kB groß. Werden für die Vektoren geringfügig kleinere Genomgrößen gewählt, so besitzen deren Virionen eine geringere Dichte als die Helfervirionen und können von diesen mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt werden. Auf diese Weise kann die Helferviruskontamination in HC-Ad-Vektorpräparation auf bis zu 0,1% reduziert werden.

Ein wesentlicher Vorteil von HC-Ad-Vektoren gegenüber Erst- und Zweitgenerationsvektoren ist die große Aufnahmekapazität für Transgene von bis zu 35 kB. Diese ermöglicht den Einsatz mehrerer Expressionskassetten auf einem Vektor, den Einsatz regulierbarer Systeme zur Transgenexpression oder sogar die Verwendung vollständiger Genloci. Schiedner *et al* (1998) konnten einen Vektor erzeugen, der den vollständigen humanen α_1 -Antitrypsin-Genlocus besitzt [16]. Für diesen Vektor konnte eine gewebsspezifische Regulation der Expression des α_1 -Antitrypsins in Zellkultur und *in vivo* nachgewiesen werden. Nach Schwanzveneninjektion von $2 \cdot 10^{10}$ Virionen dieses Vektors in immunkompetente C57BL/6J-Mäuse konnte eine gewebsspezifische und stabile Expression sogar über mehr als ein Jahr gezeigt werden. Die Anwendung hoher Dosen des Vektors führte zu Serumspiegeln von α_1 -Antitrypsin, die für den Menschen als suprapysiologisch angesehen werden können. Darüber hinaus ist besonders bemerkenswert, dass auch bei hohen Vektordosen keine Leberschäden zu beobachten waren. In Gewebesanalysen konnte auch keine Infiltration cytotoxischer T-Zellen nachgewiesen werden. Die Anwendung gleicher Mengen eines Erstgenerationsvektors, der eine durch den murinen Phosphoglyceratkinasepromotor (PGK) gesteuerte Expressionskassette für die humane α_1 -Antitrypsin cDNA besaß, führte hingegen zu histologisch nachweisbaren Leberschäden und signifikant erhöhten Serumspiegeln von Leberenzymen.

Die verbesserte Expression und stark reduzierte Lebertoxizität wurden in unabhängigen Experimenten mit zwei weiteren HC-Ad-Vektor bestätigt, die eine Expressionskassette für die murine Leptin-cDNA beziehungsweise für die murine Erythropoietin-cDNA trugen [27][28].

Auch im Skelettmuskel und im ZNS konnte in mehreren Studien eine verbesserte und andauernde Transgenexpression bei Einsatz von HC-Ad-Vektoren gezeigt werden [29] [30] [31] [32].

Der erfolgreiche Einsatz eines regulierbaren Systems zur Expression von Transgenen mit einem HC-Ad-Vektor wurde durch Burcin *et al* gezeigt [33].

1.4 Teil I - Titration von HC-Ad-Vektoren

1.4.1 Die zu bestimmenden Parameter und die Notwendigkeit ihrer Bestimmung

Die Dosis, mit der adenovirale Gentransfervektoren in therapeutischen Modellen eingesetzt werden können, wird neben der Suszeptibilität des Zielgewebes im Wesentlichen durch drei Faktoren bestimmt. Erstens ist der Bereich zwischen therapeutisch wirksamen und bereits toxischen Vektordosen sehr schmal [34]. Zweitens ist die prinzipielle Anwendung niedriger Vektordosen auf Grund der Existenz von Schwellenwerteffekten fragwürdig [35]. Drittens führen steigende Dosen adenoviraler Vektoren zu einem nicht-linearen Anstieg der Transgenexpression im Zielgewebe [34][36]. Um also mit der Vektordosis verbundene, unerwartete Ereignisse in klinischen Studien ausschließen zu können, ist die genaue Bestimmung des Titors adenoviraler Vektorpräparationen essenziell.

Da HC-Ad-Vektoren wie beschrieben in *E1*-transformierten Zelllinien in Gegenwart eines *E1*-deletierten Helfervirus produziert und über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt werden, bestehen HC-Ad-Vektorpräparationen aus (1) infektiösen HC-Ad-Vektorpartikeln, (2) nicht-infektiösen HC-Ad-Vektorpartikeln und (3) kontaminierenden Helferviruspartikeln. Eine vollständige Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen für den Einsatz in klinischen Studien muss daher die Bestimmung aller drei Parameter umfassen.

1.4.2 Bestimmung des infektiösen Titors

Der infektiöse Titer von *E1*-deletierten Erstgenerationsvektoren wird üblicherweise mittels Plaque-Assay oder Ermittlung der „tissue culture infective dose“ TCID₅₀ bestimmt [37], wobei man sich die produktive Infektion der Vektoren von *E1*-transformierten Zelllinien zu Nutze macht. Da HC-Ad-Vektoren keine viralen Gene besitzen, sind derartige Assays zur Titerbestimmung nicht möglich. Die Bestimmung des infektiösen Titors erfolgte bislang indirekt über den Einsatz von Reportergenen wie *EGFP* oder *β-gal*. Für die Mehrheit therapeutisch einzusetzender Vektoren ist die Präsenz von Expressionskassetten für Reportergene aber nicht wünschenswert, da von den gebräuchlichsten Reporterproteinen *β-gal* und *EGFP* bekannt ist, dass sie toxisch und immunogen wirken können [38][39][40]. Der infektiöse Titer von HC-Ad-Vektoren, die für sezernierte Proteine wie Erythropoietin oder Interferon α -2 kodieren, wurde bislang bestimmt, indem Zellen mit steigenden Mengen der Vektoren infiziert und anschließend die Menge des sezernierten Proteins (zum Teil in indirekten Assays) bestimmt wurde [41]. Diese Menge wurde dann verglichen mit der Menge Protein, die bei Expression durch einen entsprechenden Erstgenerationsvektor in der gleichen Zelllinie gefunden wurde. Da von dem Erstgenerationsvektor Titer in Form von plaque-forming-units (pfu) bekannt waren, wurde anhand der Proteinmengen auf den infektiösen Titer der HC-Ad-Vektoren rückgerechnet. Tatsächlich ist dieses Verfahren sehr aufwändig und nicht zuletzt auf Grund

unterschiedlicher Expressionskinetiken von HC-Ad- und Erstgenerationsvektoren fehlerträchtig. Darüber hinaus sind derartige funktionelle Assays nicht immer durchführbar. Zur Bestimmung des infektiösen Titers von HC-Ad-Vektorpräparationen existierte zu Beginn dieser Arbeit kein einheitliches und verlässliches Verfahren.

1.4.3 Bestimmung der Gesamtpartikelzahl

Die Bestimmung der Gesamtpartikelzahlen adenoviraler Vektorpräparationen erfolgt in der Regel mit physikalischen Methoden [42]. Hierzu werden die Partikel lysiert und die Absorption der Lysate bei 260 nm gemessen. Mittels verschiedenen, empirisch ermittelten Extinktionskoeffizienten wird dann aus der Absorption die Partikelzahl errechnet. Auf Grund der parallelen Existenz unterschiedlicher Extinktionskoeffizienten und möglicher Schwankungen durch Protein- oder DNA-Kontaminationen der Vektorpräparationen liefert dieses Verfahren allerdings nur schwer standardisierbare Werte [43].

1.4.4 Bestimmung der Helferviruskontamination

Helferviruskontaminationen von HC-Ad-Vektorpräparationen werden üblicherweise mittels Plaque-Assays bestimmt [16]. Hierbei wird eine *E1*-transkomplementierende Zelllinie mit Aliquots der HC-Ad-Vektorpräparation infiziert. Da sich das *E1*-deletierte Helfervirus in diesen Zellen produktiv vermehren kann, kommt es zur Ausbildung von Plaques, deren Zahl vom Anteil der Helferviruspartikel in der Vektorpräparation abhängt. Die Ergebnisse von Plaque-Assays zeigen jedoch schon bei der Titration von Erstgenerationsvektoren starke Schwankungen bei nur minimaler Veränderung der Ausgangsbedingungen und werden als unzuverlässig angesehen [43].

1.4.5 Entwicklung eines Assays zur vollständigen Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen

Die beschriebenen Umstände bedingten das erste Ziel der vorliegenden Arbeit, die Entwicklung eines standardisierbaren, DNA-basierten und Reporter-gen-unabhängigen Verfahrens zur Bestimmung der infektiösen Titer, der Gesamtpartikelzahlen und der Helferviruskontamination von HC-Ad-Vektorpräparationen mit einheitlicher Methodik. Die Entwicklung dieses Verfahrens war eine wesentliche Voraussetzung für die Teile II und III dieser Arbeit, da dort entweder Vektordosis-abhängige Effekte *in vivo* (Teil II) oder der von genauen Kopienzahlen abhängige Vergleich verschiedener HC-Ad-Vektoren *in vitro* (Teil III) durchgeführt werden mussten, aber keine adäquaten Titrationsmethoden zur Verfügung standen.

1.5 Teil II - Stabile Transgenexpression über lange Zeiträume in ruhendem Gewebe - das retinale Pigmentepithel als Paradigma

1.5.1 Das retinale Pigmentepithel und die altersabhängige Makuladegeneration

Das retinale Pigmentepithel (RPE) spielt für den Stoffwechsel von Retinol und bei der Phagozytose von Fotorezeptoren eine wesentliche Rolle. Die ruhenden oder sich nur langsam teilenden Zellen des retinalen Pigmentepithels produzieren eine Reihe trophischer, anti-oxidativer und anti-angiogenetischer Faktoren, die für Integrität und Funktion der Retina von hoher Bedeutung sind [44]. Einige erworbene und erbliche Erkrankungen betreffen das retinale Pigmentepithel. So werden verschiedene Formen der Retinitis pigmentosa durch Mutationen in Genen verursacht, die ausschließlich im RPE exprimiert werden [45][46][47]. Auch bei der Bestschen Krankheit ist das RPE betroffen [48]. Besonders bedeutsam ist die altersabhängige Makuladegeneration (ARMD). Sie ist in Industrieländern die häufigste Ursache für Erblindung im Alter [49] und es existieren keine verlässlichen Therapieformen. Es werden zwei Formen der ARMD unterschieden - die trockene und die feuchte Form. Im Frühstadium der trockenen Form kommt es zunächst zur Ablagerung membranöser Bestandteile in Form sogenannter Drusen unter der Retina. Diese Drusen sind in erster Linie die Konsequenz von Phagozytosedefekten des retinalen Pigmentepithels. Mit fortschreitender Ablagerung der Drusen kommt es zunächst zur Atrophie und schließlich zur Degeneration der Sinneszellen der Makula. Das zentrale Sehen verschlechtert sich erheblich. Die feuchte Form der ARMD ist charakterisiert durch subretinale Gefäßneubildungen, wahrscheinlich als Reaktion auf die Ablagerung der Drusen. Es kann zu Blutungen aus den neu gebildeten Gefäßen kommen, die eine rasche Degeneration der Retina bewirken. Die Therapiemöglichkeiten für die ARMD sind sehr begrenzt. Mittels Laserbehandlung kann versucht werden, die subretinal gebildeten Gefäße zu veröden. Allerdings ist eine regelmäßige Wiederholung der Behandlung notwendig, da die der Krankheit zu Grunde liegenden Ursachen nicht beseitigt werden. Neuere Ansätze beinhalten die autologe, subretinale Transplantation von Zellen des Irispigmentepithels (IPE). IPE-Zellen besitzen denselben embryonalen Ursprung wie RPE-Zellen und sind diesen anatomisch und funktional sehr ähnlich [50][51][52]. Allerdings bringt eine solche Transplantation keinen anhaltenden Therapieerfolg. Dies könnte auf fehlende Expression eines oder mehrerer bislang unbekannter Faktoren zurückzuführen sein, die wichtiger Bestandteil der Funktion eines intakten RPEs sind.

1.5.2 Gentransfervektoren als alternative Therapieform

Die durch Gentransfervektoren vermittelte Expression protektiver Gene könnte einen alternativen Behandlungsansatz für Erkrankungen des RPE wie die ARMD darstellen.

Einer der vielversprechenden protektiven Faktoren ist der „pigment epithelium derived factor“ (PEDF), da er anti-angiogenetische und neurotrophe Wirkung im Auge besitzt [53][54][55]. Der dauerhaft erfolgreiche Einsatz dieses Faktors setzt aber eine dauerhafte Expression durch den verwendeten Gentransfervektor voraus.

1.5.3 Evaluierung der Eignung von HC-Ad-Vektoren zur Vermittlung dauerhafter Transgenexpression im RPE

Es wurde bereits gezeigt, dass Ad5-basierte Erstgenerationsvektoren das RPE selektiv und effizient transduzieren, wenn sie subretinal injiziert werden [56][57]. Aber die Expression von Reportergenen oder therapeutischen Genen im RPE, die durch Erstgenerationsvektoren vermittelt wurde, war nicht stabil. Spätestens zwölf Wochen nach Transduktion konnte keine Transgenexpression mehr festgestellt werden. Dies wurde auf zelluläre Immunreaktionen gegen die Erstgenerationsvektoren oder die exprimierten Transgene interpretiert. Die niedrige Toxizität und Immunogenität von HC-Ad-Vektoren und deren langanhaltende Expression in ruhenden oder sich langsam teilenden Geweben lassen daher diesen Vektortyp ideal für den Gentransfer ins RPE erscheinen.

Das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in einer Evaluierung der Eignung von HC-Ad-Vektoren zur Vermittlung dauerhafter Transgenexpression im RPE, einem Paradigma für postmitotische, ruhende Gewebe, die die Basis für mögliche therapeutische Ansätze darstellt.

1.6 Teil III - Konstruktion eines HC-Ad-Vektorsystems zur stabilen Transgenexpression in proliferierenden Geweben

1.6.1 Allgemeine Problematik

Die durch HC-Ad-Vektoren in Zielzellen eingeschleuste DNA liegt episomal vor. Die Vektorgenome können in den Zielzellen nicht replizieren und gehen daher bei Zellteilungen sukzessive verloren. Eine wiederholte Vektorgabe ist auf Grund der zu erwartenden humoralen Immunantwort gegen die Virionen in den meisten Fällen wahrscheinlich nicht erfolgversprechend.

Tatsächlich besitzen, mit Ausnahme einiger weniger postmitotischer Zellen wie Neuronen oder die Zellen des RPE, die meisten Zelltypen eine natürliche Teilungsrate. Unter diesen gibt es eine Vielzahl von Zellen, die potenzielle Ziele für gentherapeutische Ansätze darstellen. Beispielhaft für Zellen mit einer natürlichen Teilungsrate und charakterisiertem genetischem Defekt sei hier das Lungenepithel genannt. Die zystische Fibrose ist eine genetische Erkrankung, die dieses Gewebe betrifft und mit Gentransfervektoren, die das gesunde *CFTR*-Gen tragen, behandelt werden könnte. Die hohe Teilungsrate

Tabelle 1.1: Beispiele für Gewebe mit einer natürlichen Teilungsrate, die potenzielle Ziele für Gentherapievektoren sind (modifiziert nach [58]).

Zelltyp	Beispiel	potenzielle Anwendung
Differenzierte Zellen mit proliferativer Kapazität	Gefäßendothel	Tumorangiogenese
	T-Zellen	AIDS, Immuntherapie bei Krebs
	Hepatozyten	Hämophilie, Stoffwechselerkrankungen
Regenerierende Gewebe	Blutgefäße nach Operationen	Restenose
Stammzellen	Hämatopoetische Zellen	Adenosin-Deaminase-Defizienz
Neoplastische Zellen	Tumore	Melanom

des erkrankten Lungeneithels würde jedoch zu einem baldigen Verlust der episomalen HC-Ad-Vektorgenome führen. Tabelle 1.1, S. 19 zeigt weitere Beispiele [58].

Die Entwicklung von HC-Ad-Genstransfervektoren, deren Genome in proliferierenden Zellen erhalten blieben, würde einen bedeutenden Fortschritt darstellen und die Zahl der möglichen Anwendungsbereiche für HC-Ad-Vektoren stark erweitern. Daher bestand das dritte Ziel der vorliegenden Arbeit in der Entwicklung eines HC-Ad-Vektorsystems, das die stabile Transgenexpression auch in proliferierenden Geweben ermöglicht. Im Folgenden werden die hierzu gewählten Strategien beschrieben.

1.6.2 Integrierende Hybridvektoren

Eine Möglichkeit, das durch HC-Ad-Vektoren in Zellen eingeschleuste genetische Material auch in proliferierenden Geweben zu erhalten, stellt die Konstruktion adeno-retroviraler Hybridvektoren dar [59]. Derartige Vektoren nutzen retrovirale Integrasen zur stabilen Integration des eingebrachten genetischen Materials in die Chromosomen der Zielzelle. Diese ist allerdings mit einer Vielzahl von Nachteilen verbunden. Die retrovirale Integration erfolgt an zufälligen Orten und erzeugt so in jeder Zelle eine andere insertionelle Mutation. Dadurch kann es zu unerwünschter Aktivierung oder Deaktivierung essenzieller Gene der Zielzelle kommen. Darüber hinaus ist die Expression des integrierten Transgens von Ort und Umgebung der Integrationsstelle abhängig [60][61]. Bislang ist auch über die Immunogenität solcher Hybridvektoren nichts bekannt.

Das hohe Risiko der insertionellen Mutagenese bei Anwendung retroviraler Genstransfervektoren wurde vor kurzem in einer klinischen Studie zur Behandlung von SCID-X1 deutlich [62]. SCID-X1 ist eine erbliche Krankheit, bei der es zu einer Blockade der Diffe-

renzierung von T- und NK-Zellen (natürlichen Killerzellen) kommt. Die Ursache liegt in Mutationen einer Zytokinrezeptor-Untereinheit, die für die Weiterleitung von Differenzierungssignalen in lymphoiden Vorläuferzellen verantwortlich ist. In der klinischen Studie wurden Patienten CD34⁺-Zellen entnommen und mit einem retroviralen Vektor, der für den korrekten Rezeptor kodierte, *ex vivo* transduziert. Die überwiegende Mehrheit der Patienten besaß Monate nach Rückgabe der transduzierten Zellen eine normale Anzahl funktionsfähiger T- und NK-Zellen. In diesem Fall konnte also durch einen Gentransfervektor eine vollständige Korrektur des Phänotyps mit den entsprechenden klinischen Vorteilen erzielt werden. Drei Jahre nach Applikation der Vektoren wurde aber bei einem der Patienten eine Leukämie-ähnliche Erkrankung diagnostiziert. Molekulare Analysen ergaben, dass die betroffenen T-Zellen klonalen Ursprungs waren und in diesen Zellen der Retrovirusvektor in ein Protoonkogen auf Chromosom 11 integriert, dieses aktiviert und so wahrscheinlich zum Auslösen der Leukämie beigetragen hatte [63]. Auch wenn derzeit noch nicht eindeutig klar ist, ob und welche zusätzlichen Ereignisse für das Ausbrechen der Leukämie in diesem Fall verantwortlich waren, so scheint doch die zufällige insertionelle Mutation durch den retroviralen Vektor zumindest ein mitbestimmender Faktor zu sein. Es ist davon auszugehen, dass HC-Ad-Hybridvektoren, die retrovirale Integrasen zur zufälligen Integration der Genome verwenden, ein ähnliches Risikopotential aufweisen. Daher erscheint es sinnvoll, episomal replizierende HC-Ad-Vektoren zu entwickeln, die nicht in das Genom der Zielzellen integrieren.

1.6.3 Episomal replizierende HC-Ad-Vektoren

Problematik linearer HC-Ad-Vektorgenome

Ein hypothetischer HC-Ad-Vektor, dessen lineares Genom episomal in der Zelle vorläge und synchron zum Zellzyklus replizieren könnte, bedürfte eines besonderen Mechanismus zur korrekten Replikation der freien Enden seines Genoms. Für die Replikation eukaryotischer Chromosomen existiert mit dem Telomer/Telomerase-System ein effizientes System zum Schutz der Enden der Chromosomen. Freie DNA-Enden, die bei der Replikation nicht geschützt werden, verkürzen sich. Die Verkürzung episomaler, linearer HC-Ad-Vektorgenome, die zu therapeutischen Zwecken in Zellen eingebracht werden, ist auf Grund des möglichen Verlustes kodierender Sequenzen nicht wünschenswert. Eine elegante Möglichkeit, das Problem der freien DNA-Enden von HC-Ad-Vektoren zu umgehen, könnte die Zirkularisierung der HC-Ad-Vektorgenome nach Transduktion der Zielzelle darstellen. Verschiedene Rekombinasesysteme sind für den Zweck der Zirkularisierung linearer HC-Ad-Vektorgenome nach Transduktion der Zielzellen denkbar. Hier sind das Vertebraten-Rekombinase-System Rag-1/Rag-2 oder die Rekombinasesysteme *cre/loxP* und *FLP/Frt* der λ -Rekombinasefamilie zu nennen.

Rekombinase-vermittelte Zirkularisierung der HC-Ad-Vektorgenome

Die Wahl eines geeigneten Rekombinasesystems ist durch das Produktionssystem für HC-Ad-Vektoren limitiert. Das Produktionssystem, das zur Erzeugung der in dieser Arbeit vorgestellten HC-Ad-Vektoren diente, basiert wie beschrieben auf dem cre/loxP-Rekombinasesystem [26]. Die cre-Rekombinase wird stabil von den Produktionszellen synthetisiert, so dass keine HC-Ad-Vektoren produziert werden können, deren Genom loxP-Sequenzen trägt. Diese würden bereits während der Produktion rekombiniert. Daher kommen als Rekombinationssysteme zur Zirkularisierung von HC-Ad-Vektoren dieses Typs nur das Rag-1/Rag-2- oder das FLP/Frt-System in Frage.

Das Rag-1/Rag-2-Rekombinasesystem Die Gene für die Antigen-bindenden Proteine des Immunsystems von Vertebraten werden während der Differenzierung der lymphoiden Immunzellen aus verschiedenen DNA-Segmenten (V, D, J) über somatische Rekombination zusammengesetzt [64][65][66]. Diese sogenannte V(D)J-Rekombination ist auf Vorläufer-B- und T-Zellen beschränkt und wird durch die Rekombinasen Rag-1 und Rag-2 [67][68] in Zusammenspiel mit einigen ubiquitären Proteinen wie der DNA-abhängigen Proteinkinase, Ku86 und DNA-Ligase IV vermittelt [69][70][71][72][73]. Die Erkennungssequenzen für die Rekombinasen werden als „recombination signal sequences“ RSS bezeichnet und bestehen aus einem palindromischen Heptamer und einem A/T-reichen Nonamer, die durch eine unspezifische Sequenz von 23 oder 12 bp Länge, dem sogenannten „Spacer“, verbunden sind. Zwei Gensegmente, die durch RSS flankiert sind, werden nur dann rekombiniert, wenn die Spacer der beiden RSS unterschiedliche Länge besitzen (12/23 bp-Regel) [74]. Die Rekombination zweier Gensegmente kann in Abhängigkeit von der relativen Orientierung der RSS zueinander unter Deletion des DNA-Fragmentes zwischen den RSS erfolgen, wobei aus diesem ein zirkuläres Nebenprodukt entsteht. Diese zirkulären DNA-Moleküle konnten in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [75][76][77]. Hesse *et al* konnten 1987 erstmals zeigen, dass auch extrachromosomale DNA-Substrate in Form von Plasmiden, die die entsprechenden RSS tragen, durch Rag-1/Rag-2 in Prä-B-Zellen rekombiniert werden können. Die Rekombination erfolgt somit unabhängig von einem speziellen chromosomalen Kontext [78]. Weitere Studien haben gezeigt, dass Plasmide mit einem entsprechenden Paar RSS *in vitro* in Kernextrakten von 293-, CHO- und HeLa-Zellen rekombiniert werden, wenn die Zellextrakte mit gereinigtem Rag-1- und Rag-2-Protein versetzt werden [79][80][81]. Die zelluläre Regulation der V(D)J-Rekombination ist Gegenstand intensiver Forschung. Das Rearrangement von V-, D- und J-Gensegmenten ist direkt mit deren transkriptioneller Aktivität korreliert [82]. Des Weiteren ist das Rearrangement innerhalb des Zellzyklus reguliert und tritt nur während der G₁-Phase auf. Diese Regulation erfolgt wahrscheinlich durch posttranskriptionelle Regulation der Proteinestabilität von Rag-2 über differenzielle Phosphorylierung [83][84].

Die vorgestellten Arbeiten zeigen, dass es prinzipiell möglich sein könnte, ein HC-Ad-Vektorsystem zu entwickeln, bei dem die HC-Ad-Vektorgenome durch die Rekombinasen Rag-1/Rag-2 zirkularisiert werden. Hierzu müssten in einem ersten Ansatz zwei Vektoren für die Expression von *Rag-1/Rag-2* und ein Vektor mit einem entsprechenden Paar RSS konstruiert werden. Ein wesentlicher Vorteil des Rag-1/Rag-2-Rekombinasesystems zur Zirkularisierung von HC-Ad-Vektorgenomen nach Transduktion der Zielzelle bestünde darin, dass für diesen Schritt körpereigene Proteine eingesetzt werden könnten. Dies könnte das Risiko toxischer oder immunogener Nebenwirkungen verringern, die möglicherweise mit körperfremden Rekombinasen zu erwarten wären. Allerdings ist die Effizienz der Rekombination extrachromosomaler Plasmidsubstrate in den Arbeiten von Hesse *et al* sehr niedrig (0,1-5%) und auch über die genaue Regulation der V(D)J-Rekombination ist nur sehr wenig bekannt. Daher erschien es vorteilhaft, ein weiteres Rekombinationssystem zur Zirkularisierung der HC-Ad-Vektorgenome zu verwenden.

Das FLP/Frt-Rekombinationssystem Dieses Rekombinationssystem gehört wie das cre/loxP-System zur Familie der λ -Rekombinasen und ist in einer Reihe von Hefe-Stämmen vorhanden. Dort wird es kodiert durch das sogenannte 2- μ m-Plasmid. Für eine Rekombination sind *in cis* die Erkennungssequenzen Frt und *in trans* die FLP-Rekombinase erforderlich [85][86]. Die Voraussetzungen für eine Rekombinationsreaktion sind sehr einfach und gut charakterisiert. Die Erkennungssequenzen *Frt* für die FLP-Rekombinase bestehen aus einer Reihe von drei 13 bp langen Sequenzwiederholungen [87]. Die zweite und dritte Wiederholung sind relativ zueinander invertiert und durch eine 8 bp lange Sequenz („Spacer“) voneinander getrennt. Die FLP-Rekombinase bindet an alle drei Sequenzwiederholungen und schneidet die DNA an den Grenzen der Spacer-Sequenz. Sie wird über das 3'-Phosphat kovalent an den Spacer gebunden, an dessen 5'-Ende dann eine freie Hydroxylgruppe vorliegt. Liegen auf einem DNA-Molekül zwei Frt-Sequenzen in paralleler Orientierung vor, so wird das zwischen ihnen befindliche DNA-Segment exzidiert und zirkularisiert. Das FLP/Frt-System wird bereits ähnlich wie das cre/loxP-System zur gezielten Manipulation genetischen Materials in verschiedenen Systemen eingesetzt [88]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich auch für eine Zirkularisierung von HC-Ad-Vektoren nach Transduktion der Zielzelle eignet. Die FLP-Rekombinase ist allerdings relativ thermolabil und hat bereits bei 37°C eine kurze Halbwertszeit. Zu Beginn der Erstellung dieser Arbeit wurde eine temperaturoptimierte Variante der FLP-Rekombinase publiziert, die durch PCR-basierte Mutagenese und Genshuffling gefunden werden konnte. Diese zeichnet sich durch eine höhere Stabilität bei 37°C aus und ist daher besonders geeignet für den Einsatz in Zellsystemen oder Organen bei dieser Temperatur [88][89].

Fähigkeit der zirkularisierten HC-Ad-Vektorgenome zur autonomen Replikation

Das oriP/EBNA-1-System Das episomale Vorliegen zirkulärer DNA-Moleküle umgeht nicht nur die Schwierigkeiten der Replikation freier DNA-Enden, sondern erlaubt darüber hinaus den Einsatz von Replikationssystemen, die zirkuläre DNA-Moleküle voraussetzen. An erster Stelle ist hier das oriP/EBNA-1-Replikationssystem zu nennen. Dieses stammt aus dem Epstein-Barr-Virus (EBV). EBV ist ein humanes Herpesvirus, das eine lebenslange, latente Infektion von B-Lymphozyten verursacht [3]. Während der Latenz liegt das EBV-Genom in den betroffenen Zellen episomal in nukleosomalen Arrays vor [90]. Es ist in der Lage, als extrachromosomaler DNA-Zirkel zu replizieren [91]. Das EBV-Protein EBNA-1 ist hierbei assoziiert mit Metaphase-Chromosomen und auch die viralen Genome liegen assoziiert mit den Chromosomen vor, sind aber nicht kovalent an diese gebunden [92]. Der EBV-Replikationsursprung oriP und EBNA-1 sind zur Konstruktion von Plasmiden erforderlich, die autonom in humanen Zellen replizieren können [93][94]. Der oriP besteht aus zwei Teilen, den sogenannten „dyad symmetrie“ DS- und „family of repeats“ FR-Elementen [95]. EBNA-1 bindet an Sequenzwiederholungen in jedem der Elemente. In direkter Nachbarschaft zum DS-Element befindet sich der Ort der Initiation der Replikation [96]. Das DS-Element ist essenziell für eine effiziente Replikation [95]. Das FR-Element vermittelt in Zusammenspiel mit EBNA-1 eine nukleäre Retention der DNA [95]. Des Weiteren ist es in vielen Zellen neben DS für eine effiziente Replikation mitverantwortlich und beherbergt einen transkriptionellen Aktivator [97]. Darüber hinaus sind einige zelluläre Proteine bekannt, die für ein Funktionieren des oriP/EBNA-1-Replikationssystems eine Rolle spielen [98]. Ein großer Vorteil von oriP/EBNA-1-basierten Vektoren ist, dass ihre Replikation Zellzyklus-kontrolliert einmal pro Zyklus erfolgt [94]. Dadurch sind negative Seiteneffekte, die durch eine Amplifikation der Vektor-DNA in der Zielzelle auftreten könnten, ausgeschlossen. Allerdings ist mit EBNA-1 ein virales Protein essenziell für die Replikation und Retention der Vektoren. Daher sind toxische oder immunogene Wirkungen nicht auszuschließen. Erste Studien zeigen aber, dass EBNA-1 keine onkogene Wirkung hat und auch nicht immunogen zu sein scheint [99]. Darüber hinaus besitzt EBNA-1 Eigenschaften, die es für das zelluläre Immunsystem unsichtbar machen, und könnte sogar die Zielzellen vor einer Immunreaktion schützen, die durch ein anderes Transgen ausgelöst werden kann [100].

Die Anwendung von Replikationsursprüngen aus Säugern Auch wenn die zu erwartenden Probleme durch Expression von EBNA-1 zur Replikation der Vektoren wahrscheinlich gering sind, wäre es möglicherweise vorteilhaft, einen Vektor zu konstruieren, der statt eines viralen Replikationsmechanismus die Fähigkeit der Zielzelle zur Replikation ihres Genoms nutzt. Die Replikation eukaryotischer Zellgenome ist ein strikt kontrollierter Vorgang, der einmal pro Zellzyklus auftritt. Sie startet an mehreren tausend Replikationsursprüngen, die über das Genom verteilt sind. Die Sequenzen der

Replikationsursprünge und die *in trans* erforderlichen Proteine konnten für *S. cerevisiae* in den letzten Jahren charakterisiert werden. Im Gegensatz dazu erwies sich die Charakterisierung der Replikationsursprünge in Säugerzellen als wesentlich schwieriger. Bis heute konnten nur 20 Replikationsursprünge in Säugerzellen gefunden werden, von denen aber nur eine Minderheit genau charakterisiert wurde [101]. Zu den gut charakterisierten zählen die Replikationsursprünge im Lamin-B2- und β -Globin-Lokus humaner Zellen sowie ein Replikationsursprung in Nachbarschaft zum Dihydrofolatreduktasegen in Hamsterzellen [101]. Zur Charakterisierung der Sequenzeigenschaften von Replikationsursprüngen in Säugerzellen existiert daher nur sehr wenig Datenmaterial. Verschiedene Arbeiten suggerieren sogar, dass Plasmide mit zufälligen humanen DNA-Sequenzen in der Lage sind, autonom zu replizieren, wenn die humanen DNA-Fragmente größer als 20 kB sind [102][103][104]. Auf dieser Basis wurden Plasmidvektoren mit großen humanen DNA-Fragmenten konstruiert. Die Replikation wurde hier durch vermutete Replikationsursprünge in den humanen DNA-Fragmenten initiiert. Zur regelgerechten Segregation der replizierten Genome der Vektoren wurden EBNA-1 und das FR-Element des EBV-oriP eingesetzt. Diese Plasmidvektoren sind auch in der Lage, in Nagerzellen zu replizieren, in denen das oriP/EBNA-1-System nicht funktioniert [105]. Auf Grund dieser Datenlage erschien es sinnvoll, möglichst große Teile der HC-Ad-Vektoren mit humaner Füll-DNA über eines der genannten Rekombinasesysteme zu zirkularisieren und parallel zum oriP/EBNA-1-Replikationssystem einen der gut charakterisierten humanen Replikationsursprünge zur Replikation der Vektorgenome einzusetzen. Hierfür wurde der Replikationsursprung aus dem humanen Lamin-B2-Genlokus gewählt [106]. Dies ist der von allen bekannten am umfassendsten charakterisierte Replikationsursprung [107][108].

2 Zielsetzung

HC-Ad-Vektoren transduzieren eine Vielzahl ruhender und proliferierender Zellen unterschiedlichen Ursprungs und sind relativ leicht in hohen Titern produzierbar. Sie sind auf Grund ihrer großen Aufnahmekapazität für Transgene, der geringen Toxizität und der geringen Immunogenität gegenüber anderen Vektorsystemen für gentherapeutische Zwecke zu bevorzugen.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war eine Bestimmung der drei wesentlichen Kenngrößen von HC-Ad-Vektorpräparationen, nämlich der Zahl der infektiösen Partikel, der Zahl der nicht-infektiösen Partikel und der Zahl der Helferviruspartikel nur eingeschränkt über fehlerbehaftete funktionelle und physikalische Assays möglich. HC-Ad-Vektoren können nicht in Plaque-Assays titriert werden, da sie keine viralen Gene besitzen, die einen produktiven Infektionszyklus erlauben. Auch Reporter-gen-Assays zur Titration sind abhängig vom Vorhandensein einer entsprechenden Expressionskassette und zeigen starke Variabilität zwischen verschiedenen Zelllinien.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Entwicklung eines standardisierbaren, DNA-basierten und Reporter-gen-unabhängigen Assays, der eine verlässliche Bestimmung der drei Kenngrößen von HC-Ad-Vektorpräparationen mit einheitlicher Methodik ermöglicht (Teil I). Dieser sogenannte „Slotblot“-Assay sollte die Grundlage bilden für die Vektordosis-abhängigen und Kopienzahl-orientierten Experimente in Teil II und III dieser Arbeit. Insbesondere der in Teil III durchzuführende Vergleich verschiedener HC-Ad-Vektoren, die nicht mit funktionellen Assays titriert werden können, machte die Entwicklung dieser Methode erforderlich.

In den Teilen II und III der vorliegenden Arbeit sollte die Fähigkeit von HC-Ad-Vektoren, langzeitige Transgenexpression zu vermitteln, evaluiert werden. Hierbei ist zu unterscheiden zwischen postmitotischen, ruhenden Zellen und proliferierenden Geweben, die unterschiedliche Strategien zur Vermittlung einer langzeitigen Transgenexpression erfordern. Für ruhende Zellen kann davon ausgegangen werden, dass HC-Ad-Vektorgenome keine Befähigung zur Replikation besitzen müssen, um episomal in den Zellen erhalten zu bleiben. Diese Hypothese sollte am Beispiel des retinalen Pigmentepithels (RPE), einem Paradigma für ruhende Zellen und zugleich einem potenziellen gentherapeutischen Zielgewebe, überprüft werden (Teil II). Mithilfe des in Teil I entwickelten Assays sollte die für eine effiziente und spezifische Transduktion notwendige HC-Ad-Vektordosis *in vivo* bestimmt werden. Hierauf aufbauend sollte, ebenfalls *in vivo*, der zeitliche Verlauf der Transgenexpression nach Transduktion des retinalen Pigmentepithels ermittelt werden.

Diese Experimente sollten die Grundlage für einen möglichen therapeutischen Einsatz von HC-Ad-Vektoren im retinalen Pigmentepithel bilden.

Im Gegensatz zu ruhenden Geweben wie dem RPE ist davon auszugehen, dass HC-Ad-Vektorgenome in proliferierenden Zellen verloren gehen, da sie keine Mechanismen zur Replikation und regelgerechten Verteilung der replizierten Genome auf die Tochterzellen besitzen. Da eine Vielzahl von gentherapeutisch relevanten Geweben nicht wie das RPE aus postmitotischen Zellen besteht, sondern eine natürliche Proliferationsrate aufweist, bestand das dritte Ziel der Arbeit in der Entwicklung und Überprüfung von Strategien, die den episomalen Erhalt von HC-Ad-Vektorgenomen auch in proliferierenden Geweben ermöglichen können (Teil III). Ein episomaler Erhalt der Vektoren ist einer Integration in das Wirtsgenom der Zielzelle vorzuziehen, da hierbei ein deutlich geringeres Risiko für eine nachteilige insertionelle Mutagenese besteht.

Die Genome der HC-Ad-Vektoren sollten nach Transduktion der Zielzellen über eine DNA-Rekombinase zirkularisiert werden, um die Probleme zu umgehen, die sich bei der Replikation freier DNA-Enden ergeben können. Hierzu sollten die Rekombinasesysteme Rag-1/Rag-2 und FLP/Frt auf ihre Eignung zur Zirkularisierung der HC-Ad-Vektorgenome getestet werden. Als Replikationssysteme für die gebildeten Zirkel sollten das oriP/EBNA-1-System aus Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie ein gut charakterisierter humaner Replikationsursprung aus dem Lamin-B2-Genlocus eingesetzt werden. Die Fähigkeit der so modifizierten HC-Ad-Vektorgenome zur Replikation sollte sowohl über DNA-basierte Southern- als auch über Transgenexpression-abhängige, durchflusscytometrische Assays in stark proliferierenden Tumorzelllinien getestet werden. Zudem sollte ein möglicher Einfluss der eingesetzten Vektormengen auf die Effizienz der Replikation geprüft werden. Die Titer der verschiedenen HC-Ad-Vektoren mussten hierfür über den in Teil I entwickelten Assay bestimmt werden, da keine anderen verlässlichen Assays verfügbar waren.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern im Text nicht anders angegeben, mit dem Reinheitsgrad p.a. von AppliChem (Darmstadt) bezogen.

Bakterienmedien und -agar wurden in Pulverform bei Invitrogen (Karlsruhe) erworben. Die verwendeten DNA-modifizierenden Enzyme stammten von der Firma New England Biolabs (Frankfurt).

Oligodesoxyribonukleotide wurden von Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

Der Anti-EBNA1-Hybridomüberstand war ein Geschenk von Prof. W. Hammerschmidt (München). Der Peroxidase-gekoppelte Ziege-anti-Ratte-IgG wurde von Calbiochem bezogen.

Zellkulturmedien und Medienzusätze wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Gefäße für die Zellkultur sowie Eppendorf-Reaktionsgefäße und Falcon-Röhrchen stammten von Renner (Darmstadt-Schauernheim).

Rundbodenröhrchen (5 ml) für durchflusscytometrische Messungen wurden von Becton-Dickinson (Heidelberg) bezogen.

3.1.2 Geräte

Die Hersteller und Typen der methodenspezifischen Geräte sind in der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgelistet. Darüber hinaus wurden eingesetzt: ein Autoklav Tutt-nauer 3870 EL (Systec, Wetzlar), Heizblöcke Select (VWR, Darmstadt), Inkubatoren Binder BD-115 für Agarkulturen von *E.coli*, Inkubationen von DNA-modifizierenden Enzymreaktionen, zum Backen von Membranen und zur Sterilisation von Glaspipetten (VWR, Darmstadt), ein pH-Meter WTW pH526 (VWR, Darmstadt), das Reinstwasser-system EASYPure UV/UF (Werner, Leverkusen), sterile Werkbänke CleanAir CAIRev4 (Mahl, Kaarst), die Tischzentrifugen biofuge fresco (Heraeus, Hanau), 5417C (Eppendorf, Hamburg) und Sigma 6K15 (Sigma, Osterode), Wasserbäder 1225 (VWR, Darmstadt) sowie Zellkulturinkubatoren mit Isolation und CO₂-Begasung (Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA).

3.2 Arbeiten mit Bakterienkulturen

3.2.1 Flüssigkulturen von *E. coli*

E. coli wurde in Luria Broth Base Medium unter Zusatz von Selektionsantibiotikum kultiviert. Für kleinvolumige Kulturen (1,5 ml) wurden 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße, für großvolumige Kulturen (200 ml) 500-ml-Erlenmeyerkolben verwendet. Die Kulturen wurden in einem Inkubator mit Schüttelvorrichtung (New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 250-300 rpm und 37°C kultiviert. Als Selektionsantibiotikum wurden Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Das Animpfen der Flüssigkulturen erfolgte durch Überführen eines einzelnen Klones von einer Agarplatte.

3.2.2 Festkulturen von *E. coli*

Zur Selektion einzelner Klone wurden 10-cm-Kulturschalen (Greiner, Pleidelsheim) mit je 20 ml Luria Broth Agar plus Selektionsantibiotikum verwendet. Die Konzentrationen der Selektionsantibiotika entsprachen denen der Flüssigkulturen (s. Abschnitt 3.2.1, S. 28).

3.2.3 Transformation von *E. coli*

Transformation von Plasmid-DNA

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden je 20 µl ultrakompetente XL2-blue-Bakterien (Stratagene, Heidelberg) auf Eis aufgetaut, in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 0,5 µl 2-Mercaptoethanol (1,42 M) sowie 10-1000 ng Plasmid-DNA versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 45 s ein Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad durchgeführt und nach zweiminütiger Abkühlung auf Eis die Transformationsansätze mittels Verdünnungsausstrichen auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgebracht. Die Agarplatte wurde 12-16 h bei 37°C inkubiert.

Transformation von DNA aus Ligationsreaktionen

Zur Transformation von DNA aus Ligationsreaktionen (s. Abschnitt 3.3.10, S. 33) wurden je 50 µl ultrakompetente XL2-blue-Bakterien (Stratagene, Heidelberg) auf Eis aufgetaut, in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 0,5 µl 2-Mercaptoethanol (1,42 M) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden je 2 µl Ligationsreaktionsgemisch zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 45 s ein Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad durchgeführt, die Transformationsansätze mit je 300 µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) ohne Selektionsantibiotikum versetzt und 45-60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss hieran erfolgte der Ausstrich der Transformationsansätze auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum.

3.2.4 Plasmidisolierung aus *E.coli*

Plasmidisolierung im kleinen Maßstab

Die Plasmidisolierung im kleinen Maßstab wurde zur Gewinnung von Plasmiden aus Klonen, die aus der Transformation von DNA aus Ligationsreaktionen hervorgegangen waren, eingesetzt (s. Abschnitt 3.2.3, S. 28). Einzelne Klone wurden in 1,5-ml-Flüssigkulturen überführt und 12-16 h im Schüttelinkubator inkubiert (s. Abschnitt 3.2.1, S. 28). Die Kulturen wurden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (20000xg, 45 s, RT), der Mediumüberstand abgesaugt und die Niederschläge in je 200 µl TELT-Puffer resuspendiert. Mit einer Injektionsnadel wurden die Deckel der Eppendorf-Reaktionsgefäße durchstoßen und die Bakteriensuspensionen in einem Heizblock bei 96°C 3 min gekocht. Anschließend wurden die Lysate 5 min auf Eis gekühlt und dann zentrifugiert (20000xg, 10 min, RT). Die Überstände wurden in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und mit 100 µl Isopropanol gemischt. Zur Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte eine erneute Zentrifugation (20000xg, 10 min, RT). Die Überstände wurden abgesaugt und zu den Niederschlägen wurden je 100 µl 70% Ethanol pipettiert. Es wurde wieder zentrifugiert (20000xg, 5 min, RT), der Überstand abgesaugt, die Niederschläge bei RT 5-10 min luftgetrocknet und in 25 µl TE (s. Abschnitt 3.3.1, S. 30) resuspendiert.

TELT:

50 mM Tris (pH 8,5), 60 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4% Triton X-100,
1 Spatelspitze Lysozym

Plasmidisolierung im großen Maßstab

Die Plasmidisolierung im großen Maßstab wurde zur Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA aus Klonen, die aus der Transformation von Plasmid-DNA hervorgegangen waren, eingesetzt (s. Abschnitt 3.2.3, S. 28). Einzelne Klone wurden in 200-ml-Flüssigkulturen überführt und 12-16 h im Schüttelinkubator inkubiert (s. Abschnitt 3.2.1, S. 28). Die Kulturen wurden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (6000xg, 15 min, 4°C) und der Mediumüberstand verworfen. Für die Plasmidisolierung wurden kommerzielle Maxiprep-Kits (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die alkalische Lyse und die Reinigung der DNA mittels der mitgelieferten Anionenaustauschersäulen wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Nach Elution der Plasmid-DNA in 50-ml-Falcon-Röhrchen wurde diese mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und 1 h bei -20°C inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation in einer Tischzentrifuge mit Ausschwingrotor (5000xg, 30 min, 4°C, Rotor: 12325, Sigma, Osterode). Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in 300 µl TE resuspendiert, in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und einer Ethanolpräzipitation unterzogen. Abschließend wurde der Niederschlag in 200-500 µl TE (s. Abschnitt 3.3.1, S. 30) resuspendiert.

3.3 Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren

3.3.1 Aufbewahrung von DNA-Lösungen

Plasmid-DNA mit einer Größe von über 8 kB wurde in TE-Puffer (pH 8,5) bei 4°C aufbewahrt. Kleinere Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer (pH 7,5) wahlweise bei 4°C oder bei -20°C gelagert. Genomische DNA aus eukaryotischen Zellen wurde in TE-Puffer (pH 8,5) bei -20°C aufbewahrt. Vektorfragmente und Insertfragmente für Ligationsreaktionen (s. Abschnitt 3.3.10, S. 33) wurden in 10 mM Tris (pH 8,5) ohne Zusatz von EDTA bei 4°C gelagert. Einzelsträngige Oligodesoxyribonukleotide wurden in H₂O bei -20°C aufbewahrt.

TE-Puffer:

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 oder pH 8,5 mit HCl eingestellt

3.3.2 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentration c von DNA in wässrigen Lösungen wurde mit einem Spektralphotometer (Amersham-Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Folgender Zusammenhang wurde gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz zum Errechnen der Konzentration aus der gemessenen Extinktion E bei einer Wellenlänge von 260 nm verwendet:

$$c(\text{dsDNA})[\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{260} \cdot V \cdot 50,$$

wobei V den Verdünnungsfaktor in der Messküvette darstellt. Bei einem Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm von $\frac{E_{260}}{E_{280}} = 1,7 - 2,0$ wurde die Präparation als proteinfrei betrachtet. Zur Bestimmung der Konzentration einzelsträngiger Oligodesoxyribonukleotide wurde

$$c(\text{ssDNA})[\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{260} \cdot V \cdot 40,$$

zu Grunde gelegt.

3.3.3 Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen

Ethanolpräzipitation

Zur Präzipitation von DNA aus wässriger Lösung mit Ethanol wurde diese mit 0,1 Volumen Natriumacetatlösung (3 M, pH 5,2) gemischt und 2-2,5 Volumen Ethanol (100%) zugesetzt. Nach gründlicher Durchmischung wurde in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (20000xg, 5-30 min, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (20000xg, 10 min 4°C). Der Überstand

wurde verworfen, der Niederschlag 5-10 min bei RT luftgetrocknet und in TE resuspendiert. Vektor- und Insertfragmente für Ligationsreaktionen (s. Abschnitt 3.3.10, S. 33) wurden in 10 mM Tris (pH 8,5) gelöst.

Isopropanolpräzipitation

Zur Präzipitation mit Isopropanol wurde die wässrige DNA-Lösung mit 0,5-0,7 Volumen Isopropanol versetzt und gemischt. Anschließend wurde zentrifugiert (20000xg, 5-30 min, 4°C oder RT), der Überstand verworfen, der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (20000xg, 10 min, 4°C) und vor Resuspendierung in TE 5-10 min bei RT luftgetrocknet.

3.3.4 Restriktionsverdau von DNA

Für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die vom Hersteller der jeweiligen Enzyme empfohlenen Puffer und Temperaturen verwendet. Verdaue bei 37°C wurden in einem Inkubator, Verdaue über 37°C in einem Heizblock durchgeführt. Verdaue derselben DNA mit mehreren Enzymen wurden grundsätzlich nacheinander durchgeführt. In diesem Fall wurde zwischen zwei Verdauen eine Ethanolpräzipitation vorgenommen (s. Abschnitt 3.3.3, S. 30).

Analytische Restriktionsverdaue

Die Standardvolumina für analytische Restriktionsverdaue betragen 10 µl oder 20 µl mit 1-5 U Enzym. Analytische Restriktionsverdaue wurden in Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) durchgeführt.

Präparative Restriktionsverdaue

Präparative Restriktionsverdaue erfolgten in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in 100 µl Gesamtvolumen mit maximal 20 µg DNA. Enzymmenge und Verdauzeit wurden so aufeinander abgestimmt, dass maximal 10-facher Überverdau erfolgte. Sollten keine weiteren enzymatischen Modifikationen der DNA aus präparativen Restriktionsverdauen erfolgen, so wurde diese entweder einer Agarosegelelektrophorese (s. Abschnitt 3.3.6, S.32) sowie anschließender Gelextraktion (s. Abschnitt 3.3.7, S. 32) oder einer Phenol-extraktion (s. Abschnitt 3.3.5, S. 31) unterzogen.

3.3.5 Phenolextraktion von DNA-Lösungen

Zur Inaktivierung und Entfernung unerwünschter Proteine aus wässrigen DNA-Lösungen wurden Phenolextraktionen durchgeführt. Hierzu wurde das Volumen der wässrigen

DNA-Lösung mit TE (pH 8,5) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf 200-500 µl eingestellt und ein gleiches Volumen TE-äquilibriertes Phenol zugegeben (Invitrogen, Karlsruhe). Die Phasengrenzfläche zwischen wässriger und organischer Phase wurde durch starkes Schütteln (1 min) vergrößert und das Gemisch zentrifugiert (20000xg, 5 min, RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Es wurde erneut stark geschüttelt (1 min), zentrifugiert (20000xg, 5 min, RT) und abschließend die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanolpräzipitation unterzogen (s. Abschnitt 3.3.3, S. 30).

3.3.6 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur analytischen sowie präparativen Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Sie erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern mit 50 ml oder 150 ml Gelvolumen und 12 cm Laufstrecke (Hoefer, San Francisco, USA). Als Gel- und Laufpuffer wurde TBE verwendet. Die Agarosekonzentration der Gele betrug applikationsabhängig 0,6-2,0%. Die Agarose wurde durch Kochen in einer Mikrowelle in TBE gelöst, nach kurzem Abkühlen mit 0,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Roth, Karlsruhe) pro 50 ml Gelvolumen versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Auf Ethidiumbromid wurde verzichtet, wenn die DNA nach der Elektrophorese auf eine Nylonmembran transferiert werden sollte.

Zur Elektrophorese wurden die DNA-Proben mit 0,1 Volumen 10-fach Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Es wurde eine Spannung von 4-8 V/cm Gellänge angelegt. Die DNA-Fragmente wurden nach der elektrophoretischen Trennung auf einem UV-Transilluminator (Intas, Göttingen) bei 312 nm durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids sichtbar gemacht. Für präparative Gele wurde zur Visualisierung ein DarkReader (MoBiTec, Göttingen) verwendet, um die Bildung von Thymindimeren zu vermeiden.

TBE:

90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8,0

Probenpuffer (10-fach):

60 mM EDTA, 10% Glycerol, 1 Spatelspitze Bromphenolblau

3.3.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Agarosestückchen mit den gewünschten DNA-Fragmenten wurden auf einem DarkReader mit sterilen Skalpellen aus den Agarosegelen geschnitten, in maximal 400 mg schwere Stücke geteilt und diese in 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Extraktion der DNA aus den Agarosestücken erfolgte mithilfe des „Qiagen Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben unter Zusatz von 10 µl Natriumacetat (3 M, pH

5,2) pro 400 mg Agarose sowie Einbeziehung der optionalen Waschschrirte. Abschließend wurde eine Ethanolpräzipitation durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.3, S. 30).

3.3.8 Erzeugung glatter Enden aus 5'-Überhängen

Die Erzeugung glatter Enden aus 5'-Überhängen in präparativen Restriktionsverdauen erfolgte mittels Klenow-Enzym. Zu den präparativen Restriktionsverdauen wurden dNTPs (Endkonzentration je dNTP: 33 μM) und Klenow-Polymerase (1 U/ μg DNA) pipettiert. Die Reaktion wurde bei 30°C in einem Heizblock für 20 min durchgeführt. Zum Abbrechen der Reaktion wurden 10 μl EDTA (0,5 M, pH 8,5) zugefügt und eine Phenolextraktion durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.5, S. 31).

3.3.9 Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten

Vor Ligationen wurde eine Dephosphorylierung der 5'-Enden des Vektorfragmentes (Definition s. Abschnitt 3.3.10, S. 33) vorgenommen, um eine Selbstligation zu verhindern. Die Dephosphorylierung erfolgte nach Möglichkeit direkt im präparativen Restriktionsverdau (s. Abschnitt 3.3.4, S. 31) oder in 100 μl eines beliebigen Restriktionsverdau-puffers in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen durch Zugabe von 1,5 U alkalischer Kälberdarmphosphatase (CIP) pro 10 μg DNA und Inkubation bei 37°C für eine Stunde. Abschließend wurden 10 μl EDTA (0,5 M, pH 8,0) zugesetzt und eine Phenolextraktion durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.5, S. 31).

3.3.10 Ligationen

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mithilfe von T4-DNA-Ligase in dem zugehörigen Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 μl in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Im Folgenden werden das größte DNA-Fragment einer Ligationsreaktion als Vektorfragment und die kleineren DNA-Fragmente als Insertfragmente bezeichnet.

Vektor- und Insertfragmente wurden zur Trennung kohäsiver Enden sowie zur Auflösung möglicher Supersekundärstrukturen 5 min bei 42°C in einem Heizblock inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Pro Ligationsreaktion wurden 100 ng Vektorfragment mit gegebenenfalls dephosphorylierten 5'-Enden und Insertfragment in molaren Verhältnissen von 1:2, 1:5 und 1:10 eingesetzt.

Als Kontrollen dienten Selbstligationen sowohl von Vektor- als auch von Insertfragment. Die Ligation erfolgte mindestens 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden Transformationen in XL2-blue-Bakterien (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt (s. Abschnitt 3.2.3, S. 28).

3.3.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von dsDNA erfolgte nach dem Prinzip des „Cycle Sequencing“ mit BigDye-Terminatoren und AmpliTaq DNA Polymerase (PE Biosystems, Weiterstadt) und wurde vom Servicelabor des ZMMK als Auftragsarbeit durchgeführt.

3.3.12 Polymerase-Kettenreaktion

Konstruktion von Primern für die Polymerase-Kettenreaktion

Die Konstruktion von Primern für die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte von Hand. Die Mindestlänge betrug 18 Desoxyribonukleotide, die Mindestschmelztemperatur 55°C. Die Schmelztemperatur T_m wurde mit der Formel

$$T_m[^\circ\text{C}] = ((A + T) \cdot 2) + ((G + C) \cdot 4)$$

berechnet, wobei A die Summe der Adeninbasen, T die Summe der Thyminbasen, C die Summe der Cytosinbasen und G die Summe der Guaninbasen des Oligodesoxyribonukleotides bezeichnen.

Durchführung

Polymerase-Kettenreaktionen wurden in 50 μl Gesamtvolumen im PCR-Automat Uno II (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Konzentration jedes Desoxyribonukleotides betrug 200 μM , die jedes Primers 300 nM. Zu analytischen Zwecken sowie zur Präparation von Ausgangsmaterial für DNA-Sonden wurde Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) und der zugehörige Puffer unter Zusatz 1,5 mM MgCl_2 (Endkonzentration) verwendet. Für präparative Polymerase-Kettenreaktionen zur anschließenden Klonierung des entstandenen Fragmentes wurde Pfu-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) in dem mitgelieferten Puffer eingesetzt. Bei PCR mit genomischer DNA wurden 1-2 μg , bei PCR mit Plasmid-DNA 1-10 ng eingesetzt. Die initiale Denaturierung erfolgte immer für 5 min bei 96°C. Die Annealing-Temperatur wurde 5°C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur der eingesetzten Oligodesoxyribonukleotide angesetzt. Bei präparativer PCR wurde über 25, ansonsten über 30 Zyklen amplifiziert.

Aufarbeitung von PCR-Reaktionen

Präparative Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben gereinigt und anschließend eine Ethanolpräzipitation durchgeführt. Polymerase-Kettenreaktionen zur Präparation von DNA-Sonden, die mit Plasmid als Template durchgeführt worden waren, wurden zusätzlich einer präparativen Agarosegelelektrophorese (s. Abschnitt 3.3.6, S. 32) mit anschließender Extraktion des Fragmentes (s. Abschnitt 3.3.7, S. 32) unterzogen.

3.3.13 Southern-Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen

Für den gravitationsunterstützten, alkalischen Kapillartransfer von DNA aus Agarosegelen auf Hybridisierungsmembranen wurde ein Transferaufbau in Abwandlung von Southern [109] gemäß Chomczynski verwendet [110]. Als Hybridisierungsmembranen dienten positiv geladene Nylonmembranen (Pall, Dreieich).

Depurinierung und Denaturierung

Vor dem Transfer wurden die DNA-Agarosegele 2x15 min bei Raumtemperatur in Depurinierungslösung (0,25 M HCl) geschwenkt. Dann wurde 20 min in Denaturierungslösung (0,4 M NaOH) inkubiert und das Gel in den Transferaufbau integriert.

Transfer, Neutralisation und Fixierung

Der Transfer erfolgte in 0,4 M NaOH für 3-12 h. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde die Membran zur Neutralisierung überschüssiger Natronlauge 2x5 min in 2xSSC geschwenkt. Abschließend wurde die Membran 30 min bei 120°C in einem Inkubator gebacken.

2xSSC:

0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7,0

3.3.14 Detektion immobilisierter Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Alle Inkubationen von Nylonmembranen mit Prähybridisierungs-, Hybridisierungs- und Waschlösungen wurden in 200-ml-Glasröhren (Biometra, Göttingen) in einem temperierten Rotationsinkubator (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Puffer und Waschlösungen wurden vor ihrer Verwendung in einem Wasserbad temperiert. Die Hybridisierung erfolgte in Abwandlung nach [111].

Prähybridisierung

Die Prähybridisierung erfolgte in Prähybridisierungspuffer für 2 h bei 45°C-68°C. Es wurden 20 ml Prähybridisierungspuffer pro 150 cm² Membran eingesetzt.

Prähybridisierungspuffer:

0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7,0

0,5 mg/ml Heringssperma-DNA, 10% Dextransulfat

0,5% Magermilchpulver (fettreduziert), 1% SDS

Hybridisierung mit DNA-Sonden

Im Anschluss an die Prähybridisierung erfolgte die Hybridisierung mit ^{32}P -markierten einzelsträngigen DNA-Sonden. Diese wurden unmittelbar vor der Verwendung 2 min in einem Wasserbad gekocht, weitere 2 min auf Eis gekühlt und direkt in den Prähybridisierungspuffer pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte 12-18 h bei 68°C im Rotationsinkubator. Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran 2x10 min mit Waschpuffer 1 und 2x10 min mit Waschpuffer 2 bei 68°C gewaschen. Abschließend wurde die Membran luftgetrocknet und in Klarsichttüten (Kapak-Scotch, Minneapolis, USA) verpackt. Zur Visualisierung der Signale wurden entweder Röntgenfilme (Amersham-Pharmacia, Freiburg) oder eine Phosphorimagerplatte (Amersham-Pharmacia, Freiburg) in den entsprechenden Expositionskassetten aufgelegt.

Waschpuffer 1:

0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7,0
0,1% SDS

Waschpuffer 2:

15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumcitrat, pH 7,0
0,1% SDS

Herstellung ^{32}P -markierter DNA-Sonden

Die Herstellung ^{32}P -markierter DNA-Sonden aus den entsprechenden DNA-Schablonen erfolgte mittels Klenow-Polymerase und Heptadesoxyribonukleotiden mit zufälliger Sequenz. 200 ng der DNA-Schablone wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μl H_2O 5 min in einem Wasserbad gekocht und 3 min auf Eis gekühlt. Die Klenowreaktion wurde mithilfe des DNA-Labeling-Kits RediPrime (Amersham-Pharmacia, Freiburg) nach Herstellerangaben unter Zusatz von ^{32}P -markiertem dCTP (5 μCi) durchgeführt. Zur Reinigung der Sonden über ein Molekularsieb wurden Sephadex G-50 Säulen (Roche, Mannheim) eingesetzt. Alternativ wurde das DNA-Labeling-Kit RediPrime II (Amersham-Pharmacia, Freiburg) eingesetzt, das nach dem gleichen Prinzip funktioniert, allerdings eine Reinigung der Sonde erübrigt.

3.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.4.1 Zellkulturmedien

Als Zellkulturmedien wurden Pulvermedien der Firma Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Diese wurden nach Herstellerangaben in H_2O gelöst, mit den entsprechenden Mengen Bikarbonat versetzt, steril filtriert und bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurde fötales Kälberserum (Endkonzentration 10%) sowie Penicillin-G/Streptomycinsulfat/L-Glutamin (Endkonzentrationen: 100 U/ml, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 292 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt.

Tabelle 3.1: Verwendete Zellen, zugehörige Medien und Teilungsraten beim Passagieren.

Zelllinie	Medium	Teilungsrate
293-HEK	MEM	1:5
HeLa	MEM	1:5 - 1:8
HepG2	α -MEM	1:6
Hepa1-6	α -MEM	1:6
A549	MEM	1:7 - 1:8
Hela-EBNA1	α -MEM	1:3
293-cre66	α -MEM	1:5 - 1:6
N52E6	α -MEM	1:5

3.4.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle eukaryotischen Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Je nach Proliferationsgeschwindigkeit wurden die Zellen zweimal pro Woche passagiert, indem mit PBS gewaschen wurde, die Zellen 2-10 min mit Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) von der Kulturschale gelöst und ein Aliquot auf neue Kulturschalen überführt und mit frischem Medium versetzt wurde. Tabelle 3.1, S. 37 gibt einen Überblick über die verwendeten Zellen, das zugehörige Medium und die Teilungsrate beim Passagieren.

PBS:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl
14 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4

3.4.3 Gefrierkulturen eukaryotischer Zellen

Zum Einfrieren eukaryotischer Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Kulturgefäß gelöst und in 3,6 ml Einfrieremix resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu gleichen Teilen auf zwei 2-ml-Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) verteilt und 15 min bei RT stehen gelassen. Die Kryoröhrchen wurden dann über Nacht in einem Isopropanolbad auf -80°C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Reaktivierung eingefrorener Zellen wurden diese bei 37°C zügig aufgetaut, der Inhalt eines Kryoröhrchens auf eine 15-cm-Zellkulturschale plattiert und unter täglichem Mediumwechsel bis zur Konfluenz gezogen.

Einfrieremix:

90% FCS, 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim)

3.4.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte durch Ca-PO₄-DNA-Komplexe [112]. Am Vorabend der Transfektion wurden $1-3 \cdot 10^6$ zu transfizierende Zellen auf einer 6-cm-Kulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurden 6-8 µg der zu transfizierenden DNA in 176 µl H₂O mit 24 µl CaCl₂-Lösung (2 M) versetzt und gut gemischt. Diese Lösung wurde unter starkem Mischen (Fuge-Vortex, Biosan, Riga, Lettland) langsam zu 200 µl HEBS-Puffer (2-fach), vorbereitet in einem 15-ml-Falconröhrchen, getropft. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Während der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml frischem Medium versetzt. Hierzu wurden die Ca-PO₄-DNA-Komplexe getropft und 4-12 h unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Abschließend wurde das Mediumvolumen auf 6 ml ergänzt.

HEBS-Puffer (2-fach):

50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,13

3.4.5 Präparation von DNA aus eukaryotischen Zellen

Präparation mittels „QiaAmp DNA Mini Kit“

Die Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen ($1-4 \cdot 10^6$ Zellen in 200 µl PBS) mittels „QiaAmp DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) erfolgte gemäß Herstellerangaben. Im Anschluss an die Elution von der Säule wurde die DNA einer Ethanol-fällung unterzogen (s. Abschnitt 3.3.3, S. 30) und in 10-50 µl TE resuspendiert.

Präparation mittels Phenolextraktion

Zur Präparation genomischer DNA mittels Phenolextraktion wurde die Zellsuspension ($1-4 \cdot 10^6$ Zellen in 500 µl PBS) mit je 0,1 Volumen Proteinase K (5 mg/ml), SDS (10%) und EDTA (250 mM) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.5, S. 31) und die DNA in 10-50 µl TE resuspendiert.

3.4.6 Durchflusscytometrie mit eukaryotischen Zellen

Die Durchflusscytometrie von eukaryotischen Zellen zum Nachweis der Expression des „enhanced green fluorescent protein“ EGFP erfolgte mit dem Durchflusscytometer FACS-Calibur der Firma Becton-Dickinson (Heidelberg). Die zu analysierenden Zellen wurden mit PBS gewaschen, kurz trypsinisiert (2 ml Trypsin-EDTA/10-cm-Kulturschale), das Trypsin abgesaugt, die Zellen durch Klopfen von den Kulturschalen gelöst und in PBS/2% FCS/20 mM EDTA in einer Dichte von $0,5-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert und

im Durchfluscytometer mit hoher Flussrate vermessen. Die Analyse der Messungen erfolgte mit der Software CellQuest (Becton-Dickinson, Heidelberg).

3.4.7 Nachweis von β -Galactosidase in Zellen

Zum Nachweis von β -Galactosidase in eukaryotischen Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, für 3 Minuten mit 0,5% Glutaraldehyd in PBS fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei 37°C in Färbelösung inkubiert. Die Anzahl an blau gefärbten Zellen wurde unter einem Lichtmikroskop bestimmt.

Färbelösung:

77 mM Na₂HPO₄, 23 mM NaH₂PO₄
1,3 mM MgCl₂, 3 mM K₃Fe(CN)₆, 3 mM K₄Fe(CN)₆
4% Bluogal in Dimethylformamid (Dianova, Hamburg)

3.5 Arbeiten mit adenoviralen Vektoren

3.5.1 Verwendete Produktionszelllinien

Zur Produktion von Helferviren des Typs AdLC8cluc wurde die N52E6-Zelllinie verwendet [13]. Zur helfervirusabhängigen Produktion von HC-Ad-Vektoren wurde die Zelllinie 293-cre66 (Schiedner, unpublished) eingesetzt. Die Kultivierung dieser Zelllinien erfolgte unter den in Abschnitt 3.4.2, S. 37 angegebenen Bedingungen.

3.5.2 Aufbewahrung von Adenovirus

Gereinigte Adenoviren wurden in TBS mit 10% Glycerol bei -80°C gelagert. Rohlysate (s. Abschnitt 3.5.4, S. 40) wurden ohne Glycerolzusatz ebenfalls bei -80°C gelagert.

TBS:

25 mM Tris, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4

3.5.3 Infektion eukaryotischer Zellen mit Adenovirus

Infektionen eukaryotischer Zellen mit gereinigtem Adenovirus oder Virus aus Rohlysaten von Zellen erfolgten in reduzierten Volumina des entsprechenden Kulturmediums für 2-16 h bei 37°C und 5% CO₂. Danach wurde auf das Standardvolumen aufgefüllt. Tabelle 3.2, S. 40 zeigt die verwendeten Volumina. Bei Infektion mit Rohlysaten wurden diese nicht durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit.

Tabelle 3.2: Verwendete Medientvolumina zur Infektion und Standardvolumina, auf die nach der Infektion aufgefüllt wurde.

Fläche des Kulturgefäßes	Volumen bei der Infektion	Standard- volumen
2 cm ²	300 µl	1 ml
57 cm ²	2 ml	6 ml
157 cm ²	6 ml	15 ml
350 cm ²	12 ml	30 ml

3.5.4 Erzeugung von Rohlysaten aus infizierten Produktionszellen

Zum Freisetzen von Adenovirus aus den Produktionszellen wurden diese durch Spülen mit einer Pipette und leichtes Klopfen vollständig von den Kulturgefäßen gelöst, zentrifugiert (400xg, 10 min) und in 1 ml (für $2 \cdot 10^6$ Zellen), 2 ml (für $2-4 \cdot 10^7$ Zellen) oder 4 ml (für $2-4 \cdot 10^8$ Zellen) TBS resuspendiert. Die Zellen in der Suspension wurden durch dreimaliges Einfrieren/Auftauen in N_{2aq} und einem Wasserbad (37°C) aufgebrochen. Rohlysate wurden nach Möglichkeit unmittelbar vor ihrer Verwendung erzeugt.

3.5.5 Erzeugung von Helferviren

Die Erzeugung von Helferviren des Typs AdLC8cluc [26] erfolgte mithilfe einer gereinigten Stammlösung dieses Virus. Es wurden zwei 15-cm-Kulturschalen mit je $2 \cdot 10^7$ Zellen mit 5 MOI AdLC8cluc infiziert. MOI bezeichnet die „multiplicity of infection“, also die Zahl infektiöser Virionen, die pro Zelle verwendet wird. Nach Auftreten eines vollen CPEs (nach ca. 48 h) wurde Rohlysate erzeugt. Der Titer des Rohlysates wurde abgeschätzt, indem je $2 \cdot 10^6$ N52E6-Zellen in 6-cm-Kulturschalen mit steigenden Mengen des Lysates infiziert wurden. Die Menge Rohlysate, bei der die infizierten Zellen nach 48 h einen vollen CPE zeigten, wurde auf $2 \cdot 10^8$ Zellen hochgerechnet und eben diese Menge zur Infektion von 10 15-cm-Kulturschalen mit je $2 \cdot 10^7$ N52E6-Zellen verwendet. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet, Rohlysate erzeugt und das Virus per CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt.

3.5.6 Dichtegradientenzentrifugation von Rohlysaten

Adenoviren wurden zu hohen Titern mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aus Rohlysaten von $2-4 \cdot 10^8$ Produktionszellen gereinigt. Die Rohlysate wurden zur Abtrennung von Zelltrümmern zentrifugiert (400xg, 10 min), der Überstand in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit TBS auf 20 ml aufgefüllt. Nach Zusatz von 10 g CsCl (Roche, Mannheim) wurde die Lösung zu gleichen Teilen auf zwei Ultrazentrifugations-

röhrchen des Typs UltraClear (Beckmann, München) verteilt und im Ausschwingrotor SW-41Ti (Beckmann, München) in der Ultrazentrifuge L7-65 des gleichen Herstellers ultrazentrifugiert (176000 \times g, 20 h, 4°C). Die Ultrazentrifuge wurde bis 800 rpm gebremst und dann ohne Bremse auslaufen gelassen. Mit einer Injektionsnadel (20G, 0,9 mm) wurden die Virusbanden in je maximal 2 ml Volumen in Kanülen (Omnifix, Braun, Melsungen) abgezogen, vereinigt und nach Auffüllen mit einer CsCl/TBS-Lösung (5g CsCl/10ml) erneut ultrazentrifugiert (176000 \times g, 20 h, 4°C). Bremsen der Zentrifuge und Abziehen der Virusbande erfolgten analog zur ersten Ultrazentrifugation.

Viren, die nicht für einen Einsatz *in vivo* vorgesehen waren, wurden nur einmal ultrazentrifugiert.

3.5.7 Entsalzung der Viren nach Dichtegradientenzentrifugation

Unmittelbar nach Abziehen der Virusbanden aus CsCl-Gradienten wurden die CsCl-haltigen Virussuspensionen über ein Molekularsieb entsalzt. Hierzu wurden PD-10-Säulen (Amersham-Pharmacia, Freiburg) mit 5 \times 5 ml TBS äquilibriert, das Volumen der Virussuspension mit TBS auf 2,5 ml eingestellt und diese auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 5 ml TBS, wobei 1-ml-Fractionen gesammelt wurden. Die virushaltigen Eluatfraktionen 2 und 3 wurden vereinigt, mit 0,22 ml Glycerol (100%) versetzt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.5.8 Erzeugung von HC-Ad-Vektoren in seriellen Amplifikationen

HC-Ad-Vektoren wurden durch Transfektion der zu Grunde liegenden DNA und Infektion mit Helfervirus erzeugt. Die in diesem Schritt entstandene, zunächst sehr geringe Menge infektiösen Vektors wurde schrittweise vergrößert, indem wiederholt Produktionszellen mit Rohlysaten des Vektors und mit gereinigtem Helfervirus koinfiziert wurden (serielle Amplifikationen).

Zur Transfektion wurde die dem HC-Ad-Vektor zu Grunde liegende Plasmid-DNA durch präparativen Verdau (s. Abschnitt 3.3.4, S. 31) mit der Restriktionsendonuklease *Pme*I linearisiert, um die Ad5-ITRs freizusetzen. Der Verdau wurde mittels Phenolextraktion gereinigt (s. Abschnitt 3.3.5, S. 31). 6-8 μ g der gereinigten DNA wurden abends in $2 \cdot 10^6$ 293-cre66-Zellen transfiziert (s. Abschnitt 3.4.4, S. 38). Am nächsten Tag erfolgte eine Infektion mit 5 MOI Helfervirus AdLC8cluc. Nach 48 h, d.h. bei Auftreten eines vollständigen CPEs wurde Rohlysat aus den Zellen erzeugt (s. Abschnitt 3.5.4, S. 40). Dieses Lysat mit sehr geringen Vektormengen wurde als Ausgangsmaterial für serielle Amplifikationen eingesetzt. Tabelle 3.3, S. 42 zeigt die in den einzelnen Amplifikationen verwendeten Zell-, Lysat- und Helfervirusmengen.

Für die Erzeugung der Vektoren, die das oriP/EBNA-1-Replikationssystem beinhalten, wurde eine Abwandlung des Standardprotokolls vorgenommen. Hierzu wurden die Produktionszellen grundsätzlich zuerst mit Helfervirus infiziert. Erst 4-6 h nach dieser

Tabelle 3.3: Serielle Amplifikationen von HC-Ad-Vektoren.

Amplifikation Nr.	Zellzahl	infiziert mit	Koinfektion mit Helfervirus
1	$2 \cdot 10^6$	1/2 Lysatmenge aus Transfektion	5 MOI
2	$2 \cdot 10^6$	1/2 Lysatmenge aus Amplifikation 1	5 MOI
3	$2 \cdot 10^7$	volle Lysatmenge aus Amplifikation 2	5 MOI
4	$2 \cdot 10^7$	1/2 Lysatmenge aus Amplifikation 3	5 MOI
5	$4 \cdot 10^7$	volle Lysatmenge aus Amplifikation 4	5 MOI

Infektion wurde die Transfektion mit Vektor-Plasmid beziehungsweise die Infektion mit Rohlysate durchgeführt. Dies sollte eine Replikation der HC-Ad-Vektorgenome erlauben, bevor signifikante Mengen EBNA-1 synthetisiert werden, da vermutet wird, dass die Präsenz von EBNA-1 die adenovirale Replikation von Vektoren inhibiert, die oriP besitzen [113]. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion bzw. Infektion mit Rohlysate geerntet.

3.5.9 Erzeugung von HC-Ad-Vektoren mit hohem Titer

Zur Erzeugung von HC-Ad-Vektoren mit hohem Titer wurden $2-4 \cdot 10^8$ 293-cre66 Zellen mit der vollen Lysatmenge aus der seriellen Amplifikation Nr.5 sowie 5 MOI Helfervirus AdLC8cluc koinfiziert. Nach 48 h wurde Rohlysate erzeugt (s. Abschnitt 3.5.4, S. 40) und der Vektor über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt (s. Abschnitt 3.5.6, S. 40).

Alternativ wurden $2-4 \cdot 10^8$ 293-cre66-Zellen mit 10 MOI gereinigtem HC-Ad-Vektor und 5 MOI Helfervirus AdLC8cluc koinfiziert.

3.5.10 Präparation von DNA aus gereinigten Adenoviren

Zur Präparation von DNA aus gereinigten Adenoviren wurde das „QiaAmp DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Es wurden 100 µl der Virussuspension (entsprechend $1 \cdot 10^8-1 \cdot 10^9$ infektiösen Partikeln) mit 100 µl PBS und 20 µl der mitgelieferten Proteinase K versetzt und dann nach Herstellerangaben verfahren. Nach Elution der DNA von der Säule wurde diese einer Ethanol-fällung unterzogen (s. Abschnitt 3.3.3, S. 30) und in 10-20 µl TE resuspendiert. Zur Analyse der Integrität wurde die DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und einer analytischen Agarosegelelektrophorese unterzogen (s. Abschnitt 3.3.6, S. 32).

3.5.11 Plaque-Assay zur Titerbestimmung von Erstgenerationsvektoren

Zur Titerbestimmung von Erstgenerationsvektoren sowie zur Bestimmung der Helferviruskontamination von HC-Ad-Vektorpräparationen mittels Plaque-Assay in Abwandlung nach [37] wurden je $2 \cdot 10^6$ N52E6- oder 293-Zellen in 6-cm-Kulturschalen mit verschiedenen Verdünnungen der Vektorpräparation infiziert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Agaroseoverlay überschichtet. Nach 10-15 Tagen wurden die entstandenen Plaques lichtmikroskopisch kontrolliert und gezählt. Aus der Zahl der Plaques wurde für jede Verdünnung der entsprechende Vektortiter errechnet.

Agaroseoverlay:

MEM-Medium, 0,5% Agarose (Seakem GTG, Maine, USA)
0,5% Penicillin/Streptomycin, 0,05% Hefeextrakt, 5% FCS

3.5.12 Titrierung von HC-Ad-Vektoren

Die im Folgenden vorgestellten Methoden zur Titrierung von HC-Ad-Vektoren wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt.

Bestimmung des infektiösen Titers

Zur Bestimmung des infektiösen Titers von HC-Ad-Vektoren wurden HeLa- oder A549-Zellen in 24-Loch-Zellkulturschalen in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ /Vertiefung ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen jeweils in Doppelbestimmung mit 2 μ l, 10 μ l und 20 μ l einer 1:10 - 1:50 Verdünnung des zu titrierenden Vektors in einem Mediumvolumen von 300 μ l infiziert (s. Tabelle 3.2, S. 40) und über Nacht bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit 200 μ l PBS/5 mM EDTA pro Vertiefung überschichtet. Nach Inkubation für 10-15 min bei 37°C wurden die Zellen durch mehrfaches Spülen mit einer Pipette vollständig von dem Kulturgefäß gelöst und in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur Erstellung eines Standards wurden 10 Vertiefungen mit nicht-infizierten Zellen auf gleiche Weise behandelt und nach Überführen in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit geeignetem Plasmidstandard versetzt (5 Konzentrationsstufen mit $1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^8$ Kopien jeweils in Doppelbestimmung). Unmittelbar darauf wurden alle Zellen zur Lyse und Denaturierung der DNA mit 200 μ l 0,8 N NaOH versetzt, kräftig gemischt und 20-30 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysate wurden erneut kräftig gemischt und jeweils 300 μ l in einer Slotblotapparatur (Hoefer, San Francisco, USA) mit einer Vakuumpumpe auf eine positiv geladene Nylonmembran (Pall, Freiburg), äquilibriert in 0,4 N NaOH, geblottet. Die Membran wurde zur Neutralisation überschüssiger NaOH in SSC (2-fach)

geschwenkt und 20-30 min bei 120°C in einem Inkubator gebacken. Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen erfolgten wie in Abschnitt 3.3.14, S. 35 angegeben. Als Sonde diente ein PCR-Produkt des linken adenoviralen ITRs (bp 1-440). Dieses wurde wie beschrieben mit ^{32}P markiert (s. Abschnitt 3.3.14, S. 36). Die Quantifizierung der Signale erfolgte mittels Phosphorimager und der Software ImageQuaNT (Molecular Dynamics, Freiburg). Zur Berechnung der Titer wurde für den Plasmidstandard eine Geradengleichung bestimmt. Der Korrelationskoeffizient wurde mit Microsoft-Excel (Microsoft, München) errechnet.

Bestimmung der Gesamtpartikelzahl mittels Slotblot

Zur Bestimmung der Gesamtpartikelzahl mittels Slotblot wurden in Doppelbestimmung je 2 µl, 10 µl und 20 µl einer 1:300 - 1:1500 Verdünnung des zu titrierenden Vektors in 200 µl PBS/5 mM EDTA in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und zur Lyse der Partikel und Denaturierung der DNA je 200 µl 0,8 N NaOH zugegeben. Zur Erstellung eines Standards wurden in Doppelbestimmung 5 Konzentrationsstufen (s.o.) eines geeigneten Plasmids in 200 µl PBS/5 mM EDTA in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen erstellt und mit je 200 µl 0,8 N NaOH versetzt. Vektor sowie Standard wurden stark gemischt und 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. 300 µl jeder Lösung wurden in einer Slotblotapparatur (Hoefer, San Francisco, USA) mit einer Vakuumpumpe auf eine positiv geladene Nylonmembran (Pall, Freiburg), äquilibriert in 0,4 N NaOH, geblottet. Das weitere Vorgehen entsprach dem im Abschnitt über die Bestimmung des infektiösen Titers beschriebenen.

Bestimmung der Helferviruskontamination mittels Slotblot

Zur Bestimmung der Helferviruskontamination einer gereinigten HC-Ad-Vektor-Präparation wurden je 2 µl, 10 µl und 20 µl des zu titrierenden Vektors unverdünnt oder 1:20 verdünnt (in TBS) eingesetzt und wie zur Bestimmung der Totalpartikelzahl verfahren. Als Sonde wurde ein ^{32}P markiertes PCR-Produkt der Fiber-Region von Ad5 (bp 31042-32390) eingesetzt. Als Standard-Plasmid diente pVB5 [114].

3.6 Arbeiten mit Proteinen

3.6.1 Totalproteinpräparation aus Zellen

Zur Totalproteinpräparation aus adhärennten eukaryotischen Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen, mit PBS/5 mM EDTA bedeckt (1 ml in einer 6-cm-Kulturschale) und 5-15 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch mehrfaches Spülen mit einer Pipette vollständig von der Kulturschale gelöst, die Suspension in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (300xg, 5 min). Anschließend wurden die

Zellen in 100 μ l SDS-Ladepuffer (2-fach) resuspendiert und 10 min bei 96°C in einem Heizblock gekocht. Nach Abkühlen wurde die Suspension zentrifugiert (20000 \times g, 10 min) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Totalproteinsuspension wurde bei -20°C gelagert und unmittelbar vor der SDS-PAGE erneut 5 min bei 96°C in einem Heizblock gekocht.

SDS-Ladepuffer (2-fach):

- 20% Glycerol(v/v), 0,7 M 2-Mercaptoethanol, 4% SDS (w/v),
- 125 mM Tris pH 7,0
- 1 Spatelspitze Bromphenolblau

3.6.2 SDS-PAGE

Zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen wurden 10-12% Polyacrylamidgele verwendet. Die Gele wurden in Gießapparaturen der Firma Bio-Rad (München) hergestellt.

Die Proteinproben (s. Abschnitt 3.6.1, S. 44) wurden 5 min bei 96°C in einem Heizblock denaturiert und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophoresekammern der Firma Bio-Rad (München) in Laufpuffer (1-fach) bei 4°C in einem Kühlraum zunächst bei 70 V, nach Passage der Lauffront durch das Sammelgel bei 100 V.

Trenngel (10%):

- 4 ml 40%Acrylamid/0,8% Bisacrylamid,
- 3,75 ml Tris (1 M pH 8,8), 0,1 ml SDS (10%, w/v),
- 2 ml H₂O, 0,1 ml APS (10%, w/v), 0,01 ml TEMED

Sammelgel (5%):

- 0,5 ml 40%Acrylamid/0,8% Bisacrylamid,
- 0,5 ml Tris (1 M pH 6,8), 0,04 ml SDS (10%, w/v),
- 2,9 ml H₂O, 0,04 ml APS (10%, w/v), 0,005 ml TEMED

Laufpuffer (10-fach):

- 2 M Glycin, 250 mM Tris, 1% SDS

3.6.3 Western-Transfer auf Nitrocellulosemembranen

Zum Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen (Amersham, Freiburg) wurde eine Nasstransferapparatur der Firma Biorad (München) eingesetzt. Der Transfer erfolgte im Kühlraum über Nacht bei 30 V in Transferpuffer.

Transferpuffer:

- 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% Methanol (v/v)

3.6.4 Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrocellulosemembranen

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wurde das „ECL-Detection-Kit“ (Amersham, Freiburg) eingesetzt. Hierbei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Das Blocken der Membran sowie die Inkubationen mit den Antikörpern erfolgten unter Zusatz von 5% Milchpulver und 0,1% Tween-20.

3.7 Tierexperimentelle und immunhistologische Arbeiten

Die tierexperimentellen Arbeiten und zugehörige Analysen wurden in Zusammenarbeit mit U. Schraermeyer und T. Luther (Universitätsaugenklinik, Labor für experimentelle Ophthalmologie, Universität zu Köln) durchgeführt.

3.7.1 Isolierung primärer retinaler Pigmentepithelzellen

Zur Isolierung primärer retinaler Pigmentepithelzellen wurden die Bulbi adulter, pigmentierter Long-Evans-Ratten durch einen 360° Einschnitt an der Ora serrata geöffnet. Die neurale Retina wurde entfernt, die freigelegte RPE-Zellschicht in Trypsinlösung (0,25% Trypsin, 0,02% EDTA) getaucht und 20 min bei 37°C inkubiert. Die RPE-Zellen wurden vorsichtig mit der sterilisierten Spitze einer Pasteurpipette vom Stroma gelöst und in DMEM-Medium bis zu 90% Konfluenz kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Transduktion mit HC-Ad-Vektor.

3.7.2 Subretinale Vektorinjektion

Zwölf Monate alte Wistar-Ratten wurden zunächst mit CO₂ und anschließender intraperitonealer Injektion von Ketanest (Parke-Davis, Morris Plains, New Jersey, USA) für ungefähr 40 min anästhesiert. Nach Applikation von Proparacain-Augentropfen wurde eine laterale Cantothomie durchgeführt. Die Bindehaut wurde am Limbus geöffnet und die angrenzende Kammer punktiert. Die Viruspräparationen oder deren Verdünnungen in TBS wurden in einem Endvolumen von 0,5 µl unter mikroskopischer Kontrolle in den subretinalen Raum injiziert.

3.7.3 Scanning Laser Ophthalmoskopie (SLO)

Vor der SLO-Analyse wurden die Ratten durch Injektion von Ketanest anästhesiert. Nach Applikation mydriatischer Augentropfen erfolgte die Untersuchung mittels SLO (Rodenstock, München). Unter Verwendung eines Fluorescein-Blockierungsfilters und der Anregungswellenlänge von 488 nm wurde die EGFP-Fluoreszenz aufgezeichnet. Ein Infrarotfilter diente als Test für die Spezifität der Fluoreszenz. Die Bilder wurden auf S-VHS aufgezeichnet.

3.7.4 Entnahme transduzierter Augen

Die Augen wurden enukleiert und über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert. Das vordere Segment und die Linse wurden entfernt und das hintere Segment durch radiale Einschnitte in Richtung des optischen Nerven als ganzes Stück präpariert. Nach vorsichtigem Entfernen der neurosensorischen Retina wurde die RPE-Zellschicht unter Anwendung der entsprechenden Filtersets mikroskopisch analysiert.

3.7.5 Anfertigung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie

Zur Anfertigung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie wurden die Augen nach Entfernung der Hornhäute in 4% Paraformaldehyd, 0,1 M Kakodylatpuffer, 100 mM Saccharose (pH 7,4) bei 4°C über Nacht fixiert. Fluoreszierende Bereiche der Präparationen wurden ausgeschnitten, mit 1% OsO₄, 0,1 M Kakodylatpuffer 3 h fixiert, als Ganzes mit Uranylacetat gefärbt, mehrfach in Aceton dehydriert und in Spurr-Harz eingebettet. Es wurden 0,7 µm dicke Schnitte angefertigt, mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und unter einem Elektronenmikroskop (Carl Zeiss 902 A, Jena) betrachtet.

3.7.6 Immunhistochemischer Nachweis von EGFP

Nach Eukleation wurden die Augen in Isopentan eingefroren, Gefrierschnitte angefertigt und diese auf mit 0,05% Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern luftgetrocknet. Die Schnitte wurden in 0,05 M PBS (pH 7,4), 1% Ziegenserum 15 min inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und 30 min in Methanol, 0,3% H₂O₂ inkubiert. Nach mehrfachem Waschen in PBS wurden die Schnitte bei 4 °C über Nacht in polyklonalem Antiserum gegen EGFP aus Hase (Dianova, Hamburg) verdünnt in PBS (1:200) inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Der zweite Antikörper (Cy3-gekoppelter anti-Hase-IgG) wurde 1:800 in PBS verdünnt und hierin die Schnitte 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen, die Schnitte dehydriert und in Entellan eingebettet (EM Science, Darmstadt). Zur Analyse wurden sowohl EGFP-spezifische Filter, als auch Cy3-spezifische Filter verwendet. Überlagerungen von Fotos desselben Gewebeausschnittes erzeugt mit den beiden Filtersätzen wurden per Software erstellt (Openlab). Als Kontrolle dienten Schnitte, die nicht mit anti-EGFP-Antikörper behandelt wurden.

3.7.7 Immunologische Assays

Die vollständigen, Paraformaldehyd-fixierten Retinas wurden viermal für 10 min in 0,05 M TBS-Lösung gewaschen. Zum Blockieren wurden die Retinas 10 min mit 0,5 M NH₄Cl, 0,25% Triton und zweimal 60 min mit 0,5 M TBS, 5% bovines Serumalbumin (Fraktion V, Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Zur Detektion von Makrophagen, Monozyten oder dendritischen Zellen wurde der Antikörper T3003 (BMA, Augst, Schweiz) eingesetzt. Zur

3 Material und Methoden

Detektion von T-Zellen wurde der Antikörper KiTiR (BMA, Augst, Schweiz) verwendet. Beide Antikörper wurden 1:50 in TBS verdünnt und die Retina-Präparate über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen in TBS wurde 1 h mit einer 1:800 Verdünnung eines Cy3-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers (Dianova, Hamburg) gefärbt und die Präparate mit einem Rhodaminfilter mikroskopisch analysiert.

4 Ergebnisse - Teil I

4.1 DNA-basierte Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen

Eine HC-Ad-Vektorpräparation enthält nach der Reinigung über CsCl-Dichtegradienten neben infektiösen und nicht-infektiösen HC-Ad-Vektorpartikeln auch Helferviruspartikel. Zur vollständigen Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen muss daher (1) eine Bestimmung der Gesamtpartikelzahl, bestehend aus der Summe infektiöser und nicht-infektiöser Partikel, (2) eine Bestimmung des Anteils infektiöser Partikel und (3) eine Bestimmung der Kontamination mit Helferviruspartikeln erfolgen. Bislang existieren zur Ermittlung dieser drei Parameter nur unzureichende Methoden.

4.1.1 Bestimmung des infektiösen Titers

Zur Bestimmung des infektiösen Titers einer HC-Ad-Vektorpräparation wurde ein DNA-basierter Assay („Slotblot“) entwickelt. Ziel dieser Entwicklung war ein leicht standardisierbarer Assay, der eine Bestimmung des infektiösen Titers von HC-Ad-Vektoren auf DNA-Ebene, unabhängig von der Expression eines Reportergens erlaubt. Dieser Assay beruht auf Infektion einer Referenzzelllinie mit verschiedenen Volumina der zu testenden Vektorpräparation, anschließender Lyse der Zellen, Immobilisierung der freigesetzten Vektor-DNA auf einer Nylonmembran und deren Quantifizierung durch Hybridisierung mit einer vektorspezifischen Sonde sowie Vergleich der Signalintensität mit Plasmid-DNA bekannter Konzentration. Im Folgenden werden zunächst die technischen Voraussetzungen für einen solchen Assay beschrieben, die sich zum Teil aus Vorexperimenten und zum Teil aus der Literatur ergeben. Es wird ein standardisiertes Protokoll zur Bestimmung des infektiösen Titers von HC-Ad-Vektorpräparationen präsentiert und an einem Beispiel demonstriert. Schließlich erfolgt eine experimentelle Bewertung von Reportergen-Assays und deren Abgrenzung vom Slotblot-Assay.

Technische Voraussetzungen

Referenzzelllinie Als Referenzzelllinien dienten HeLa- oder A549-Zellen. Beide Zelllinien weisen eine hohe Suszeptibilität für Ad5 auf, ermöglichen die Replikation von HC-Ad-Vektoren nicht und werden zur Charakterisierung von adenoviralen Vektoren der

ersten Generation eingesetzt [37]. Als Kulturgefäß wurden 24-Loch-Kulturschalen mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ /Vertiefung gewählt. Diese Zellzahl erlaubt den Einsatz von nur geringen Vektormengen bei gleichzeitig verlässlichem Nachweis der intrazellulären Vektor-DNA nach Infektion der Referenzzellen.

Infektion der Referenzzellen Die Infektion der Referenzzellen sollte in reduziertem Volumen erfolgen, um eine möglichst optimale Infektionseffizienz zu erzielen [43]. Dieses Volumen wurde für die verwendeten Kulturgefäße mit einer Fläche von 2 cm^2 mit $300 \mu\text{l}$ bestimmt. In diesem reduzierten Volumen können die Zellen ohne Nachteile für die Dauer der Infektion von 12-16 h verbleiben. Diese Infektionsdauer gewährleistet, dass über 96% der infektiösen Partikel einer Vektorpräparation tatsächlich in die Zellen gelangen [43], andererseits aber eventuelle Verluste durch bereits erfolgte Zellteilungen gering bleiben.

Waschen und Ernte der Zellen Nach Abschluss der Infektion sollten die Zellen gut gewaschen werden, um nicht-infektiöses Virus zu entfernen. Virale Partikel, die nicht-infektiös sind, aber dennoch DNA enthalten, würden ansonsten einen scheinbar erhöhten infektiösen Titer verursachen. Das Waschen erfolgte gemäß Greber [115] mit zweimal 1 ml auf 37°C erwärmtem PBS für 5 min. Greber *et al* konnten zeigen, dass 80% des an Zellen gebundenen Virus innerhalb von 20 min internalisiert werden [115]. Die restlichen Partikel werden wieder ins Medium abgegeben, weshalb sie leicht durch Waschen mit PBS entfernt werden können [115]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass nach gründlichem Waschen der Zellen nur ein kleiner Fehler in der Titerbestimmung durch zellgebundenes, aber nicht internalisiertes Virus entsteht.

Die Zellen konnten leicht durch Inkubation in $200 \mu\text{l}$ PBS/5 mM EDTA (10 min, 37°C) von dem Kulturgefäß abgelöst und zur Lyse in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt werden.

Lyse der infizierten Zellen In Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass die infizierten Zellen durch Inkubation in 0,4 N NaOH für 20 min unter gelegentlichem starkem Mischen auf einfache Weise vollständig lysiert werden können. Die Kontrolle der Lyse erfolgte lichtmikroskopisch. Diese Methode bietet zugleich den Vorteil, dass Zelllyse und Denaturierung der DNA in einem Arbeitsschritt erfolgen. Somit konnte ohne weiteren Arbeitsschritt ein Aliquot des Lysates für den Transfer auf die Nylonmembran verwendet werden. Alternative Lysemethoden wie Sonifizierung oder Lyse der Zellen auf Membranen erwiesen sich im Vergleich als technisch zu aufwändig oder unzuverlässig.

Transfer auf Nylonmembranen Der Transfer der Zelllysate und damit der freigesetzten Vektor-DNA auf Nylonmembranen erfolgte in einer Slotblotapparatur der Firma Hoefer (San Francisco, USA). Hierbei erwies es sich als vorteilhaft, 50-75% des Lysatvolumens pro Schlitz zu transferieren, da diese Menge den Durchfluss nicht verstopft,

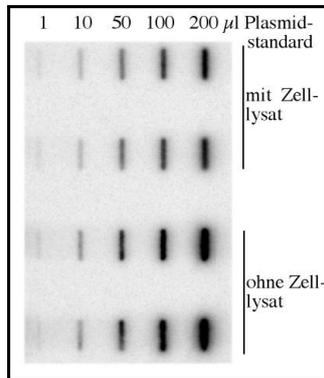


Abbildung 4.1: Plasmid-DNA als Standard, aufgetragen mit Zelllysat von je $1 \cdot 10^5$ HeLa-Zellen (obere Hälfte) und ohne Zelllysat (untere Hälfte). Plasmid-DNA, die ohne Zelllysat aufgetragen wird ergibt stärkere Signale. Standard-Plasmid ist das infektiöse Plasmid pVB5 (36 kB, kodierend für einen Erstgenerationsvektor) [114] in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Kopien/ μ l. Als 32 P-markierte Sonde dienen die linken 440 bp von Ad5.

aber ausreichende Signalintensitäten liefert. Es erwies sich nach erfolgtem Transfer als notwendig, die Membran durch Schwenken in $2xSSC$ zu neutralisieren. Dies verhindert beim Erhitzen lokale Aufkonzentrierungen von NaOH-Resten, die zu lokaler Hydrolyse der DNA führen können.

Plasmid-DNA als Mengenstandard Der Einsatz von Plasmid-DNA als Standard hat zwei Voraussetzungen. Erstens muss die genaue Konzentration der verwendeten DNA-Lösung bekannt sein. Diese wurde für mindestens 5 Konzentrationsstufen in Mehrfachbestimmungen per Messung der OD_{260} ermittelt. Zweitens müssen Plasmid-DNA und aus lysierten Zellen freigesetzte Vektor-DNA unter gleichen Bedingungen auf die Nylonmembran transferiert werden. Abbildung 4.1, S. 51 zeigt, dass hierfür das Mischen der Standard-DNA mit nicht-infizierten Kontrollzellen und deren anschließende Lyse in $0,4$ N NaOH notwendig sind. Der Transfer von Standard-DNA in $0,4$ N NaOH ohne Zelllysat lieferte um Faktor 2-5 stärkere Signale, als die gleiche DNA-Menge in Zelllysat (s. Tabelle 4.1, S. 52). Dies ist wahrscheinlich auf eine Verkleinerung der Interaktionsfläche zwischen DNA und Nylonmembran durch Zellfragmente und/oder eine Absättigung der DNA-Bindungskapazität der Membran durch genomische DNA zurückzuführen.

Da die nach der Zelllyse freigesetzte adenovirale DNA linear ist, wurde in weiteren Vorexperimenten geprüft, ob sich lineare und zirkuläre Standard-DNA in diesem Assay unterschiedlich verhalten. Hierzu wurde der pBluescript-Anteil der Standardplasmide pVB5 (infektiöses Plasmid, kodierend für einen Erstgenerationsvektor) [114] und pFrt-

Tabelle 4.1: Vergleich der Signalintensitäten bei Auftrag von Plasmid-DNA mit und ohne Zellysat. Die mittels Phosphorimager ermittelten Signalintensitäten der Membran in Abbildung 4.1, S. 51 wurden für jede Konzentrationsstufe gemittelt und zur statistischen Abschätzung für die sich ergebenden Reihen der Korrelationskoeffizient bestimmt. Die Signalintensitäten ohne Zellysat liegen um Faktor 2-5 höher als mit Zellysat. AU sind willkürliche Einheit der Signalintensität vom Phosphorimager.

Volumen	AU-Mittelwert ohne Zellysat	AU-Mittelwert mit Zellysat
10 μ l	22603	12318
50 μ l	146663	65416
100 μ l	404094	147052
200 μ l	1053595	232547
Korrelationskoeffizient r	0,990	0,991

#39 (Shuttle-Plasmid für einen HC-Ad-Vektor) durch Verdau mit *SwaI* (pVB5) und *PmeI* (pFrt#39) entfernt und so freie Ad5-ITR-Enden erzeugt. Abbildung 4.2, S. 53 zeigt den Einsatz der so behandelten Plasmide als Standard-DNA parallel zu ihren zirkulären Gegenstücken. Die Auswertung der Signalintensitäten am Phosphorimager erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen zirkulärem oder linearem Plasmid oder zwischen pVB5 und pFrt#39.

Wahl einer geeigneten Sonde Für den Nachweis der immobilisierten Vektor-DNA auf den Nylonmembranen sollte eine universelle Sonde gewählt werden. Als Grundlage hierfür boten sich die linken 440 bp von Ad5 an. Diese sind nicht in den Referenzzelllinien, aber spezifisch in allen HC-Ad-Vektoren sowie Erstgenerationsvektoren enthalten und transkriptionell nicht aktiv. Des Weiteren enthält diese Region den ITR von Ad5 und hybridisiert somit bei allen Erstgenerations- und HC-Ad-Vektoren auch mit dem rechten Terminus, was die Sensitivität des Assays erhöht.

Entwicklung eines standardisierten Protokolls

Auf der Basis der Vorexperimente sowie den statistischen Maßgaben, dass die Titerbestimmung aus 6 Einzelmesspunkten über 3 Konzentrationsstufen in Doppelbestimmung zu erfolgen hat und mindestens 4 Standard-Plasmid-Konzentrationen in Doppelbestimmung für die Bestimmung einer Standardgeraden zu Grunde zu legen sind, wurde das nachfolgende Protokoll entwickelt.

HeLa- oder A549-Zellen werden in 24-Loch-Kulturschalen in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ /Vertiefung ausgesät. Am darauf folgenden Tag werden die Zellen jeweils in Doppelbestim-

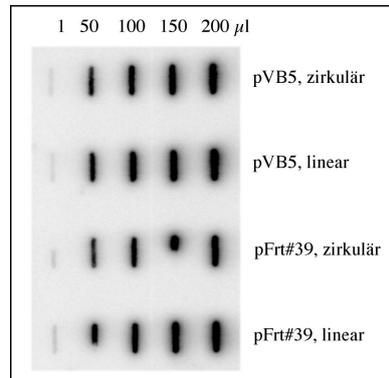


Abbildung 4.2: Zirkuläre und lineare Plasmid-DNA als Standard. Die Plasmide pVB5 (36 kB) und pFrt#39 (30 kB) beinhalten jeweils die linken 440 bp und rechten 200 bp von Ad5. pVB5 wurde mit *Swa*I linearisiert, pFrt#39 mit *Pme*I, um die adenoviralen Enden freizusetzen. Die Konzentrationen betragen jeweils $1 \cdot 10^5$ Kopien/ μ l. Als 32 P-markierte Sonde dienten die linken 440 bp von Ad5. Die Auswertung der Signalintensitäten am Phosphorimager erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen pFrt#39 und pVB5 in linearer und zirkulärer Form sowie untereinander.

mung mit 2 μ l, 10 μ l und 20 μ l einer 1:10 - 1:50 Verdünnung des zu titrierenden Vektors in einem Mediumvolumen von 300 μ l infiziert und über Nacht bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit je 1 ml auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen und mit 200 μ l PBS/5 mM EDTA pro Vertiefung überschichtet. Nach Inkubation für 10-15 min bei 37°C werden die Zellen durch mehrfaches Spülen mit einer Pipette vollständig von dem Kulturgefäß gelöst und in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur Erstellung eines Standards werden 10 Vertiefungen mit nicht-infizierten Zellen auf gleiche Weise behandelt und nach Überführen in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit geeignetem Plasmidstandard versetzt (5 Konzentrationsstufen mit $1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^8$ Kopien jeweils in Doppelbestimmung). Unmittelbar darauf werden alle Zellen zur Lyse und Denaturierung der DNA mit 200 μ l 0,8 N NaOH versetzt, kräftig gemischt und 20-30 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysate werden erneut kräftig gemischt und jeweils 300 μ l in einer Slotblotapparatur (Hoefer, San Francisco, USA) mit einer Vakuumpumpe auf eine positiv geladene Nylonmembran (Pall, Freiburg), äquilibriert in 0,4 N NaOH, geblottet. Die Membran muss zur Neutralisation überschüssiger NaOH in SSC (2-fach) geschwenkt und schließlich 20-30 min bei 120°C in einem Inkubator gebacken werden. Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen erfolgten wie in Abschnitt 3.3.14, S. 35 angegeben. Als universelle Sonde dient ein PCR-Produkt des linken adenoviralen ITRs (bp 1-440). Dieses wird wie beschrieben mit 32 P markiert (s. Abschnitt 3.3.14, S. 36).

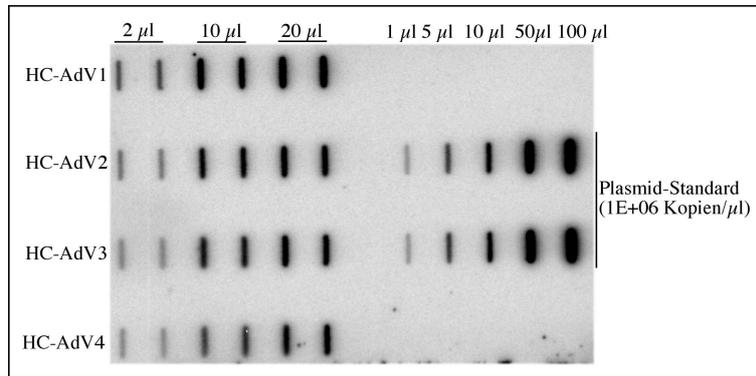


Abbildung 4.3: Bestimmung des infektiösen Titers von vier unterschiedlichen HC-Ad-Vektorpräparationen (HC-AdV1 bis HC-AdV4). Die Vektoren wurden 1:20 in TBS verdünnt und die bezeichneten Volumina für die Infektion verwendet. Standard-Plasmid war pFrt#39. Als Sonde wurden die linken 440 bp von Ad5 verwendet (^{32}P -markiert).

Die Quantifizierung der Signale erfolgt mit einem Phosphorimager und der zugehörigen Software.

Exemplarische Bestimmung des infektiösen Titers

Slotblot für infektiöse Partikel Abbildung 4.3, S. 54 zeigt ein typisches Ergebnis einer Titerbestimmung für vier unterschiedliche HC-Ad-Vektoren nach diesem Protokoll.

Standardgerade. Die mittels Phosphorimager quantifizierten Signale der Membran wurden für die exakte Titerbestimmung zu Grunde gelegt. Hierzu wurde zunächst mithilfe der Signale für das Standardplasmid auf der Basis der allgemeinen Geradengleichung

$$y = mx + b$$

die Geradengleichung für eine Standardgerade erstellt, wobei m die Steigung der Geraden sowie b den Ordinatenabschnitt bezeichnen. Abbildung 4.4, S. 55 zeigt die zu Abbildung 4.3 gehörende Standardgerade und die berechneten Parameter der Geradengleichung.

Titerberechnung Die mit der ermittelten Geradengleichung bestimmten Titer für die gezeigten HC-Ad-Vektoren sind in Tabelle 4.2, S. 55 wiedergegeben. Die der Titerberechnung zu Grunde liegenden Signalintensitäten lagen alle im Bereich des Standardplasmides. Für jede Doppelbestimmung wurde das arithmetische Mittel berechnet.

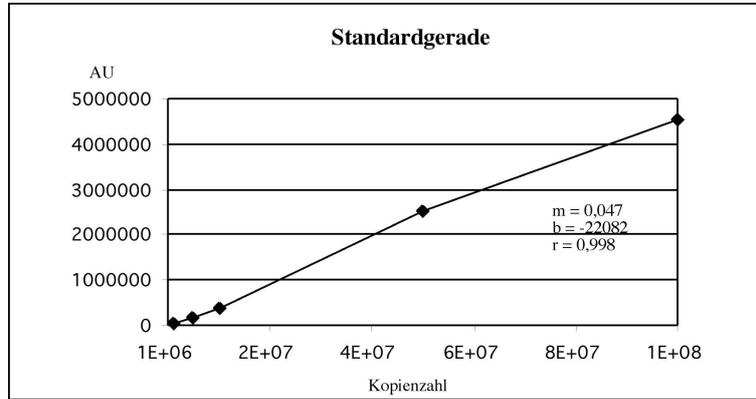


Abbildung 4.4: Ermittlung der Geradengleichung der Standardgeraden. m ist die Steigung, b der Ordinatenabschnitt und r der Korrelationskoeffizient. AU sind willkürliche Einheiten für die vom Phosphorimager ermittelte Signalstärke.

Tabelle 4.2: Berechnete Titer der Vektoren HC-AdV1 - HC-AdV4. i.p.: infektiöse Partikel

Vektor	Titer
HC-AdV1	$1,4 \pm 0,2 \cdot 10^7$ i.p./ μ l
HC-AdV2	$7,8 \pm 1,2 \cdot 10^6$ i.p./ μ l
HC-AdV3	$6,6 \pm 0,4 \cdot 10^6$ i.p./ μ l
HC-AdV4	$5,5 \pm 0,9 \cdot 10^6$ i.p./ μ l

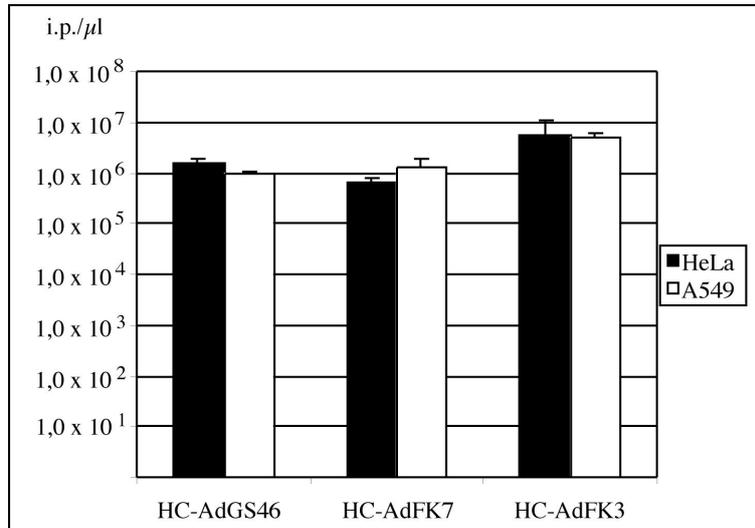


Abbildung 4.5: Vergleich des infektiösen Titers bestimmt mittels Slotblot mit HeLa und A549-Zellen. HC-AdGS46 exprimiert β -gal, HC-AdFK7 exprimiert *EGFP*. HC-AdFK3 trägt kein Reporter-gen. Die bestimmten Titer zeigen für alle drei Vektoren keine Unterschiede bei Verwendung von A549 oder HeLa-Zellen. i.p.: infektiöse Partikel

4.1.2 Vergleich zwischen Reporter-gen-Assays und Slotblot zur Titerbestimmung

Die Titerbestimmung viraler Vektoren erfolgt häufig mithilfe von Reporter-genen. Diese stellen entweder das Transgen des Vektors dar, oder man macht sich virale Gene für einen Reporter-gen-Assay zu nutze. Zum Vergleich zwischen einem Reporter-gen-Assay zur Titerbestimmung und dem vorgestellten Slotblot-Verfahren wurden ein *EGFP*-exprimierender HC-Ad-Vektor (HC-AdFK7) und ein β -gal exprimierender HC-Ad-Vektor (HC-AdGS46) eingesetzt. Mittels Slotblot wurde zunächst für diese beiden Vektoren sowie einen weiteren (HC-AdFK3), der kein Reporter-gen trägt, eine Titerbestimmung sowohl mit A549- als auch mit HeLa-Zellen durchgeführt. Abbildung 4.5, S. 56 zeigt die Ergebnisse der Titerbestimmung als Gegenüberstellung für die beiden Zelllinien. Erwartungsgemäß ergeben sich für die einzelnen Vektoren unter Verwendung von A549- oder HeLa-Zellen die gleichen Titer.

Mit den Vektoren HC-AdGS46 und HC-AdFK7 wurde ein Reporter-gen-Assay durchgeführt. Hierzu wurden HeLa-, A549- und 293-Zellen in 24-Loch-Kulturschalen in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ /Vertiefung ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 0,05, 0,1, 0,5, 1 und 5 MOI jeweils in Duplikaten infiziert. Die MOI wurden auf Grundlage der mit A549-Zellen bestimmten Slotblot-Titer berechnet (s. Abbildung 4.5, S. 56). Nach

48 h wurden die *EGFP*-exprimierenden Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop gezählt beziehungsweise eine β -gal-Färbung und anschließende Zellzählung vorgenommen. In HeLa-Zellen ergab die Färbung zum Nachweis der Expression von β -gal im Gegensatz zur homogenen Färbung von A549-Zellen nur schwache blaue Punkte. Dieses Färbeprofil erlaubte keine zuverlässige und reproduzierbare Zählung der positiven Zellen. Auch eine mehrfache Wiederholung des Experimentes brachte keine Verbesserung. Auf Grund der schlechten Reproduzierbarkeit der erhaltenen Daten zeigt Abbildung 4.6, S. 58 die Ergebnisse für A549 und 293 Zellen. Der mit A549-Zellen per Reporteragen-Assay ermittelte Titer ist vierfach (HC-AdFK7) bis vierzehnfach (HC-AdGS46) niedriger als der korrespondierende Slotblot-Titer. Um Sensitivitätsprobleme bei der manuellen Zählung der positiven Zellen auszuschließen, wurden erneut A549-Zellen mit HC-AdFK7 infiziert und nach 48 Stunden die Zahl *EGFP*-exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei wurden im Mittel um Faktor 3,2 weniger positive Zellen ermittelt, als auf Grund des Slotblot-Titers zu erwarten gewesen wäre. Somit scheinen Sensitivitätsschwierigkeiten nur für einen kleinen Anteil der Unterschiede zwischen Slotblot- und Reporteragen-basiertem Titer verantwortlich zu sein.

Der mit 293-Zellen per Reporteragen-Assay ermittelte Titer ist dreifach (HC-AdFK7) bis sechsunndreissigfach (HC-AdGS46) höher als der entsprechende mit A549-Zellen und Reporteragen-Assay ermittelte Titer.

Diese Experimente zeigen deutlich eine starke Variabilität der Reporteragen-Assays in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie und dem verwendeten Vektor. In HeLa-Zellen war ein zuverlässiger Reporteragen-Assay im Falle des Vektors HC-AdGS46 nicht durchführbar. Der Slotblot-Assay hingegen liefert mit den beiden verwendeten Referenzzelllinien unabhängig von einer Reporteragen-Expression reproduzierbare Ergebnisse. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der vorgestellte Assay sich auch zum Vergleich der Suszeptibilität verschiedener Zelltypen für Ad5-basierte Vektoren eignet.

4.1.3 Bestimmung der Gesamtpartikelzahl

Präparationen adenoviraler Vektoren enthalten immer einen 5- bis 200-fach höheren Anteil nicht-infektiöser Partikel als infektiöse Partikel. Für eine vollständige Charakterisierung einer Vektorpräparation muss daher das Verhältnis aus nicht-infektiösen zu infektiösen Partikeln, die sogenannte inverse Bioaktivität, bestimmt werden. Die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) definiert als Mindestkriterium für den Einsatz einer adenoviralen Vektorpräparation in klinischen Studien eine inverse Bioaktivität von höchstens 30 [116]. Der vorgestellte Slotblot-Assay kann mit leichten Variationen auch zur Bestimmung der Gesamtpartikelzahl und somit zur Bestimmung der inversen Bioaktivität herangezogen werden. Das entwickelte Protokoll basiert darauf, dass adenovirale Partikel bei pH-Werten größer 9 instabil sind und die enthaltene DNA freigesetzt wird [42][117]. Es werden exemplarisch die Ergebnisse der notwendigen Vorexperimente gezeigt, ein standardisiertes Protokoll zur Bestimmung der Zahl der Gesamt-

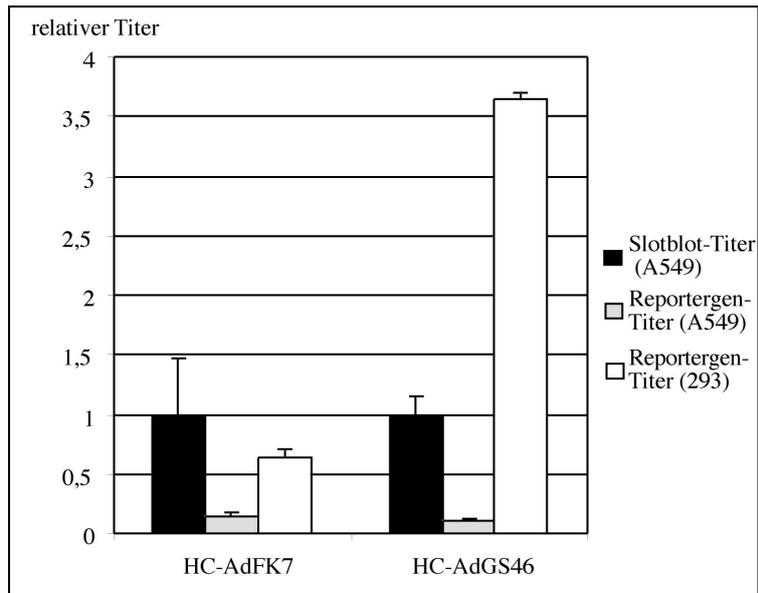


Abbildung 4.6: Vergleich zwischen Reporter- und Slotblot-Titern. Der Slotblot-Titer für HC-AdFK7 und HC-AdGS46 wurde mit A549-Zellen bestimmt und gleich 1 gesetzt. Die Titer, die mit dem jeweiligen Reporter- Assay mit A549- und 293-Zellen ermittelt wurden, sind als relative Titer im Vergleich zum Slotblot-Titer dargestellt. Der mit A549-Zellen per Reporter- Assay ermittelte Titer ist vierfach (HC-AdFK7) bis vierzehnfach (HC-AdGS46) niedriger als der korrespondierende Slotblot-Titer. Der mit 293-Zellen per Reporter- Assay ermittelte Titer ist dreifach (HC-AdFK7) bis sechsunddreissigfach (HC-AdGS46) höher als der entsprechende mit A549-Zellen und Reporter- Assay ermittelte Titer.

partikel eingeführt, die mit diesem Protokoll ermittelten Gesamtpartikel-Titer einiger Vektoren vorgestellt und das Verfahren zu anderen Methoden der Gesamtpartikelbestimmung abgegrenzt.

Vorexperimente

In Vorexperimenten konnte zunächst gezeigt werden, dass mittels CsCl-Dichtegradient gereinigte HC-Ad-Vektor-Präparationen nur einen sehr geringen Anteil freier Vektor-DNA enthalten. Hierzu wurde vor Lyse der Partikel in NaOH ein Verdau mit DNase I vorgenommen und die so behandelten Partikel parallel zu unbehandelten Partikeln lysiert und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Signalintensitäten bei Verdau mit DNase I lagen hier bei im Mittel 92%-96% der Intensitäten ohne DNase I-Verdau. Somit sind die Vektorpräparationen nicht mit für den Assay bedeutenden Mengen freier DNA kontaminiert und die mit dem Verfahren bestimmten Gesamtpartikelzahlen entsprechen der Zahl vollständiger, d.h. DNA-enthaltender Partikel.

Standardisiertes Protokoll zur Bestimmung der Gesamtpartikelzahl

Die Vektorpräparationen werden 1:300 bis 1:1500 in TBS verdünnt. Jeweils in Doppelbestimmung werden 2 µl, 10 µl und 20 µl in ein Gesamtvolumen von je 200 µl PBS/5 mM EDTA in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Für den Plasmid-Standard werden in Doppelbestimmung jeweils $1 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^8$ Kopien in mindestens 4 Konzentrationsstufen in demselben Volumen PBS/5mM EDTA in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorbereitet. Die verdünnten Vektorpräparationen sowie die Plasmid-Standards werden mit jeweils 200 µl 0,8 N NaOH versetzt, kräftig gemischt und 20 min bei RT lysiert. Die Lysate werden erneut kräftig gemischt und jeweils 300 µl in einer Slotblotapparatur (Hoefer, San Francisco, USA) mit einer Vakuumpumpe auf eine positiv geladene Nylonmembran (Pall, Freiburg), äquilibriert in 0,4 N NaOH, transferiert. Das weitere Vorgehen entspricht dem zur Bestimmung infektiöser Partikel. Als universelle Sonde eignen sich auch für diesen Assay die linken 440 bp von Ad5.

Exemplarische Bestimmung der Gesamtpartikelzahl

Tabelle 4.3, S. 60 zeigt ein typisches Ergebnis einer Bestimmung der Gesamtpartikelzahl, die nach obigem Protokoll erfolgte. Des Weiteren ist die berechnete inverse Bioaktivität gezeigt. Diese Daten belegen, dass sich mit dem präsentierten Verfahren auf einfache Art und Weise auch eine Bestimmung der Gesamtpartikelzahlen vornehmen lässt. Die berechneten Daten über die inverse Bioaktivität liegen innerhalb des für adenovirale Vektoren bekannten Bereiches [116].

Das präsentierte Verfahren ist das erste, das die Bestimmung von infektiösem Titer und die Bestimmung der Gesamtpartikelzahl in einem Arbeitsgang mit der gleichen Methodik erlaubt.

Tabelle 4.3: Bestimmung von Gesamtpartikel-Titern mittels Slotblot und Berechnung der inversen Bioaktivität. Die inverse Bioaktivität berechnet sich aus dem Verhältnis Gesamtpartikel zu infektiösen Partikel einer Vektorpräparation. i.p.: infektiöse Partikel; t.p.: Gesamtpartikelzahl

Vektor	infekt. Titer	Gesamtpartikel-Titer	inverse Bioaktivität
	i.p./ μl	t.p./ μl	
HC-AdFK3	$5,3 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^8$	36
HC-AdFK7	$9,6 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^7$	60
HC-AdGS46	$1,5 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^7$	31
HC-AdV5	$4,8 \cdot 10^7$	$6,7 \cdot 10^8$	14
HC-AdV6	$1,2 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^8$	14

Vergleich zwischen physikalischen Methoden und Slotblot zur Gesamtpartikelzahlbestimmung

Die am häufigsten verwendete physikalische Methode zur Bestimmung von Partikelzahlen in adenoviralen Vektorpräparationen wurde von Maizel *et al.* entwickelt [42]. Sie beruht auf Lyse der Partikel in 0,5% SDS und anschließender Messung der OD_{260} . Der für die nachfolgende Berechnung der Partikelzahl aus der OD_{260} benötigte Extinktionskoeffizient ϵ wurde rechnerisch zu $\epsilon_{260} = 9,09 \cdot 10^{-13} \text{ ml}(\text{cm vp})^{-1}$ bestimmt [42]. Es existieren parallel mehrere Extinktionskoeffizienten, der genannte ist der am häufigsten eingesetzte. Zum Vergleich zwischen dieser physikalischen Methode und dem Slotblot-Assay zur Bestimmung der Gesamtpartikelzahl wurden Aliquots von HC-Ad-Vektorpräparationen in PBS/0,5% SDS bei 37°C 15 min im Wasserbad lysiert und die OD_{260} bestimmt. Die Zahl der viralen Partikel/ml wurde gemäß Lambert-Beer mit $\epsilon_{260} = 9,09 \cdot 10^{-13} \text{ ml}(\text{cm vp})^{-1}$ zu $OD_{260} \cdot 1,1 \cdot 10^{12} \cdot F$ berechnet, wobei F den Verdünnungsfaktor darstellt. Tabelle 4.4, S. 61 zeigt die Ergebnisse im Vergleich zu den mittels Slotblot ermittelten Partikelzahlen. Es wird deutlich, dass die physikalische Bestimmung über die OD_{260} die höchsten Werte liefert. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur [43], die zeigen, dass die Partikelzahlen, die mit dieser Methode bestimmt werden, durchweg die höchsten sind. Die Anwendung eines anderen Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 2,75 \cdot 10^{-12} \text{ ml}(\text{cm vp})^{-1}$ würde bereits dreifach niedrigere Partikelzahlen ergeben [43].

4.1.4 Bestimmung der Helferviruskontamination

Zusätzlich zu den gewünschten HC-Ad-Vektorpartikeln enthalten HC-Ad-Vektorpräparationen, die basierend auf dem cre/loxP [26] oder FLPe/Frt-System [118] erzeugt sind, auch Helferviruspartikel, die sich im CsCl-Dichtegradienten nicht vollständig abtrennen

Tabelle 4.4: Vergleich zwischen Gesamtpartikelzahlen bestimmt per OD₂₆₀ und Slotblot-Assay. Die physikalische Bestimmung liefert die höchsten Partikelzahlen.

Vektor	Partikel/ μ l	Partikel/ μ l	Verhältnis
	Slotblot	OD ₂₆₀	OD ₂₆₀ /Slotblot
HC-AdFK3	$1,9 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$	5
HC-AdFK7	$5,8 \cdot 10^7$	$3,8 \cdot 10^8$	7
HC-AdGS46	$4,7 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^8$	13

lassen. Diese Kontamination sollte sich, ebenso wie die Bestimmung des infektiösen Titers und der Gesamtpartikelzahl, mittels Slotblot nachweisen lassen. Der Nachweis dieser Helferviruspartikel gelingt auf einfache Weise mit einer Sonde, die spezifisch für Sequenzen des Helfervirus ist. So läßt sich die Gesamtzahl der Helferviruspartikel bestimmen und ihr prozentualer Anteil an der Zahl der Gesamtpartikel errechnen. Hierzu wurde das folgende standardisierte Protokoll entwickelt.

Standardisiertes Protokoll zur Bestimmung der Helferviruskontamination

Die Vektorpräparationen werden 1:20 in TBS verdünnt oder unverdünnt eingesetzt. Jeweils in Doppelbestimmung werden 2 μ l, 10 μ l und 20 μ l in ein Gesamtvolumen von je 200 μ l PBS/5 mM EDTA in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Für den Plasmid-Standard werden in Doppelbestimmung jeweils $1 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^8$ Kopien in mindestens 4 Konzentrationsstufen in demselben Volumen PBS/5mM EDTA in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorbereitet. Die so verdünnten Vektorpräparationen sowie die Plasmid-Standards werden mit jeweils 200 μ l 0,8 N NaOH versetzt, kräftig gemischt und 20 min bei RT lysiert. Die Lysate werden erneut kräftig gemischt und jeweils 300 μ l in einer Slotblotapparatur (Hoefler, San Francisco, USA) mit einer Vakuumpumpe auf eine positiv geladene Nylonmembran (Pall, Freiburg), äquilibriert in 0,4 N NaOH, transferiert. Das weitere Vorgehen entspricht dem zur Bestimmung infektiöser Partikel. Als Sonde zum Nachweis von Helfervirus-DNA eignet sich eine 1300 bp PCR-Fragment des Fiber-Gens von Ad5 (bp 31042-32390). Bei der Wahl des Plasmides für den Mengenstandard muss ein Plasmid wie pVB5 verwendet werden, dass auch die Ad5-Fibersequenz beinhaltet [114].

Exemplarische Bestimmung der Helferviruskontamination

Tabelle 4.5, S. 62 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Bestimmung der Helferviruskontamination für verschiedene HC-Ad-Vektorpräparationen. Die mit diesem Verfahren bestimmte Helferviruskontamination liegt im Bereich von ca. 1%. Für HC-AdFK3 sowie HC-AdFK7 wurden darüber hinaus Plaque-Assays zur Bestimmung der Helferviruskon-

Tabelle 4.5: Exemplarische Bestimmung der Helferviruskontamination.

Vektor	Partikelzahl/ μl Slotblot	Helfervirus-Partikel/ μl Slotblot	Kontamination
HC-AdFK3	$1,9 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^6$	0,7%
HC-AdFK7	$5,8 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^6$	2,0%
HC-AdGS46	$4,7 \cdot 10^7$	$9,4 \cdot 10^5$	2,0%
HC-AdV5	$6,7 \cdot 10^8$	$6,7 \cdot 10^6$	1,0%

tamination mit 293-Zellen durchgeführt. Im Falle von HC-AdFK3 konnten keine Plaques erhalten werden, im Falle von HC-AdFK7 wurde so eine Helferviruskontamination von <0,1% ermittelt.

4.1.5 Zusammenfassung für die Entwicklung des Slotblot-Assays

- Der Slotblot-Assay erlaubt erstmals die Bestimmung der infektiösen Titer von HC-Ad-Vektorpräparationen auch ohne Einsatz von Reportergenen. Reportergen-Assays sind für die Mehrzahl therapeutisch einzusetzender Vektoren auf Grund von Toxizität und Immunogenität nicht wünschenswert. Indirekte Titerbestimmungen über den Nachweis von sezernierten Proteinen sind nur bei einer kleinen Zahl von Vektoren verfügbar und weisen viele mögliche Fehlerquellen auf.
- Der Slotblot-Assay erlaubt eine genaue Bestimmung der Zahl der infektiösen Partikel einer HC-Ad-Vektorpräparation anhand von Kopienzahlen, die nach Infektion einer Referenzzelllinie in den Zellen gefunden werden können. Diese Zahl ist auf Zellseite ausschließlich von der Suszeptibilität der verwendeten Zelllinie abhängig. Schwankungen in Reportergen-Assays, die auf Grund unterschiedlicher starker transkriptioneller Aktivität von Promotoren zwischen verschiedenen Zelllinien auftreten können, spielen keine Rolle. Auch Schwankungen in der Expressionsstärke von Vektoren, die alleine durch Orientierung und Lokus der Expressionskassette verursacht sein können, spielen im Slotblot-Assay keine Rolle.
- Mit derselben Methodik und in einem Arbeitsgang kann mit dem Slotblot-Assay eine Bestimmung der Gesamtpartikelzahl vorgenommen und die inverse Bioaktivität berechnet werden. Der Slotblot-Assay ist physikalischen Methoden vorzuziehen, da er im Gegensatz zur OD_{260} unabhängig von der eingesetzten Reinigungsmethode verlässliche, DNA-basierte Werte liefert.
- Der Slotblot-Assay erlaubt durch Wahl der geeigneten Sonde eine Bestimmung der Helferviruskontamination ohne funktionellen (Plaque-) Assay. Auch auf Grund der

üblicherweise niedrigen Helferviruskontamination der Präparationen scheinen diese fehleranfällig und starken Schwankungen ausgesetzt zu sein.

- Der Slotblot-Assay kann zum Vergleich der Suszeptibilität unterschiedlicher Zelllinien für Ad5 herangezogen werden, ohne dass Fehler auf Grund unterschiedlich starker Expression von Reportergenen auftreten.
- Der Slotblot-Assay ist die Grundlage aller in den nachfolgenden Teilen dieser Arbeit durchgeführten Experimente, da dort HC-Ad-Vektoren Verwendung finden, für die sonst keine adäquate Titrationmethode existiert.
- Der Slotblot-Assay kann wahrscheinlich leicht für andere Vektorsysteme als HC-Ad-Vektoren adaptiert werden.

5 Diskussion - Teil I

5.1 DNA-basierte Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen

Adenovirale Vektoren mit hoher DNA-Kapazität werden in *E1*-transformierten Zelllinien in Gegenwart von *E1*-deletiertem Helfervirus produziert, das *in trans* die viralen Genprodukte zur Verfügung stellt, die für die Produktion erforderlich sind. Über *cre/loxP* oder *FLPe/Frt* vermittelte Rekombination wird das Verpackungssignal des Helfervirus während der Produktion exzidiert, so dass die Helfervirus-Genome nicht verpackt werden können. Ein kleiner Teil der Helfervirus-Genome behält hierbei allerdings das Verpackungssignal und wird in Kapside verpackt. Eine HC-Ad-Vektorpräparation enthält darum nach der Reinigung über CsCl-Dichtegradienten neben infektiösen und nicht-infektiösen HC-Ad-Vektorpartikeln auch Helferviruspartikel. Zur vollständigen Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen muss daher (1) eine Bestimmung der Gesamtpartikelzahl, bestehend aus der Summe infektiöser und nicht-infektiöser Partikel, (2) eine Bestimmung des Anteils infektiöser Partikel und (3) eine Bestimmung der Kontamination mit Helferviruspartikeln erfolgen. Eine solche vollständige Charakterisierung spielt insbesondere für klinische Studien eine bedeutende Rolle, da (1) steigende Dosen adenoviraler Vektoren eine nicht-lineare Steigerung der Transgenexpression bewirken [34][36], (2) beobachtete Schwellenwert-Effekte die Anwendung niedriger Dosen fragwürdig erscheinen lassen [35] und (3) nur geringe Unterschiede zwischen therapeutisch wirksamen und bereits toxischen Dosen bestehen [34].

Der hier vorgestellte Assay zur vollständigen Charakterisierung von HC-Ad-Vektorpräparationen ermöglicht die Erfassung der genannten Parameter zuverlässig und reproduzierbar in einem Arbeitsgang mit den Standardmethoden eines molekularbiologischen Labors. Auf Grund der leichten Standardisierbarkeit ist erstmals auch die Möglichkeit zum Vergleich verschiedener Studien in verschiedenen Labors gegeben.

5.1.1 Bestimmung des infektiösen Titers

Der entwickelte Assay beruht auf Infektion einer Referenzzelllinie mit verschiedenen Volumina der zu testenden Vektorpräparation, anschließender Lyse der Zellen, Immobilisierung der freigesetzten Vektor-DNA auf einer Nylonmembran und deren Quan-

tifizierung durch Hybridisierung mit einer vektorspezifischen Sonde sowie Vergleich der Signalintensität mit Plasmid-DNA bekannter Konzentration. Dieses Vorgehen erlaubt eine zuverlässige Bestimmung des infektiösen Titers unabhängig von der Expression eines Reportergens (s. Abbildung 4.3, S. 54). Dies bedeutet einen enormen Vorteil, da bei der Mehrheit therapeutisch einzusetzender Vektoren die Präsenz von Expressionskassetten für Reportergene nicht wünschenswert ist. Von den gebräuchlichsten Reporterproteinen β -gal und GFP ist bekannt, dass sie toxisch und immunogen wirken können [39][40].

Der infektiöse Titer von HC-Ad-Vektoren, die für sezernierte Proteine wie Erythropoietin oder Interferon α -2 kodieren, wurden bislang bestimmt, indem Zellen mit steigenden Mengen der Vektoren infiziert und anschließend die Menge des sezernierten Proteins (zum Teil in indirekten Assays) bestimmt wurde. Diese Menge wurde dann verglichen mit der Menge Protein, die bei Expression durch einen entsprechenden Erstgenerationsvektor in der gleichen Zelllinie gefunden wurde. Da von dem Erstgenerationsvektor Titer in Form von plaque-forming-units (pfu) bekannt waren, wurde anhand der Proteinmengen auf den infektiösen Titer der HC-Ad-Vektoren rückgerechnet [41]. Tatsächlich ist dieses Verfahren sehr aufwändig und nicht zuletzt auf Grund unterschiedlicher Expressionskinetiken von HC-Ad- und Erstgenerationsvektoren fehlerträchtig. Darüber hinaus sind derartige funktionelle Assays nicht immer durchführbar.

Das hier präsentierte Verfahren zur Titration kann mit Bezug auf eine Referenzzelllinie auch für einen einfachen Vergleich der Suszeptibilität unterschiedlicher Zelllinien für einen Vektortyp dienen (s. Abbildung 4.5, S. 56). Mit einem Reporter-gen-Assay ist dies auf Grund von Unterschieden in der Aktivität von Promotoren zur Expression von Reportergenen in verschiedenen Zelllinien nur sehr eingeschränkt möglich.

Für die Bestimmung der Zahl der infektiösen Partikel mit einem Plasmidstandard konnte gezeigt werden, dass die Struktur des Mengenstandards (zirkulär oder linear) keinen Einfluss auf seine Tauglichkeit hat (Abb. 4.2, S. 53). Essenziell hingegen ist das Mischen des Plasmid-Standards mit nicht-infizierten Kontrollzellen und deren anschließende Lyse (Abb. 4.1, S. 51). Dies liegt wahrscheinlich an einer Verkleinerung der Interaktionsfläche zwischen DNA und Nylonmembran durch Zellfragmente und/oder eine Absättigung der DNA-Bindungskapazität der Membran durch genomische DNA. Auch der Plasmidtyp (infektiöses Erstgenerationsvektor-Plasmid oder HC-Ad-Shuttle-Plasmid) spielt keine Rolle, solange anhand der Größe und Konzentration eine richtige Mengenermittlung erfolgt (Abb. 4.2, S. 53).

5.1.2 Vergleich zwischen Reporter-gen-Assays und Slotblot zur Titerbestimmung

Zum Vergleich zwischen infektiösen Titern, die mittels Reporter-gen-Assay oder Slotblot mit HeLa oder A549-Zellen ermittelt wurden, kamen zwei Vektoren zum Einsatz, die für die häufig verwandten Reportergene β -gal (HC-AdGS46) beziehungsweise EGFP (HC-AdFK7) kodieren. Der infektiöse Titer beider Vektoren wurde zunächst per Slot-

blot sowohl mit HeLa als auch mit A549-Zellen bestimmt. Für beide Vektoren konnten erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen den Titern ermittelt mit HeLa- oder A549-Zellen festgestellt werden (Abb. 4.5, S. 56). Die Bestimmung der Titer mittels Reportgen-Assay hingegen gestaltete sich deutlich schwieriger. Der Nachweis von β -gal in HeLa-Zellen lieferte auf Grund sehr schwacher und punktueller Färbung keine reproduzierbaren Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass die Reporter-Titer in A549 Zellen vier- (HC-AdFK7) bis vierzehnfach (HC-AdGS46) niedriger sind, als die per Slotblot bestimmten (Abb. 4.6, S. 58). Diese Diskrepanz könnte verschiedene Gründe haben. Zum ersten ist die für einen zuverlässigen Nachweis der Transgenexpression erforderliche Inkubationsdauer mit 48 h deutlich länger, als die für den Slotblot-Assay erforderlichen 12-16 h. Es ist davon auszugehen, dass in dieser Zeitspanne einige Zellteilungen stattgefunden haben, die zu einem Verlust von Vektorgenomen und damit zum Verlust der Transgen-Expression geführt haben können. Zweitens ist denkbar, dass einzelne Zellen von mehr als einem Virion infiziert wurden. Ein solches Ereignis wird vom Slotblot-Assay richtig erfasst, bei einem Reporter-Assay hingegen resultiert eine geringere Zahl Transgen-exprimierender Zellen. Als dritte Möglichkeit wäre denkbar, dass die Expression der Reportergene in einigen Zellen nach 48 h noch nicht so stark ist, dass eine Detektion im Fluoreszenzmikroskop oder mittels Färbung erfolgen kann.

Darüber hinaus konnte deutlich eine starke Variabilität der Reporter-Assays in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie gezeigt werden. So ist der mit 293-Zellen per Reporter-Assay ermittelte Titer dreifach (HC-AdFK7) bis sechsunddreißigfach (HC-AdGS46) höher als der entsprechende mit A549-Zellen und Reporter-Assay ermittelte Titer. Dies ist wahrscheinlich auf eine Transaktivierung des hCMV-Promotors durch die adenoviralen *E1*-Gene zurückzuführen, die von 293-Zellen exprimiert werden [119]. Zudem besteht in 293-Zellen auf Grund der Helferviruskontamination prinzipiell die Möglichkeit einer Replikation der Vektoren. Diese könnte ebenfalls einen scheinbar höheren Titer verursachen.

Die Bestimmung des infektiösen Titers über den Reporter-unabhängigen, DNA-basierten Slotblot-Assay bildet die Grundlage für alle weiteren kopienzahlabhängigen Experimente, die in den nachfolgenden Teilen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

5.1.3 Bestimmung der Gesamtpartikelzahl mittels Slotblot und Abgrenzung von physikalischen Methoden

Mit dem vorgestellten Assay zur Bestimmung der Gesamtpartikelzahlen kann in einem Arbeitsgang und mit derselben Methodik, die auch zur Bestimmung der Zahl der infektiösen Partikel angewendet wird, die sogenannte inverse Bioaktivität einer HC-Ad-Vektorpräparation ermittelt werden. Die für verschiedene Vektorpräparationen bestimmte inverse Bioaktivität liegt in dem für adenovirale Vektoren bekannten Bereich (Tab. 4.3, S. 60) [116]. Es konnte durch Verdau mit DNase I gezeigt werden, dass die Vektorpräparationen nur mit geringen Mengen freier Vektor-DNA konatminiert sind (s. Ab-

schnitt 4.1.3, S. 59) und somit davon auszugehen ist, dass die bestimmten Kopienzahlen der Zahl der in Kapside verpackten Vektorgenome entspricht. Eine korrekte Bestimmung der inversen Bioaktivität ist insbesondere für klinische Studien von Bedeutung. Das US-amerikanische FDA sieht als Richtwert für den Einsatz adenoviraler Vektoren in klinischen Studien eine inverse Bioaktivität von höchstens dreissig vor [116].

Die mit dem vorgestellten Assay ermittelten Partikelzahlen liegen um Faktor 10 unter den per OD_{260} ermittelten Partikelzahlen (Tab. 4.3, S. 60). Die Bestimmung der Zahl der Gesamtpartikel mittels Lyse und anschließender Messung der OD_{260} birgt weitreichende Probleme. An erster Stelle ist hier der Einsatz unterschiedlicher Extinktionskoeffizienten zu nennen [43]. Der am häufigsten verwendete Extinktionskoeffizient wurde willkürlich aus mehreren vorhandenen Werten gewählt und steht bereits seit 1996 zur Diskussion [43]. Auch im Vergleich mit anderen physikalischen Methoden wie der Elektronenmikroskopie liefert er die mit Abstand höchsten Partikelzahlen. Ein prinzipielles Problem der Partikelzahlbestimmung mittels OD_{260} liegt wahrscheinlich in der Kontamination der Vektorpräparationen mit zellulären Proteinen. Da von Labor zu Labor unterschiedliche Zelllinien und auch Zellmengen zur Produktion der Vektoren eingesetzt werden, kann von unterschiedlichen Mengen verschiedenartiger Proteine ausgegangen werden, die die Vektorpräparationen kontaminieren. Diese Proteine können die OD_{260} beeinflussen und somit scheinbar erhöhte Partikelzahlen verursachen. Auch die Expression von Transgenen durch den Vektor bei dessen Produktion, die häufig von starken, ubiquitären Promotoren erfolgt, spielt wahrscheinlich eine wesentliche Rolle. So konnte bei α_1 -Antitrypsin-synthetisierenden Vektoren nach deren Reinigung über CsCl-Dichtegradienten und Entsalzung eine starke Kontamination mit α_1 -Antitrypsin in ELISA-Assays ermittelt werden (G. Schiedner, persönliche Mitteilung). Direkt sichtbar wird die Kontamination sogar bei *EGFP*-exprimierenden Vektoren. Hier sind sowohl die Gradienten als auch die gereinigten und entsalzten Vektorpräparationen bereits ohne Anwendung optischer Filter grün. Der Effekt ist um so stärker, je höher der Titer der Vektorpräparation ist. Abbildung 5.1, S. 68 zeigt den 2. CsCl-Gradienten einer Präparation von HC-AdFK7. Die grüne Färbung ist auch nach Entsalzen der Vektorpräparation erhalten geblieben. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf zu verbessernde Reinigungsmethoden, auch und gerade um unerwünschte Nebeneffekte bei der Anwendung der Vektoren zu vermeiden.

Der Slotblot-Assay zur Bestimmung von Gesamtpartikelzahlen wird nicht durch eventuelle Kontaminationen der Vektorpräparation mit Proteinen beeinflusst.

Zur Bestimmung der Gesamtpartikelzahlen adenoviraler Vektorpräparationen wurde ein PCR-basierter Assay publiziert [120]. Dieser erfordert eine aufwändige Aufarbeitung der Vektorpräparationen vor der eigentlichen Titerbestimmung und zeichnet sich durch einen hohen instrumentellen Aufwand aus. Der Slotblot-Assay hingegen ist rasch und mit Standard-Labormethoden durchführbar. Zudem scheint es bislang nicht möglich zu sein, den infektiösen Titer ebenfalls mittels quantitativer PCR zu bestimmen. Die Gründe hierfür sind unklar.

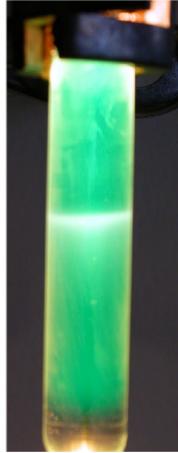


Abbildung 5.1: Beispiel für die Kontamination der CsCl-Dichtegradienten mit Protein, das während der Produktion vom Vektor synthetisiert wird. Gezeigt ist der zweite Gradient einer Präparation von HC-AdFK7. Der Vektor enthält eine Expressionskassette für *EGFP*. Die grüne Farbe ist auf EGFP zurückzuführen und blieb auch nach Entsalzung erhalten.

5.1.4 Bestimmung der Helferviruskontamination

Durch Wahl einer helfervirus-spezifischen Sonde kann mit dem vorgestellten Assay leicht die Zahl der Helferviruspartikel in einer HC-Ad-Vektorpräparation bestimmt werden (Tab. 4.5, S. 62). Die so ermittelte Helferviruskontamination ist bis zu zehnfach höher als die bislang bekannten Helferviruskontaminationen [16]. Diese wurden mittels Plaque-Assays bestimmt, wobei 293-Zellen mit den Vektoren infiziert und mit Agarose überschichtet wurden. Durch die Befähigung des Helfervirus, in 293-Zellen zu replizieren, können infektiöse Helferviruspartikel entstehen, die wiederum Nachbarzellen infizieren und schließlich zu lokaler Lyse der Zellen und Plaque-Bildung führen. Ein solcher funktioneller Assay ist mit ähnlichen Problemen verbunden wie ein Reporter-Gen-Assay. Eine Vielzahl unterschiedlicher, sukzessiver Ereignisse ist zur Bildung eines Plaques notwendig [43]. Bereits geringe Schwankungen in den Ausgangsbedingungen können daher unterschiedliche Endergebnisse bewirken [43]. Besonders erschwerend kommt bei Einsatz eines solchen Plaque-Assays zur Bestimmung der Helferviruskontamination hinzu, dass die Zellen mit 100-1000 mal mehr Vektor als Helfervirus infiziert werden müssen, um Plaquebildung zu ermöglichen. Es ist vorstellbar, dass diese hohe Vektorlast zu verminderter Plaque-Bildung führt. So konnten mit den Vektoren HC-AdFK3 und HC-AdFK7, für die im Slotblot-Assay Helferviruskontaminationen von 0,7% (HC-AdFK3) und 2% (HC-AdFK7) ermittelt wurden, in einem Plaque-Assay keine (HC-AdFK3) oder nur sehr wenige (HC-AdFK7) Plaques mit 293-Zellen erzeugt werden. Der Slotblot-Assay scheint

5 Diskussion - Teil I

im Vergleich zum Plaque-Assay die realistischere, weil von wesentlich weniger Faktoren abhängige, Methode zu sein.

6 Ergebnisse - Teil II

6.1 Stabile Transgenexpression über lange Zeiträume in ruhendem Gewebe - das retinale Pigmentepithel als Paradigma

Das retinale Pigmentepithel (RPE) spielt für den Stoffwechsel von Retinol und bei der Phagozytose von Fotorezeptoren eine wesentliche Rolle. Die Zellen des retinalen Pigmentepithels produzieren eine Reihe trophischer, anti-oxidativer und anti-angiogenetischer Faktoren, die für Integrität und Funktion der Retina von hoher Bedeutung sind [49]. Die altersabhängige Makuladegeneration (ARMD) ist ein Beispiel für eine das RPE betreffende Krankheit. Sie ist in Industrieländern die häufigste Ursache für Erblindung im Alter [44] und es existieren keine verlässlichen Therapieformen. Die durch Gentransfervektoren vermittelte Expression protektiver Gene könnte einen alternativen Behandlungsansatz darstellen. Die im Folgenden vorgestellte Arbeit hatte das Ziel, HC-Ad-Vektoren auf ihre Tauglichkeit zur zeitlich andauernden Transgenexpression in diesem Gewebe *in vivo* zu evaluieren. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit T.Luther und U.Schraermeyer (Universitätsaugenklinik, Labor für experimentelle Ophthalmologie, Universität zu Köln) durchgeführt.

6.1.1 Konstruktion eines geeigneten Vektors

Es wurde ein *EGFP*-exprimierender HC-Ad-Vektor konstruiert (HC-AdFK7). *EGFP* schien als Reporter gen vorteilhaft auf Grund seiner leichten Nachweisbarkeit in Gewebeschnitten, der geringeren Toxizität im Vergleich zu *beta-gal* sowie der Option, die Transgenexpression mittels Scanning Laser Ophthalmoskopie (SLO) am lebenden Tier verfolgen zu können.

Das Ausgangsplasmid pFK7 für diesen Vektor wurde erzeugt, indem das *A#III/A#II* Fragment aus pEGFP-NI (Invitrogen, Ort) nach Erzeugung glatter Enden in die *NotI* Schnittstelle von pSTK129 kloniert wurde. HC-AdFK7 wurde dann auf die im Kapitel Material und Methoden beschriebene Weise erzeugt und titriert. Abbildung 6.1, S. 71 zeigt die Vektorkarte.

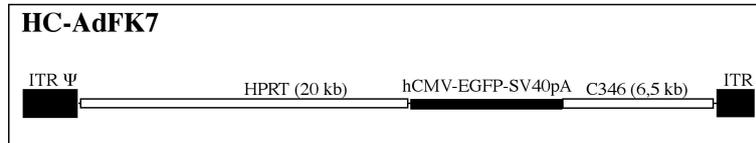


Abbildung 6.1: Der Vektor HC-AdFK7 besteht von links nach rechts aus dem linken Terminus von Ad5 (bp 1-440), einem 20 kB DNA-Fragment aus dem humanen *HPRT*-Lokus (HUM-HPRTB, Map-Positionen 1777-21729), der Expressionskassette für *EGFP*, einem 6,5 kB DNA-Fragment aus C346 (Lokus: HUMDXS455A, Map-Positionen 10205-16750) sowie dem rechten Terminus von Ad5 (bp 35818-35935). hCMV: humaner CMV-Promotor, SV40pA: Polyadenylierungssignal von SV40

Tabelle 6.1: Transduktion von RPE-Zellen mit HC-AdFK7. Gezeigt ist der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen 48 h nach Transduktion mit HC-AdFK7.

0 MOI	10 MOI	20 MOI	50 MOI	100 MOI
0%	50%	80%	100%	100%

6.1.2 Transduktion von RPE-Zellen mit HC-AdFK7

Um die prinzipielle Transduzierbarkeit retinaler Pigmentepithelzellen zu zeigen, wurden primäre retinale Pigmentepithelzellen aus Long-Evans-Ratten mit steigenden Dosen von HC-AdFK7 transduziert. Nach bereits 24 h konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie *EGFP*-exprimierende Zellen gefunden werden (s. Abb. 6.2, S. 72). Tabelle 6.1, S.71 zeigt den Anteil *EGFP*-positiver Zellen, die 48 h nach Transduktion im Fluoreszenzmikroskop gezählt werden konnten. Der Nachweis der Expression von *EGFP* gelang im Fluoreszenzmikroskop trotz teilweise starker schwarzer Pigmentierung der Zellen. Die Daten zeigen, dass sich primäre retinale Pigmentepithelzellen gut mit Ad5-basierten Vektoren transduzieren lassen. Die Intensität der Fluoreszenz steigerte sich innerhalb der ersten sieben Tage nach Transduktion und blieb im Beobachtungszeitraum von acht Wochen nach Transduktion stabil.

6.1.3 Dosisabhängige Transduktionseffizienz *in vivo*

Zur Evaluierung der für eine Transduktion des RPEs *in vivo* notwendigen Dosis wurden serielle Verdünnungen des Vektors HC-AdFK7 in TBS angefertigt und Dosen von $5 \cdot 10^4$ bis $5 \cdot 10^6$ infektiösen Partikeln/ μl subretinal in zwölf Monate alte Wistar-Ratten in einem Volumen von je 0,5 μl injiziert. Drei Tage nach Transduktion wurden die Tiere getötet, die Augen enukleiert, Kryoschnitte angefertigt und mikroskopisch analysiert. Die

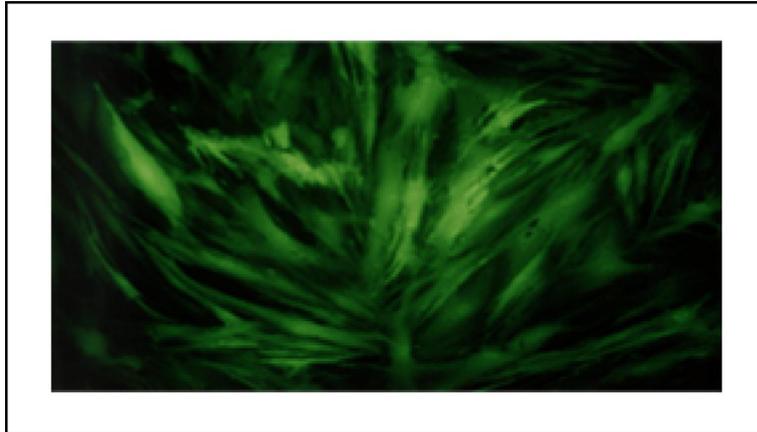


Abbildung 6.2: RPE-Zellen 24 h nach Transduktion mit 50 MOI HC-AdFK7.

Injektion von $5 \cdot 10^5$ infektiösen Partikeln führte hierbei zu einer nahezu vollständigen Transduktion der RPE-Zellschicht (s. Abbildung 6.3a,b, S. 73). Die Anwendung höherer Dosen erbrachte keine weitere Steigerung. Die Injektion von $5 \cdot 10^4$ infektiösen Partikeln führte zur Transduktion von ungefähr 50% der Zellen des RPEs (s. Abbildung 6.3c,d, S. 73).

6.1.4 Nachweis der Spezifität der Fluoreszenz

Um die Spezifität der Fluoreszenz auf Proteinebene nachzuweisen, wurde eine Färbung mit Cy3-gekoppeltem anti-EGFP-Antikörper durchgeführt und Fotografien desselben Ausschnitts mit jeweils Cy3- (Anregung: 550 nm, Emission: 570 nm) und EGFP- (Anregung: 471 nm, Emission: 503 nm) spezifischen Filtersätzen angefertigt. Abbildung 6.3e, S. 73 zeigt die Überlagerung zweier Aufnahmen desselben Ausschnittes mit den beiden Filtersätzen. Gelbe und orange Färbung zeigen spezifische Fluoreszenz für beide Wellenlängen und somit Lokalisierung von Cy3-gekoppeltem anti-EGFP-Antikörper in Bereichen mit EGFP-Fluoreszenz an.

6.1.5 Nachweis der Langzeitexpression von *EGFP* mittels Fluoreszenzmikroskopie in Flatmounts

Sechs Monate nach der Injektion von $5 \cdot 10^5$ i.u. HC-AdFK7 konnte subretinal EGFP-Fluoreszenz in Flatmount-Präparationen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die EGFP-Fluoreszenz trat ausschließlich in Zellen des RPE, nicht aber in anderen Zelltypen auf. Abbildung 6.4a, S. 74 zeigt eine klare Grenze zwischen transduzierten und nicht-transduzierten Zellen. Einzelne RPE-Zellen sind an ihrer hexagonalen Form er-

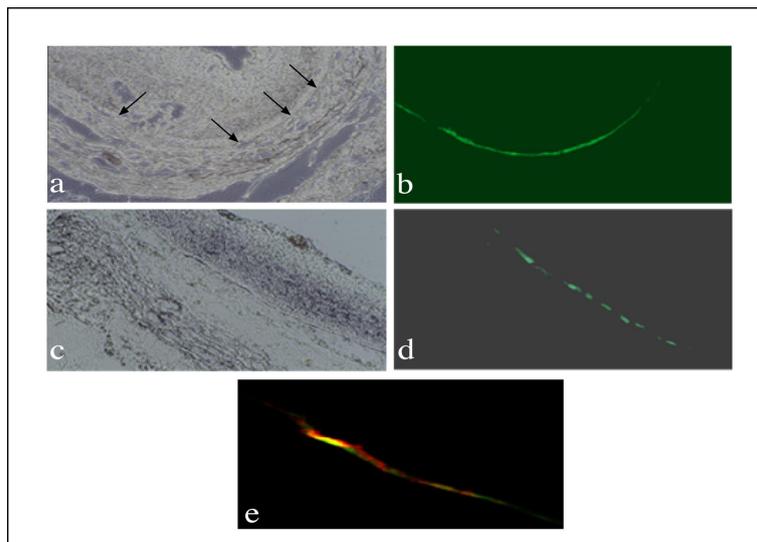


Abbildung 6.3: *In vivo* Gentransfer in das RPE. a zeigt einen ungefärbten Cryoschnitt drei Tage nach subretinaler Injektion von $5 \cdot 10^5$ i.u. HC-AdFK7, b denselben Ausschnitt unter Fluoreszenzlicht. c zeigt einen Ausschnitt drei Tage nach Injektion von $5 \cdot 10^4$ i.u. HC-AdFK7, d denselben Ausschnitt unter Fluoreszenzlicht. e zeigt die Überlagerung von EGFP- und Cy3-Fluoreszenz nach Färbung mit Cy3-gekoppeltem anti-EGFP-Antikörper. Gelb und orange sind die Bereiche mit spezifischer Fluoreszenz für Cy3 und EGFP. (Analyse: T.Luther und U.Schraermeyer)

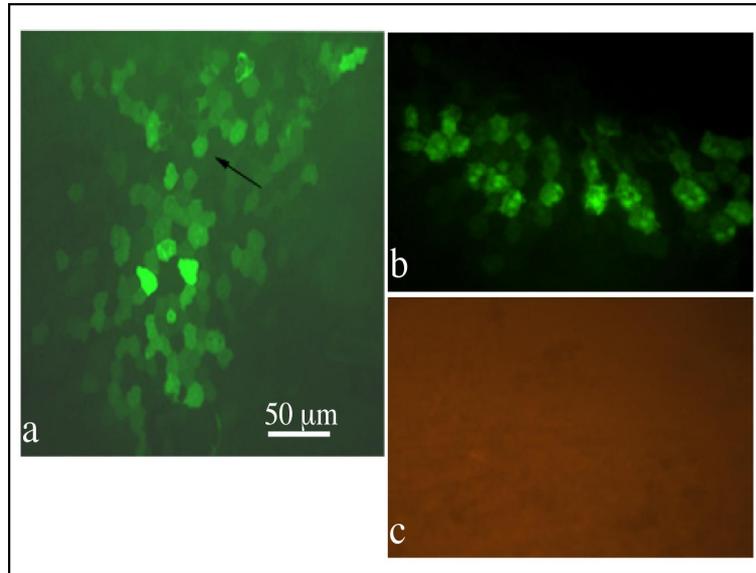


Abbildung 6.4: Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Flatmount-Präparationen sechs Monate nach Injektion von $5 \cdot 10^5$ i.u. HC-AdFK7. a zeigt fluoreszierende RPE Zellen in der typischen hexagonalen Gestalt (Pfeil). b zeigt eine weitere Präparation (Filtersets für a und b: Anregung: 471 nm, Emission: 503 nm). c zeigt denselben Ausschnitt wie b mit einem Filterset zum Nachweis von Lipofuscin-Fluoreszenz (Anregung: 405 nm, Emission: 475 nm). Die dargestellte grüne Fluoreszenz ist somit nicht auf Lipofuscin, sondern auf EGFP zurückzuführen. (Analyse: T.Luther und U.Schraermeyer)

kennbar. Abbildung 6.4b zeigt eine weitere Flatmount-Präparation mit fluoreszierenden RPR-Zellen sechs Monate nach Injektion von HC-AdFK7. Derselbe Ausschnitt wurde unter Verwendung eines anderen Filtersets zum Nachweis von Lipofuscin-Fluoreszenz fotografiert, wobei keine Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte (Abbildung 6.4c, S. 74). Die in Abbildung 6.4c gezeigte Fluoreszenz ist somit auf EGFP zurückzuführen.

6.1.6 Nachweis der Lanzeitexpression von *EGFP* mittels Scanning Laser Ophthalmoskopie am lebenden Tier

Mittels Scanning Laser Ophthalmoskopie gelang es, die Fluoreszenz von EGFP am lebenden Tier über den Beobachtungszeitraum von sechs Monaten zu verfolgen. Abbildung 6.5, S. 75 zeigt die Aufnahmen desselben Auges desselben Tieres ein, drei und sechs Monate nach subretinaler Injektion von HC-AdFK7. Die EGFP-Fluoreszenzsignale waren spezifisch und die Anwendung eines Infrarotfilters zeigte keine Hintergrundfluoreszenz.

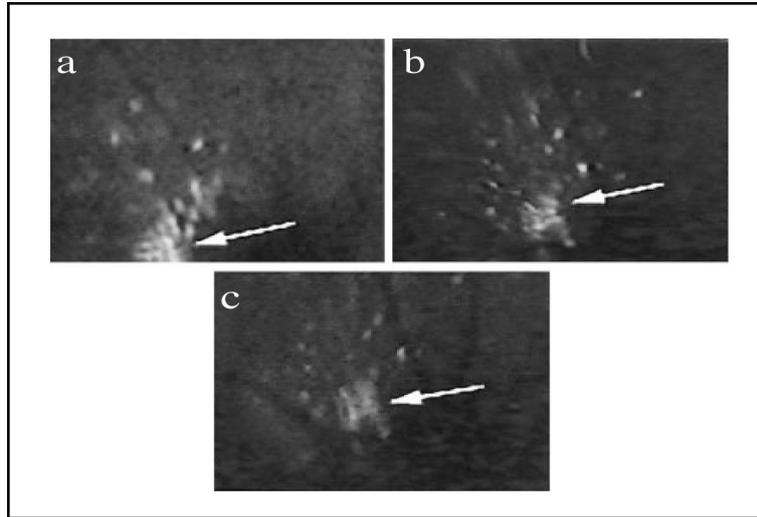


Abbildung 6.5: SLO-Aufnahmen desselben Auges desselben Tieres ein (a), drei (b) und sechs (c) Monate nach subretinaler Injektion von $5 \cdot 10^5$ i.u. HC-AdFK7. Die EGFP-Fluoreszenz bleibt stabil über den Beobachtungszeitraum erhalten. Die gezeigte Gruppe Zellen ist in Abbildung 6.4a, S. 74 als Flatmount-Präparation zu sehen.

Intensität und Ausdehnung der fluoreszierenden Bereiche blieben während des Beobachtungszeitraumes weitgehend konstant.

6.1.7 Histologische Analyse der Integrität des Gewebes

Die histologische Analyse der Retinas sechs Monate nach Injektion von HC-AdFK7 wurde mittels Paraffinschnitten des Gewebes vorgenommen. Abbildung 6.6, S. 76 zeigt die Architektur der Retina sechs Monate nach Injektion von HC-AdFK7. Es konnten keine Anzeichen neuroretinaler Schäden gefunden werden. Alle Schichten der Retina waren nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes intakt. Es konnten auch keine infiltrierenden mononukleären Zellen beobachtet werden.

Mittels Elektronenmikroskopie wurde für dieselben Augen wie in den Abbildungen 6.4a, S. 74 und 6.5a,b,c, S. 75 im Bereich der subretinalen Injektion eine intakte Schnittstelle zwischen der Photorezeptorschicht und dem RPE gezeigt (s. Abbildung 6.7, S. 77). In den ultrastrukturellen Aufnahmen war eine leichte Veränderung der Struktur der äußeren Segmente zu beobachten, die der einer kurzzeitigen lokalen Ablösung der Retina entspricht. Des Weiteren konnte in einigen Zellen des RPE die Akkumulation von Lipofuscin beobachtet werden, die für das Alter der Tiere normal ist.

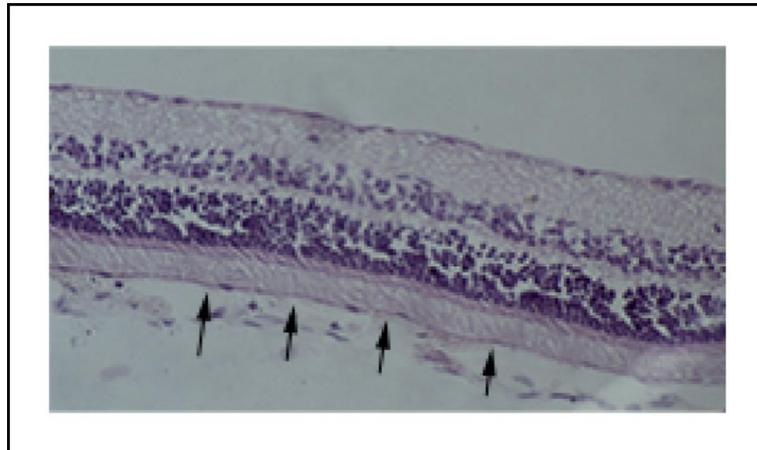


Abbildung 6.6: Histologische Analyse der Retina sechs Monate nach subretinaler Injektion von HC-AdFK7. Es konnte keine abnormale Morphologie der verschiedenen Schichten der Retina festgestellt werden. Des Weiteren waren keine infiltrierenden mononukleären Zellen sichtbar. Die Pfeile zeigen auf die RPE-Zellschicht. (Analyse: T.Luther und U.Schraermeyer)

6.1.8 Immunologische Analyse

Mittels spezifischer Antikörper konnte keine Infiltration von Makrophagen, Monocyten oder T-Zellen sechs Monate nach subretinaler Injektion von HC-AdFK7 festgestellt werden. Der Vergleich zwischen Augen nach Injektion von HC-AdFK7 und unbehandelten Kontrollaugen nach Färbung mit den Antikörpern T3003 und KiTiR zeigte keinen Unterschied.

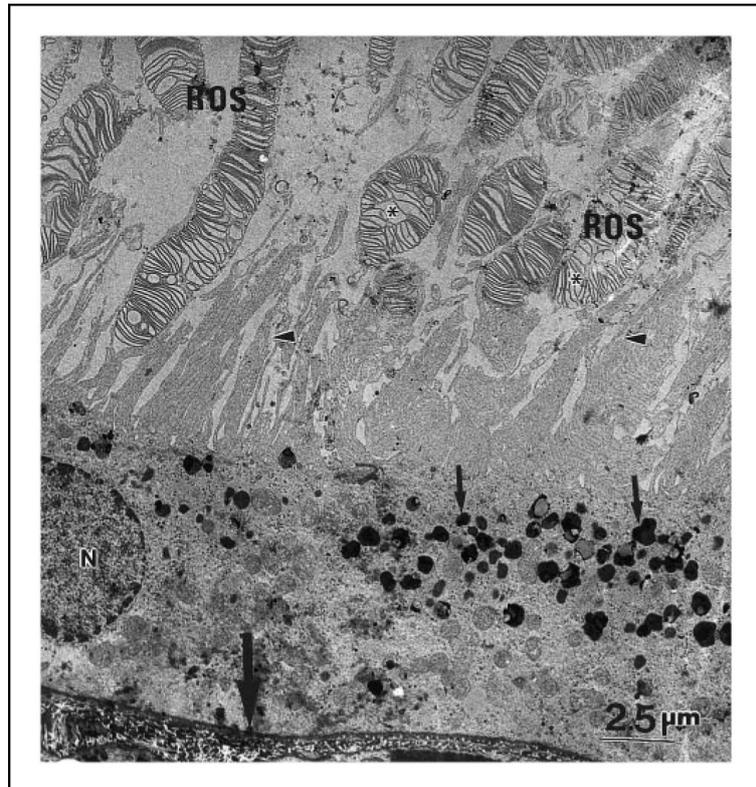


Abbildung 6.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme im Bereich der RPE-Zellen desselben Auges wie in 6.4a, S. 74 und 6.5a,b,c, S. 75. Gezeigt ist eine intakte Schnittstelle zwischen RPE und Photorezeptorschicht. (*) bezeichnet leichte Veränderungen der äußeren Segmente („rod outer segments“ ROS), der große Pfeil zeigt auf die Bruchsche Membran, die Pfeilspitzen auf Mikrovilli. Die kleinen Pfeile zeigen auf die Akkumulation von Lipofuscin in dunklen Vesikeln in den RPE-Zellen. N ist der Nukleus einer RPE-Zelle. (Analyse: T.Luther und U.Schraermeyer)

6.1.9 Zusammenfassung für die HC-Ad-vermittelte Langzeitexpression im RPE

- Primäre retinale Pigmentepithelzellen der Ratte lassen sich *in vitro* gut mit HC-Ad-Vektoren transduzieren.
- Die Injektion geringer Dosen ($5 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^5$ i.u.) des *EGFP*-exprimierenden Vektors HC-AdFK7 in den subretinalen Raum von immunkompetenten Wistar-Ratten führte zu einer nahezu vollständigen und hochspezifischen Transduktion des retinalen Pigmentepithels.
- Die Expression von *EGFP* nach Injektion von HC-AdFK7 wurde in Präparaten des behandelten Gewebes immunhistochemisch nachgewiesen.
- Die subretinale Injektion von $5 \cdot 10^5$ i.u. HC-AdFK7 führte zu einer über den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Monaten stabilen Transgenexpression. Diese konnte am lebenden Tier mittels Scanning Laser Ophthalmoskopie und in Präparaten der behandelten Augen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.
- Das behandelte Gewebe zeigte nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes keine pathologischen Veränderungen.
- Es konnte keine Infiltration von Makrophagen, Monozyten oder T-Zellen nachgewiesen werden.

7 Diskussion - Teil II

7.1 Stabile Transgenexpression über lange Zeiträume in ruhendem Gewebe - das retinale Pigmentepithel als Paradigma

7.1.1 Langzeitexpression im RPE

Die subretinale Injektion bereits geringer Dosen des *EGFP*-exprimierenden HC-Ad-Vektors HC-AdFK7 führte zur spezifischen Transduktion der Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) der behandelten Augen. Die Applikation von nur $5 \cdot 10^5$ infektiösen Partikeln ermöglichte eine langzeitige Transgenexpression über den Beobachtungszeitraum von sechs Monaten. Dies konnte in entsprechenden Präparationen der Augen mittels Fluoreszenzmikroskopie und am lebenden Tier mittels Scanning Laser Ophthalmoskopie (SLO) nachgewiesen werden (s. Abb. 6.4, S. 74 und Abb. 6.5, S. 75). Das behandelte Gewebe war nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes morphologisch weitgehend unauffällig und es gab keine Hinweise auf lokale Immunreaktionen oder Toxizität (s. Abb. 6.6, S. 76 und Abb. 6.7, S. 77).

Die beobachteten minimalen morphologischen Veränderungen (Abb. 6.7, S. 77) im Injektionsbereich entsprechen denen einer kurzzeitigen lokalen Ablösung der Retina. Möglicherweise sind hierfür das Injektionsvolumen oder eine geringe Toxizität Glycerol, das als Einfrierschutz für die Vektorpräparation verwendet wird, verantwortlich.

Die langzeitige Expression des Transgenes hat wahrscheinlich zwei Ursachen. Zum einen besteht das retinale Pigmentepithel aus ruhenden oder nur sehr langsam proliferierenden Zellen. Dies schafft eine wesentliche Voraussetzung für den Erhalt der episomal vorliegenden HC-Ad-Vektoren in den transduzierten Zellen. Verluste von Vektorgenomen auf Grund von Zellteilungen sind nicht oder nur in kleinem Ausmaß zu erwarten. Das RPE ist somit besonders für den Einsatz episomaler Gentransfervektoren geeignet. Diese haben gegenüber integrierenden Vektorsystemen basierend auf Retro-, Lenti- oder Adeno-assoziierten Viren den Vorteil, nicht das Risiko einer insertionellen Mutagenese aufzuweisen.

Eine zweite Möglichkeit, die zum Verlust der Transgenexpression führen kann, ist die Eliminierung der transduzierten Zellen durch das Immunsystem. Sowohl die Expression viraler Proteine als möglicherweise auch die Expression der eingebrachten Transgene

können zu einer Infiltration von Makrophagen, Monozyten oder T-Zellen führen, die dann die Antigen-exprimierenden Zellen eliminieren. So stehen die hier gezeigten Ergebnisse in deutlichem Gegensatz zu bisherigen Studien mit E1-deletierten Erstgenerationsvektoren. Deren Applikation führte zu einer Expression des Transgenes über einen Zeitraum von höchstens zwölf Wochen [56][57]. Dies ging mit einer Immunreaktion gegen virale oder transgene Proteine einher, die zur Eliminierung der transduzierten RPE-Zellen führte. Diese Immunreaktion trat trotz des immunprivilegierten Status des subretinalen Raumes auf.

Die in dieser Arbeit gezeigte Transgenexpression über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten und das Ausbleiben immunologischer Reaktionen sind starke Hinweise für den möglichen Einsatz von HC-Ad-Vektoren im RPE zu therapeutischen Zwecken. Die Ergebnisse sind ein weiterer Beleg für die stark reduzierte Immunogenität und Toxizität von HC-Ad-Vektoren im Vergleich mit adenoviralen Vektoren der ersten und zweiten Generation. Dies steht in Einklang mit Studien im Skelettmuskel [29][30], in Hepatozyten [16][27] sowie im zentralen Nervensystem [32], wo ebenfalls die reduzierte Immunogenität und Toxizität des HC-Ad-Vektorsystems gezeigt wurde. Im Skelettmuskel führte jedoch auch die Expression von β -gal durch einen HC-Ad-Vektor zu einer Immunreaktion mit anschließendem Verlust der Transgenexpression [121]. Untersuchungen, bei denen die Expression von β -gal im Striatum immunkompetenter Ratten erfolgte, zeigten eine langzeitige Genexpression sowohl mit Erstgenerations- als auch mit HC-Ad-Vektoren [32]. Nach einer zweiten, diesmal subkutanen Gabe eines Erstgenerationsvektors kam es allerdings zu einem Verlust der Transgenexpression im Striatum, sofern diese durch einen Erstgenerationsvektor erfolgte. Dieser Effekt trat bei HC-Ad-Vektoren nicht auf. Das zeigt, dass im zentralen Nervensystem, einem ähnlich immunprivilegierten Organ wie dem Auge, die Expression viraler Gene eine wesentliche Rolle beim Verlust der Ad-Vektor-vermittelten Transgenexpression spielt. Das Risiko, auf Grund von Sekundärinfektionen die Transgenexpression zu verlieren, ist somit bei der Anwendung von HC-Ad-Vektoren geringer als bei Erstgenerationsvektoren.

Auch die Ergebnisse verschiedener Studien mit unterschiedlichen Transgenen, die durch Erstgenerationsvektoren im RPE exprimiert wurden, haben gezeigt, dass die Expression viraler Gene für den Verlust der Transgenexpression verantwortlich ist [122][123]. Trotz des immunprivilegierten Status des subretinalen Raumes scheint der Schutz nicht vollständig, um die immunologische Eliminierung der durch Erstgenerationsvektoren transduzierten Zellen zu verhindern. Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten daraufhin, dass durch die Verwendung von HC-Ad-Vektoren diese Probleme gelöst werden können.

7.1.2 Möglichkeiten zur Expression therapeutisch wirksamer Gene im RPE

Diese Arbeit zeigt erstmals die HC-Ad-Vektor-vermittelte langzeitige Transgenexpression im retinalen Pigmentepithel. Dieses Gewebe ist am Metabolismus von Retinol und an

der Phagozytose des äußeren Segments von Photorezeptoren beteiligt. RPE-Zellen synthetisieren eine Reihe trophischer, antiangiogenetischer und antioxidativer Substanzen und sind von einer Reihe bedeutender genetischer Erkrankungen betroffen. Exemplarisch seien hier verschiedene Formen der Retinitis pigmentosa und die altersabhängige Makuladegeneration (ARMD) genannt. Letztere ist eine weit verbreitete multifaktorielle Erkrankung. In Industrieländern ist die ARMD sogar die häufigste Ursache für Erblindung im Alter [44]. Sie ist unter anderem gekennzeichnet durch exzessive choroidale Neovaskularisation und es existieren derzeit keine verlässlichen Therapieformen. Die hier gezeigte langzeitige Transgenexpression mittels eines HC-Ad-Vektors ist die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieformen auf gentherapeutischer Basis. Ein mögliches Ziel könnte hierbei die HC-Ad-Vektor-vermittelte Expression antiangiogenetischer Faktoren sein, die die choroidale Neovaskularisation inhibieren sollen. Basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen ist es uns in weiterführenden Studien tatsächlich gelungen, durch HC-Ad-Vektor-vermittelte Expression von *pigment epithelium derived factor* (PEDF) eine deutliche Inhibierung der choroidalen Neovaskularisation in verschiedenen Tiermodellen für ARMD zu erzielen [124]. Dies stellt ein völlig neues Konzept zur Behandlung dieser Erkrankung dar.

Die für eine effiziente Transduktion des RPE notwendigen Dosen sind sehr gering. Zusätzlich zu den aus immunologischer Sicht überlegenen Eigenschaften von HC-Ad-Vektoren verringert sich hierdurch sowie durch die hochspezifische Transduktion des RPEs nochmals das Risiko unerwünschter Nebeneffekte. Für die Entwicklung weiterführender therapeutischer Konzepte wird wahrscheinlich auch die große Aufnahmekapazität für Transgene von bis zu 36 kB, die HC-Ad-Vektoren auszeichnet, eine bedeutende Rolle spielen können. Erst diese ermöglicht die Anwendung mehrerer Expressionskassetten auf einem Vektor oder den Einsatz von Systemen mit extern regulierbarer Transgenexpression [33].

8 Ergebnisse - Teil III

8.1 Konstruktion eines HC-Ad-Vektorsystems zur stabilen Transgenexpression in proliferierenden Geweben

8.1.1 Rekombinase-vermittelte Zirkularisierung von HC-Ad-Vektoren

Freie DNA-Enden, die bei der Replikation nicht durch einen besonderen Mechanismus wie beispielsweise dem Telomer/Telomerase-System geschützt werden, verkürzen sich. Die Verkürzung episomaler, linearer HC-Ad-Vektorgenome, die zu therapeutischen Zwecken in Zellen eingebracht werden, ist unter anderem auf Grund des möglichen Verlustes kodierender Sequenzen nicht wünschenswert. Eine elegante Möglichkeit, das Problem der freien DNA-Enden von HC-Ad-Vektoren zu umgehen, könnte die Zirkularisierung der HC-Ad-Vektorgenome nach Transduktion der Zielzelle darstellen. Eine solche Zirkularisierung ermöglicht zudem den Einsatz des vielversprechenden oriP/EBNA-1-Replikationssystems, das eine kontrollierte Replikation synchron zum Zellzyklus erlaubt und zirkuläre DNA-Moleküle voraussetzt [125]. Verschiedene Rekombinasesysteme sind für den Zweck der Zirkularisierung linearer HC-Ad-Vektorgenome nach Transduktion der Zielzellen denkbar. Hier sind das Vertebraten-Rekombinase-System Rag-1/Rag-2 oder die Rekombinasesysteme cre/loxP und FLP/Frt der λ -Rekombinasefamilie zu nennen. Die Wahl eines geeigneten Rekombinasesystems ist durch das Produktionssystem für HC-Ad-Vektoren limitiert. Das Produktionssystem, das zur Erzeugung der in dieser Arbeit vorgestellten HC-Ad-Vektoren diente, basiert auf dem cre/loxP-Rekombinasesystem [26]. Die von den Produktionszellen synthetisierte cre-Rekombinase exzidiert hierbei das durch loxP-Sequenzen flankierte Verpackungssignal der Helfervirusgenome, die die Mehrheit der zur Produktion der Vektoren notwendigen Faktoren *in trans* bereitstellen. Die Exzision des Verpackungssignales der Helfervirusgenome verhindert effizient, dass diese in Kapside verpackt werden. Daher trägt die überwiegende Mehrzahl der Virionen einer HC-Ad-Vektorpräparation das gewünschte HC-Ad-Vektorgenom. Die Synthese der cre-Rekombinase in den Produktionszellen bedeutet aber, dass keine HC-Ad-Vektoren produziert werden können, deren Genom loxP-Sequenzen trägt, da diese bereits während der Produktion rekombiniert würden. Somit kommen als Rekombinationssysteme zur Zirkularisierung von HC-Ad-Vektoren dieses Typs nur das Rag-1/Rag-2- oder das FLP/Frt-System in Frage.

Das Rag-1/Rag-2-System

Zunächst wurde versucht, ein Rekombinationssystem zur Zirkularisierung von HC-Ad-Vektoren auf Basis der Rekombinasen Rag-1/Rag-2 zu etablieren. Dieses Rekombinase-system böte gegenüber anderen den Vorteil, dass körpereigene Rekombinasen zu Zirkularisierung von HC-Ad-Vektoren eingesetzt werden könnten, bei deren Expression wahrscheinlich keine immunogenen oder toxischen Nebenwirkungen zu erwarten wären. Es wurde ein HC-Ad-Vektor zur Expression von *Rag-1*, ein weiterer HC-Ad-Vektor zur Expression von *Rag-2* sowie verschiedene HC-Ad-Vektoren mit den entsprechenden Rekombinationssequenzen (RSS) erzeugt. Alle Versuche, mit diesem System eine effiziente Zirkularisierung der HC-Ad-Vektoren zu erzielen, scheiterten jedoch. Aus diesem Grund wird hier auf eine detaillierte Darstellung verzichtet.

Das FLP/Frt-System

Klonierung der Vektoren

Um das FLP/Frt-System auf seine Eignung zur Zirkularisierung von HC-Ad-Vektorge-nomen zu testen, wurde ein binäres Vektorsystem entwickelt. Ein Vektor sollte hierbei das Gen für die FLP-Rekombinase exprimieren. Ein zweiter Vektor sollte Sequenzen tragen, die eine Exzision und Zirkularisierung eines möglichst großen DNA-Fragmentes aus diesem Vektor durch die FLP-Rekombinase erlauben.

Zunächst wurde HC-AdFLPwt erzeugt. Dies ist ein Vektor, der das Wildtyp-Gen der FLP-Rekombinase aus Hefe exprimiert. Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine verbesserte, da temperaturoptimierte FLPe-Rekombinase publiziert [89][88]. So konnte ein weiterer HC-Ad-Vektor konstruiert werden (HC-AdFLPe), der diese verbesserte FLP-Rekombinase (*FLPe*) exprimiert. Des Weiteren wurde ein HC-Ad-Vektor konstruiert, der Frt-Rekombinationssequenzen in paralleler Orientierung trägt (HC-AdFrt#39). Diese sollten die FLP-vermittelte Exzision und Zirkularisierung des zwischen den Frt-Rekombinationsstellen befindlichen DNA-Fragmentes erlauben. Dieser Vektor sowie die später von ihm abgeleiteten Vektoren stellen das Substrat für die FLP-Rekombinase dar und werden daher im Folgenden als Substratvektoren bezeichnet. Zunächst sei die Klonierung der den Vektoren zu Grunde liegenden Plasmide beschrieben. Abbildung 8.1, S. 85 zeigt das Ausgangsplasmid pSTK129 sowie die Karten der HC-Ad-Vektoren .

pAdFLPwt Zunächst wurde die FLPwt-cDNA zusammen mit einem artefiziellen Intron aus pOG44 (Invitrogen) mit den Primern flpseq (5'-CTGGCTAACTAGGGTACCC-AC-3') und flprev (5'-ACATGAGAGGATCCGCATAGTG-3') mittels PCR amplifiziert. Das 1700 bp große PCR-Produkt wurde mit *KpnI/BamHI* geschnitten. Das Plasmid pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe) wurde ebenfalls mit *KpnI/BamHI* geschnitten und das PCR-Produkt unter Erzeugung von pCEP-FLPwt in diese Schnittstellen kloniert. Mittels *SaII*-Verdau konnte die entstandene Expressionskassette mit humanem CMV-Promotor

und SV40-Polyadenylierungssignal (hCMV-FLPwt-pA) aus pCEP-FLPwt isoliert werden. Das Fragment wurde mit glatten Enden versehen und in die *EcoRV*-Schnittstelle von pSTK129, einem Shuttle-Plasmid für HC-Ad-Vektoren, kloniert.

pAdFLPe Die FLPe-Sequenz wurde zusammen mit dem Promotor PCAGS durch Verdau mit *SaII/PacI* aus dem Plasmid pCAGS-FLPe (Geschenk von Francis Stewart, Heidelberg) isoliert. An das *PacI*-Ende dieses Fragments wurde ein Adapter, erzeugt aus den Oligodesoxyribonukleotiden adapt1 (5'-TAACGACACGG-3') und adapt2 (5'-GATCCCGTGTCGTTAAT-3'), ligiert. Der Adapter besitzt eine *BamHI*-Schnittstelle. Das entstandene Fragment konnte daher mit *BamHI* nachgeschnitten und unter Erzeugung von pCEP-FLPe in die *BamHI/XhoI*-Schnittstellen von pCEP4 (Invitrogen) kloniert werden. Das 3500 bp große PCAGS-FLPe-SV40pA-Fragment wurde durch Verdau von pCEP-FLPe mit *NotI/SaII* isoliert, mit glatten Enden versehen und in die *EcoRV*-Schnittstelle von pSTK129 kloniert.

pFrt#39 Zur Erzeugung von pFrt#39, einem Plasmid mit Frt-Rekombinationssequenzen für die FLP-Rekombinase, wurden diese Frt-Rekombinationssequenzen mithilfe der Oligodesoxyribonukleotide frtseq (5'-GGAGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTC-TCTAGAAAGTATAGGAACTTCAAGC-3') und frtrev (5'-GCTTGAAGTTCCTAT-AC TTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCTCC-3') erzeugt und in die *SrfI*- und die *Kpn2I*-Schnittstelle des Plasmides pSTK129 in paralleler Orientierung kloniert. Die Distanz zwischen den beiden Frt-Stellen beträgt in pFrt#39 22 kB. Das DNA-Segment zwischen den Frt-Stellen enthält eine singuläre *NotI*- und eine singuläre *SwaI*-Schnittstelle. Dies erlaubt die Aufnahme von Transgenen, die auch auf einem exziierten Zirkel erhalten bleiben. Diese Schnittstellen wurden zur Erzeugung verschiedener Derivate von pFRT#39 genutzt, die später beschrieben werden.

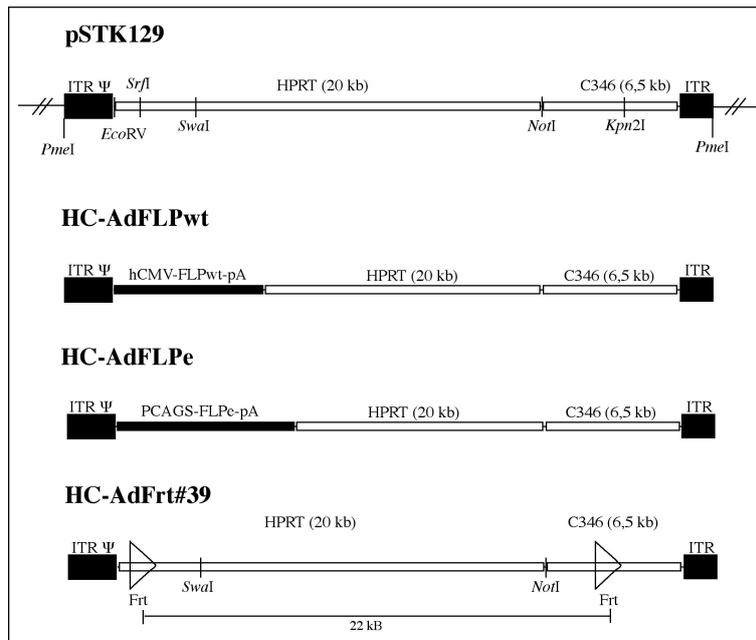


Abbildung 8.1: HC-Ad-Vektoren zum Testen der Effizienz des FLP/Frt-Rekombinasesystems. Die Vektoren basieren auf pSTK129, einem Shuttle-Plasmid zur Erzeugung von HC-Ad-Vektoren, das seinerseits auf pBluescript (Stratagene, Heidelberg) beruht. pBluescript ist durch die mit Schrägstrichen unterbrochenen Linien links und rechts der ITRs angedeutet. HC-AdFLPwt exprimiert die Wildtyp-Variante der FLP-Rekombinase aus Hefe, HC-AdFLPe eine temperaturoptimierte Variante dieser Rekombinase. HC-AdFrt#39 trägt zwei *Frt*-Rekombinationssequenzen in paralleler Orientierung und kann daher durch FLP rekombiniert werden. Hierbei entstehen 22 kb große, zirkuläre DNA-Moleküle.

Assay zur Ermittlung der Rekombinationseffizienz

Das DNA-Fragment zwischen den Frt-Rekombinationsstellen des Vektors HC-AdFrt#39 sollte bei Kotransduktion dieses Vektors mit den Vektoren HC-AdFLPwt oder HC-AdFLPe durch die FLP-Rekombinase exzidiert und zirkularisiert werden. Der Nachweis der Rekombination und die Quantifizierung ihrer Effizienz kann am besten in einem Southern-Transfereperiment und nachfolgender Analyse der Bandenintensitäten in einem Phosphorimager durchgeführt werden. Daher wurde ein Assay entwickelt, der auf Kotransduktion der Zellen mit den Vektoren HC-AdFrt#39 und HC-AdFLPwt oder HC-AdFLPe, Präparation der genomischen DNA aus diesen Zellen, Verdau der DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym, Trennung der Fragmente in einem Agarosegel und Transfer der DNA auf eine Nylonmembran beruht. Als Restriktionsenzym wurde *HindIII* gewählt. Ein 600 bp langes DNA Fragment aus der intronischen *HPRT*-Region der Vektoren wurde per PCR aus dem Plasmid pFrt#39 mit den Primern probeseq (5'-TG TGATGCCTGCCCCAGTAT-3') und proberev (5'-TTCTTAGCTCAAGTGCGTCCA-3') amplifiziert und diente zur Generierung einer ³²P-markierten Sonde, die zum Nachweis der DNA-Fragmente auf den Nylonmembranen eingesetzt wurde. Abbildung 8.2, S. 87 zeigt eine schematische Darstellung der Rekombination von HC-AdFrt#39 durch die FLP-Rekombinase und den Nachweis der entsprechenden DNA-Fragmente. Nach Verdau mit *HindIII* kann mit der *HPRT*-Sonde ein 2200 bp großes DNA-Fragment, das diagnostisch für die rekombinierte, zirkuläre Form von HC-AdFrt#39 ist, nachgewiesen werden. Nicht-rekombinierte, lineare HC-AdFrt#39-Genome werden mit dieser Sonde durch ein 3300 bp großes Fragment nachgewiesen. Ein Vergleich der Bandenintensitäten bei 2200 bp und 3300 bp erlaubt die Quantifizierung der Rekombinationseffizienz. Der Vektor HC-AdFLPe, der wie die anderen Vektoren auf pSTK129 basiert, enthält ebenfalls den der Sonde entsprechenden intronischen *HPRT*-Bereich und kann daher durch eine Bande bei 6800 bp nachgewiesen werden. Der Nachweis des Vektors HC-AdFLPwt erfolgt über ein 4500 bp großes DNA-Fragment. Bei diesem Assay ist zu beachten, dass die aus humanen Zellen präparierte genomische DNA ebenfalls das durch die gezeigte Sonde nachgewiesene *HPRT*-Fragment enthält. Dieses besitzt nach Restriktion mit *HindIII* eine Größe von 6800 bp.

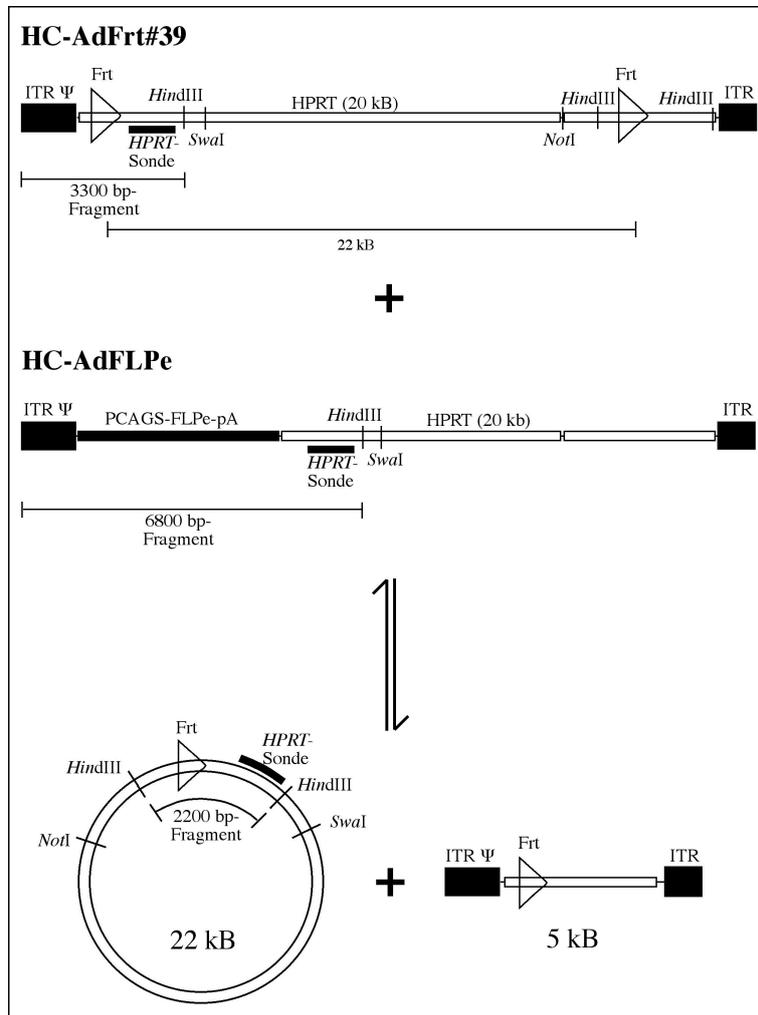


Abbildung 8.2: Schematische Darstellung der Rekombination von HC-AdFrt#39 durch FLP. Nach Restriktion mit *Hind*III entsteht ein 2200 bp Fragment, das diagnostisch für die rekombinierte, zirkuläre Form von HC-AdFrt#39 ist. Diagnostisch für nicht-rekombinierten, linearen HC-AdFrt#39 ist ein 3300 bp Fragment. Für den Vektor HC-AdFLPe ist ein 6800 bp Fragment diagnostisch. Diese Fragmente können in einem Southern-Transferexperiment mit der gezeigten HPRT-Sonde nachgewiesen werden. Nicht gezeigt ist HC-AdFLPwt, der durch ein 4500 bp großes Fragment nachgewiesen werden kann.

Vergleich der Effizienz der Rekombinasen FLPwt und FLPe

Zunächst wurde die Effizienz der Rekombination durch FLPwt geprüft. Hierzu wurden je $2 \cdot 10^6$ A549-Zellen mit 100 MOI HC-AdFrt#39, 100 MOI HC-AdFLPwt sowie 100 MOI beider Vektoren gemeinsam transduziert. 48 h nach der Transduktion wurden die Zellen geerntet und genomische DNA präpariert. Diese wurde in der oben beschriebenen Weise einem Southern-Transfer unterzogen. Abbildung 8.3, S. 89 zeigt das Ergebnis. Bei Kotransduktion mit HC-AdFLPwt werden ca. 10% der HC-AdFrt#39-Genome rekombiniert (diagnostische Bande bei 2200 bp). Diese Effizienz konnte auch in HeLa-, HepG2-, 293- und Hepa1-6-Zellen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Effizienz der Rekombination von HC-AdFrt#39 durch die temperaturoptimierte Rekombinase FLPe wurde im direkten Vergleich mit FLPwt mittels Kotransduktion von je $2 \cdot 10^6$ A549-Zellen mit 20 MOI HC-AdFrt#39 und 5 MOI HC-AdFLPe oder 10 MOI HC-AdFLPwt ermittelt. 48 h nach Transduktion erfolgte die Ernte der Zellen und die Präparation der genomischen DNA. Abbildung 8.4, S. 90 zeigt das Ergebnis des Southern-transfers, der mit diesen DNAs durchgeführt wurde. Bei Einsatz niedriger Mengen des Vektors HC-AdFLPwt kann keine FLP-vermittelte Rekombination von HC-AdFrt#39 nachgewiesen werden. HC-AdFLPe hingegen führt zu FLPe-vermittelter Zirkularisierung von 60-70% der HC-AdFrt#39-Genome.

In einem weiteren Experiment wurde eine eventuelle Abhängigkeit der Rekombinationseffizienz von den Mengenverhältnissen zwischen HC-AdFLPe und HC-AdFrt#39 geprüft. Hierzu wurden A549-Zellen mit konstant 10 MOI HC-AdFLPe und steigenden Mengen HC-AdFrt#39 koinifiziert. 48 h nach Transduktion wurden die transduzierten Zellen geerntet, die genomische DNA präpariert und dem beschriebenen Southern-Assay unterzogen. Abbildung 8.5, S. 90 zeigt das Ergebnis. In jedem der gezeigten Mengenverhältnisse werden 60-70% der HC-AdFrt#39-Genome zirkularisiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Rekombinasen FLPe und FLPwt zur Erzeugung großer Zirkel aus HC-AdFrt#39 geeignet sind. FLPe zeigt hierbei eine um Faktor sechs bis sieben höhere Effizienz. Daher wurde in den nachfolgend gezeigten Experimenten zur Replikation der Zirkel ausschließlich HC-AdFLPe in der gleichen Menge wie der jeweilige Substratvektor eingesetzt.

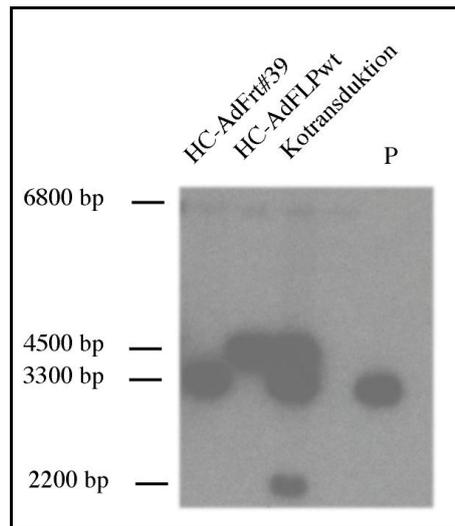


Abbildung 8.3: Rekombinationseffizienz durch FLPwt in A549-Zellen. Die Zellen wurden mit 100 MOI der bezeichneten Vektoren transduziert und nach 48 h die genomische DNA präpariert. Die Bande bei 2200 bp ist diagnostisch für die rekombinierte, zirkuläre Form von HC-AdFrt#39. Die Bande bei 3300 bp entspricht nicht-rekombiniertem HC-AdFrt#39. Das *Hind*III-Fragment bei 4500 bp entspricht HC-AdFLPwt. Die Banden mit der Größe von 6800 bp entsprechen dem zelleigenen *HPRT*-Fragment. P ist pFrt#39, das zuvor mit *Pme*I/*Hind*III verdaut wurde. 10% der Genome von HC-AdFrt#39 werden bei Kotransduktion mit HC-AdFLPwt rekombiniert.

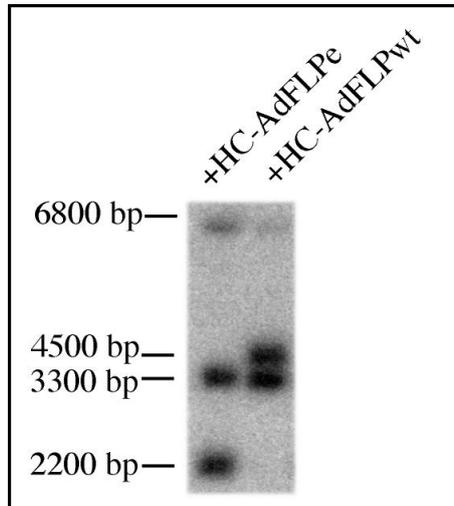


Abbildung 8.4: Vergleich der Rekombinationseffizienz von FL-Pwt und FLPe. Die Zellen wurden mit 20 MOI HC-AdFrt#39 und 5 MOI HC-AdFLPe oder 10 MOI HC-AdFLPwt kotransduziert. 48 h nach Transduktion wurde die genomische DNA präpariert. Die Fragmentgrößen bedeuten: 2200 bp: rekombinierte HC-AdFrt#39-Genome, 3300 bp: nicht-rekombinierte HC-AdFrt#39-Genome, 4500 bp: HC-AdFLPwt, 6800 bp: HC-AdFLPe und zelluläres *HPRT*-Fragment. Bei Transduktion mit niedrigen Mengen HC-AdFLPwt ist keine Rekombination von HC-AdFrt#39 nachweisbar. Bei Kotransduktion mit HC-AdFLPe hingegen werden 60-70% der HC-AdFrt#39-Genome rekombiniert.

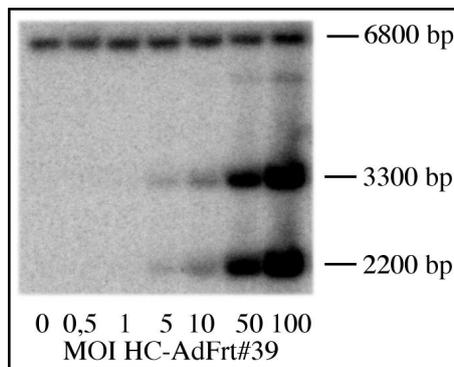


Abbildung 8.5: Abhängigkeit der Rekombinationseffizienz von dem Mengenverhältnis HC-AdFLPe/HC-AdFrt#39. In allen gezeigten Mengenverhältnissen werden 60-70% der HC-Ad-Vektorgenome durch FLPe zirkularisiert (diagnostische Bande bei 2200 bp).

8.1.2 Replizierende HC-Ad-Vektoren unter Selektionsbedingungen

Klonierung der Vektoren

Um die Fähigkeit von HC-Ad-Vektoren zur Replikation unter Selektionsbedingungen in stark replizierenden Tumorzelllinien zu testen, wurden auf der Basis von pFrt#39 verschiedene Plasmide erzeugt, die zusätzlich zu den *Frt*-Rekombinationsstellen für die FLP-Rekombinase weitere Eigenschaften besitzen, die eine Replikation und regelgerechte Segregation in humanen Zellen erlauben sollten. Hierfür wurde zum einen das oriP/EBNA-1-System aus EBV [125] und zum anderen der gut charakterisierte humane Replikationsursprung aus dem Lamin-B2-Gen gewählt [106][107]. Aus diesen Plasmiden wurden die entsprechenden HC-Ad-Vektoren erzeugt. Abbildung 8.6, S. 92 zeigt die HC-Ad-Vektorkarten. Auch diese Vektoren werden im Folgenden als „Substratvektoren“ bezeichnet. Sie tragen diese Bezeichnung, da sie in den beschriebenen Assays als Substrat für die FLPe-Rekombinase dienen, die aus den linearen HC-Ad-Vektoren bis zu 28 kB große DNA-Fragmente exizidiert und zirkularisiert, um das Problem einer korrekten Replikation freier DNA-Enden zu umgehen. Im Folgenden wird die Klonierung der Plasmide beschrieben.

pHyg22 pHyg22 beinhaltet neben den *Frt*-Sequenzen zusätzlich eine Expressionskassette für ein Hygromycinresistenz-EGFP-Fusionsprotein. Diese 3000 bp große Expressionskassette (hCMV-Promotor, SV40-Polyadenylierungssignal) wurde durch Verdau mit *Clal*/*Bgl*III aus pHyg-EGFP (Clontech, Heidelberg) isoliert, mit glatten Enden versehen und in die ebenfalls mit glatten Enden versehen *Not*I-Schnittstelle von pFrt#39 (s. Abb. 8.1, S. 85) kloniert.

pHygLam pHygLam basiert auf pHyg22 und beinhaltet zusätzlich ein 1200 bp großes Fragment, das den humanen Replikationsursprung des Lamin-B2-Genlokus beinhaltet. Dieser wurde aus genomischer DNA der humanen N52E6-Zelllinie durch PCR mit den Primern Humlam1 (5'-AGACTGATTTAAATCAGACGCCACCCAGCCCTGG-3') und Humlam2 (5'-AGACTGATTTAAATCGGAGCCGAAGCCGCCCTC-3') amplifiziert. An ihrem 5'-Ende tragen diese Primer jeweils eine *Swa*I-Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde mit *Swa*I verdaut und in die *Swa*I-Schnittstelle von pHyg22 kloniert. Zur Kontrolle wurde das Fragment nach der Klonierung sequenziert.

pHygEBNA pHygEBNA basiert ebenfalls auf pHyg22. Es beinhaltet zusätzlich eine Expressionskassette für *EBNA-1* sowie den Replikationsursprung oriP. Die durch den SR α -Promotor gesteuerte Expressionskassette für *EBNA-1* wurde zusammen mit oriP durch Verdau des Plasmides p2747-1 (Geschenk von W. Hammerschmidt, München) mit *Pvu*II isoliert, mit glatten Enden versehen und in die *Swa*I-Schnittstelle von pHyg22 kloniert.

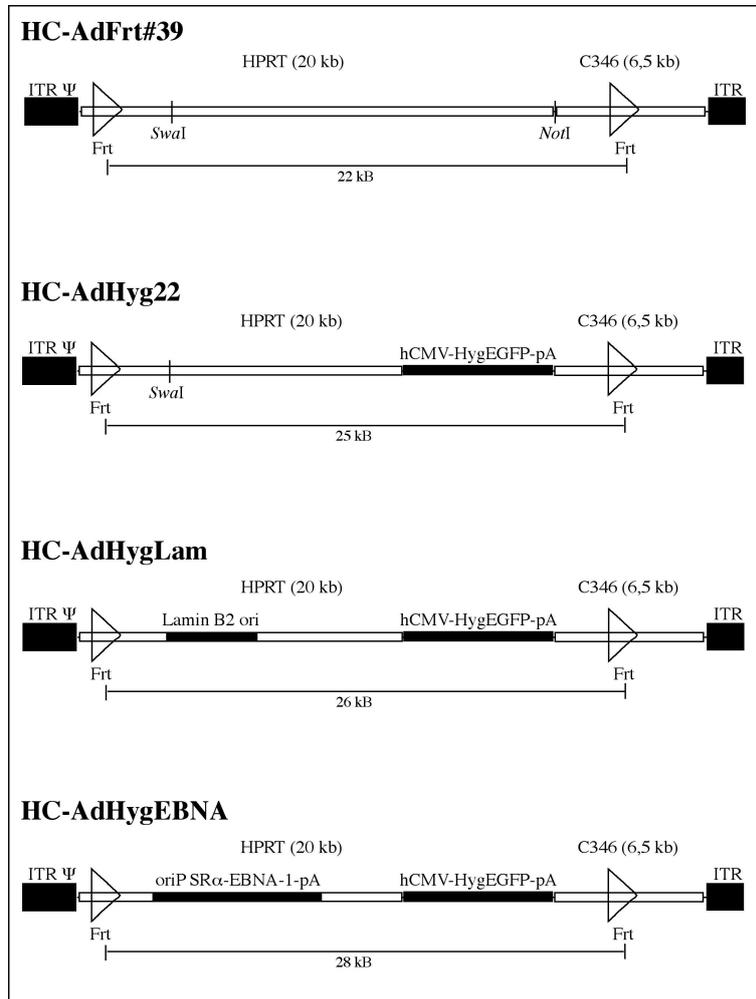


Abbildung 8.6: HC-Ad-Vektoren zum Testen der Replikation in stark proliferierenden Tumorzelllinien. HC-AdFrt#39 ist der Basisvektor. Er enthält zwei Frt-Erkennungssequenzen in paralleler Orientierung. Das DNA-Segment zwischen den Frt-Sequenzen kann durch die FLP-Rekombinase exzidiert und zirkularisiert werden. Die Größen der exzidierbaren Fragmente sind unter jedem Vektor angegeben. HC-AdHyg22 synthetisiert ein Fusionsprotein aus Hygromycin-Resistenz und EGFP. HC-AdHygLam enthält zusätzlich ein 1,2 kb Fragment des humanen LaminB2-Lokus, das als Replikationsursprung beschrieben ist. HC-AdHygEBNA enthält den EBV-oriP und eine durch den SR α -Promotor gesteuerte Expressionskassette für *EBNA-1*.

Assay zur Kontrolle der Replikationsfähigkeit

Die Fähigkeit der Vektoren zur Replikation und regelgerechten Segregation der replizierten Genome wurde in den stark proliferierenden Tumorzelllinien A549 und HeLa getestet. Hierzu wurden in Doppelbestimmung je $2 \cdot 10^6$ Zellen mit 20 MOI des entsprechenden Substratvektors und 20 MOI HC-AdFLPe kotransduziert. 36 h nach Transduktion wurde das Medium gegen frisches, das mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin versetzt war, ausgetauscht. Die Zellen wurden zum ersten Mal vier Tage nach Transduktion in einem Verhältnis von 1:5 passagiert. Zur Aufrechterhaltung stringenter Selektionsbedingungen wurde alle 2 Tage das Medium gewechselt und die Zellen zweimal pro Woche im Verhältnis 1:5 passagiert. Bei jeder Passage wurden 2/5 der Zellen bei 300xg 5 min zentrifugiert, in 200 μl PBS/50 mM EDTA resuspendiert und bei -80°C eingefroren. 60 Tage nach der Transduktion wurde die Selektion abgesetzt und die Zellen in Medium ohne Antibiotikum weiter kultiviert. Die Passageraten änderten sich hierbei nicht.

Von ausgewählten Zeitpunkten wurde genomische DNA der eingefrorenen Zellaliquots präpariert, mit *Hind*III verdaut, nach Fragmenttrennung in einem 0,8% Agarosegel einem Southern-Transfer unterzogen und die Membran mit der ^{32}P -markierten *HPRT*-Sonde hybridisiert. Der verwendete Assay ist derselbe, wie der zur Ermittlung der Rekombinationseffizienz von FLPe und FLPwt (s. Abb. 8.2, S. 87). Die mit der *HPRT*-Sonde nachzuweisenden diagnostischen Fragmente unterscheiden sich für die verschiedenen Substratvektoren nicht von denen für HC-AdFrt#39. Bei Kotransduktionen von HC-AdFLPe mit einem Substratvektor ist ein direkter Vergleich des Erhalts zweier unterschiedlicher Vektoren in denselben Zellen möglich. Die Bandenintensitäten wurden mittels Phosphorimager bestimmt und zur Kopienzahlberechnung herangezogen.

Abbildung 8.7, S. 94 zeigt das Ergebnis des Transfers der DNAs aus dem oben beschriebenen Experiment. Alle Vektoren liegen vier Tage nach Kotransduktion mit HC-AdFLPe zu 60-70% in der zirkulären Form vor, wie ein Vergleich der Bandenintensitäten bei 3300 bp (diagnostisch für die lineare Form) und 2200 bp (diagnostisch für die zirkuläre Form) zeigt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Experimenten zur Analyse der Rekombinationseffizienz. Die lineare Form der Vektoren HC-AdHyg22, HC-AdHygLam und HC-AdHygEBNA kann bereits 12 Tage nach Transduktion nicht mehr nachgewiesen werden (3300 bp-Bande). Gleiches gilt für die zirkuläre Form der Vektoren HC-AdHyg22 und HC-AdHygLam (2200 bp-Bande). Sowohl in HeLa- als auch in A549-Zellen ist für die zirkuläre Form des Vektors HC-AdHygEBNA (2200 bp-Bande) zunächst eine Reduzierung der Kopienzahl von 10-12 Kopien pro Zelle an Tag 4 nach Transduktion auf 3-4 Kopien pro Zelle an Tag 12 nach Transduktion zu verzeichnen. Diese zirkuläre Form ist sowohl in HeLa als auch in A549-Zellen noch 30 Tage nach Transduktion nachweisbar. In HeLa-Zellen erfolgt eine weitere Reduzierung der Kopienzahl auf 1-2 Kopien pro Zelle an Tag 30. In A549-Zellen sind bis Tag 30 stabil 3-4 Kopien pro Zelle nachweisbar (diagnostische Bande bei 2200 bp). Die Bande bei 6800 bp entsteht aus Überlagerung der Signale der linearen Form von HC-AdFLPe, mit dem zur Zirkularisierung der Substratvektors

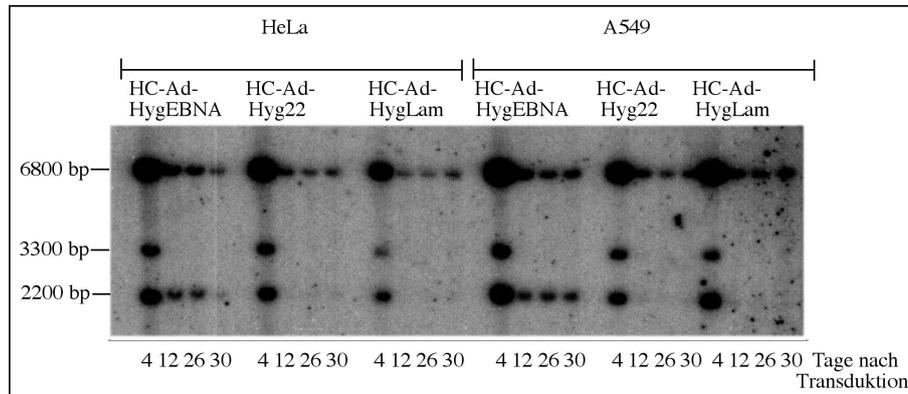


Abbildung 8.7: Fähigkeit der Vektoren HC-AdHyg22, HC-AdHygLam und HC-AdHygEBNA zur Replikation in den Tumorzelllinien HeLa (linke Hälfte) und A549 (rechte Hälfte). Die lineare Form aller Vektoren (diagnostische Bande bei 3300 bp) ist 12 Tage nach Transduktion nicht mehr nachweisbar. Die zirkuläre Form (diagnostische Bande bei 2200 bp) der Vektoren HC-AdHyg22 und HC-AdHygLam ist ebenfalls 12 Tage nach Transduktion in HeLa und A549-Zellen nicht mehr nachweisbar. Die zirkuläre Form von HC-AdHygEBNA hingegen repliziert in HeLa- und A549-Zellen und ist 30 Tage nach Transduktion mit 1-2 Kopien (HeLa) bzw. 3-4 Kopien (A549) pro Zelle nachweisbar. Die Bande bei 6800 bp entsteht durch Überlagerung der diagnostischen Bande für die lineare Form von HC-AdFLPe, mit dem kotransduziert wurde, und dem zelleigenen HPRT-Fragment. Auch der lineare Vektor HC-AdFLPe ist nach 12 Tagen nicht mehr nachzuweisen. Die Signale des zelleigenen HPRT-Fragmentes der jeweiligen Zelllinie 26 und 30 Tage nach Transduktion wurden zur Berechnung der Kopienzahlen herangezogen.

ren kotransduziert wurde, und dem zelleigenen HPRT-Fragment. Die lineare Form von HC-AdFLPe ist analog zu den linearen Formen der anderen Vektoren nach 12 Tagen nicht mehr nachweisbar. Die Signale des zelleigenen HPRT-Fragmentes der jeweiligen Zelllinie 26 und 30 Tage nach Transduktion wurden zur Berechnung der Kopienzahlen herangezogen.

Es wurde ein weiterer Southern-Transfer mit DNA aus HeLa- und A549-Zellen zu späteren Zeitpunkten nach Kotransduktion mit HC-AdHygEBNA und HC-AdFLPe durchgeführt. Dieser beinhaltete auch Zeitpunkte nach Absetzen der Selektion (Tag 65 und 75, d.h. 5 und 15 Tage nach Absetzen der Selektion). Als Kopienzahlkontrolle diente DNA aus nicht-transduzierten HeLa- bzw. A549-Zellen. Abbildung 8.8, S. 95 zeigt das Ergebnis. Die zirkuläre Form von HC-AdHygEBNA ist in HeLa-Zellen bis Tag 40 nachweisbar. Zwischen Tag 26 und Tag 40 nimmt die Kopienzahl von ca. 2 auf ca. 0,5 Kopien pro Zelle ab. In A549-Zellen bleibt die zirkuläre Form von HC-AdHygEBNA hingegen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 75 Tagen in einer konstanten Kopienzahl von

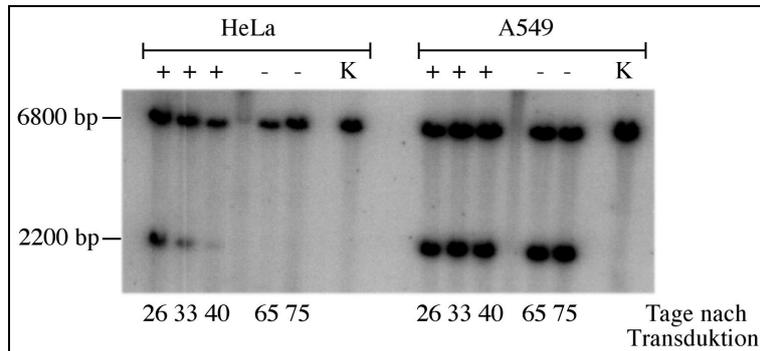


Abbildung 8.8: Southern-Transfer von DNA aus HeLa- (linke Hälfte) und A549-Zellen (rechte Hälfte) zu späten Zeitpunkten nach Kotransduktion mit HC-AdHygEBNA und HC-AdFLPe. (+) bedeutet, dass die Zellen unter Selektion mit Hygromycin kultiviert wurden. Die Selektion wurde am Tag 60 nach Transduktion abgesetzt. (-) bedeutet, dass die Zellen zum entsprechenden Zeitpunkt ohne Hygromycin kultiviert wurden. (K) sind nicht-transduzierte Kontrollzellen des jeweiligen Typs. Die Bande bei 6800 bp entspricht dem zelleigenen HPRT-Fragment und wurde zur Berechnung der Kopienzahl verwendet. Die zirkuläre Form von HC-AdHygEBNA (diagnostische Bande bei 2200 bp) ist bis Tag 40 nach Transduktion in HeLa-Zellen mit abnehmenden Kopienzahlen nachweisbar (ca. 0,5 Kopien pro Zelle an Tag 40). In A549-Zellen ist die zirkuläre Form von HC-AdHygEBNA mit einer konstanten Kopienzahl von 2-3 Kopien pro Zelle bis Tag 75 nachweisbar. Das Absetzen der Selektion an Tag 60 hatte keinen Einfluss auf den Erhalt einer konstanten Kopienzahl.

2-3 Kopien pro Zelle erhalten. Auch das Absetzen der Selektion an Tag 60 hatte keinen Einfluss den Erhalt dieser Kopienzahl.

Teilzusammenfassung

Die Experimente zeigen, dass die durch FLPe rekombinierte, zirkuläre Form des Vektors HC-AdHygEBNA unter Selektionsbedingungen in den stark proliferierenden Tumorzelllinien A549 und HeLa erhalten bleibt. Da dies weder für die lineare Form dieses Vektors noch für die Vektoren HC-AdHyg22 und HC-AdHygLam zutrifft, kann davon ausgegangen werden, dass diese zirkuläre Form mithilfe des oriP/EBNA-1-Replikationssystemes in den Zellen repliziert. Der humane Replikationsursprung aus dem Lamin-B2-Genlocus führte nicht zur Bildung stabiler Replikons.

Weitere Beobachtungen

Die Vektoren HC-AdHyg22, HC-AdHygLam und HC-AdHygEBNA synthetisieren ein Fusionsprotein aus Hygromycin-Resistenz und EGFP (s. Abb.8.6, 92). Die entsprechende Expressionskassette wurde ursprünglich gewählt, um parallel zu den Assays zur Kopienzahlbestimmung ein Verfolgen der Transgenexpression mittels durchflusscytometrischer Messungen zu ermöglichen. In verschiedenen Versuchen wurde jedoch auch bei Einsatz sehr hoher Kopienzahlen (20-100 Kopien pro Zelle) festgestellt, dass nur ein kleiner Anteil der transduzierten Zellen EGFP-spezifische Fluoreszenz zeigte. Diese Expressionskassette schien daher ungeeignet für das Verfolgen der Transgenexpression, insbesondere bei Vorliegen niedriger Kopienzahlen.

Nach Transduktion mit mehr als 20 MOI des Vektors HC-AdHygEBNA wurde eine Verlangsamung des Zellwachstums um bis zu Faktor 2 sowohl bei A549- als auch bei HeLa-Zellen festgestellt, wenn die Zellen ohne Hygromycin kultiviert wurden. Dies konnte nach Transduktion mit den Vektoren HC-AdHyg22 und HC-AdHygLam nicht beobachtet werden. Es wurde daher vermutet, dass diese Verlangsamung des Zellwachstums mit der starken Überexpression von *EBNA-1* durch den $SR\alpha$ -Promotor zusammen hängen könnte.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde ein weiterer Satz an Vektoren konstruiert, die zum einen ein Verfolgen der Transgenexpression erlauben und zum anderen geringere *EBNA-1*-Expression aufweisen sollten. Hierbei wurde auf die Option zur Selektion verzichtet.

8.1.3 Replikation von HC-Ad-Vektoren ohne Selektion

Klonierung der Vektoren

Die unter Selektion gemachten Beobachtungen führten zur Konstruktion weiterer HC-Ad-Vektoren. Diese basieren ebenfalls auf pFrt#39 und erlauben daher die Exzision großer Zirkel durch die FLPe-Rekombinase. Auch die Anwendung des beschriebenen Southerntransfer-Assays ist ohne Modifikation mit diesen Vektoren möglich. Im Folgenden ist die Klonierung der verschiedenen Vektorplasmide beschrieben. Abbildung 8.9, S. 99 zeigt die entsprechenden HC-Ad-Vektorkarten.

pSVGFP pSVGFP beinhaltet neben den Frt-Sequenzen eine Expressionskassette für *EGFP*. Diese 1200 bp große Expressionskassette (hCMV-Promotor, SV40-Polyadenylierungssignal) wurde durch Verdau mit *AflIII/AflIII* aus pEGFP-N1 (Clontech) isoliert, mit glatten Enden versehen und in die ebenfalls mit glatten Enden versehene *NotI*-Schnittstelle von pFrt#39 kloniert.

pSVLam pSVLam basiert auf pSVGFP und beinhaltet zusätzlich ein 1200 bp großes Fragment, das den humanen Replikationsursprung des Lamin-B2-Genlocus beinhaltet. Dieser wurde aus genomischer DNA der N52E6-Zelllinie durch PCR amplifiziert (s. pHygLam). Das PCR-Produkt wurde mit *SwaI* verdaut, in die *SwaI*-Schnittstelle von pSVGFP kloniert und anschließend sequenziert.

pSVEBNAs pSVEBNAs basiert ebenfalls auf pSVGFP. Es beinhaltet zusätzlich eine Expressionskassette für *EBNA-1* sowie den Replikationsursprung oriP. Die durch den SR α -Promotor gesteuerte Expressionskassette für *EBNA-1* wurde zusammen mit oriP durch Verdau des Plasmides p2747-1 (Geschenk von W. Hammerschmidt, München) mit *PvuII* isoliert, mit glatten Enden versehen und in die *SwaI*-Schnittstelle von pSVGFP kloniert.

pSVEBNAs Δ FR pSVEBNAs Δ FR basiert ebenfalls auf pSVGFP. Es beinhaltet dieselbe Expressionskassette für *EBNA-1* wie pSVEBNAs, allerdings wurde der *family of repeats* (FR) des oriP deletiert. Der FR ist im oriP/*EBNA-1*-Replikationssystem für eine regelgerechte Verteilung der replizierten Genome auf die Tochterzellen verantwortlich. Zunächst wurde der FR in p2747-1 durch Verdau mit *HindIII* und *MluI* entfernt. Nach Erzeugung glatter Enden wurde das Plasmid religiert und die Expressionskassette für *EBNA-1* zusammen mit dem teildeletierten oriP durch Verdau mit *PvuII* isoliert. Nach Erzeugung glatter Enden wurde das Fragment in die *SwaI*-Schnittstelle von pSVGFP kloniert.

pSVEBNAw pSVEBNAw basiert ebenfalls auf pSVGFP. Es beinhaltet das *EBNA-1*-Gen aus dem EBV-Stamm B95-8 sowie den Replikationsursprung oriP. Die Expressionskassette für *EBNA-1* wurde zusammen mit oriP durch Verdau des Plasmides pCEP4 (Invitrogen) mit *SaII* und *ClaI* isoliert, mit glatten Enden versehen und in die *SwaI*-Schnittstelle von pSVGFP kloniert.

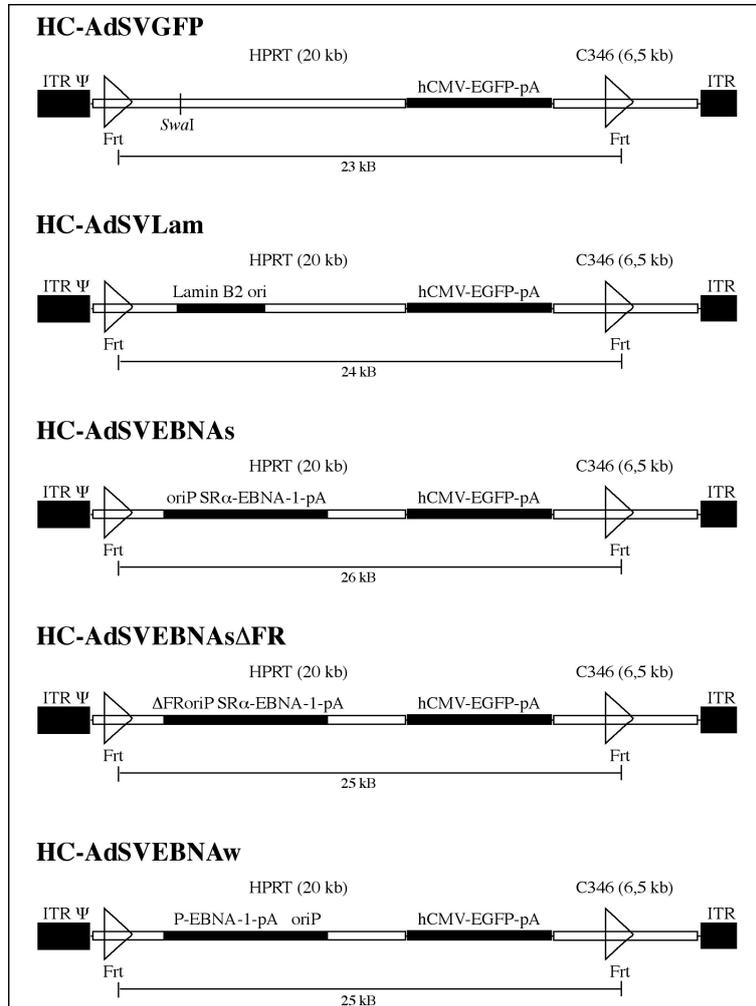


Abbildung 8.9: HC-Ad-Vektoren ohne Selektionsoption. Die gezeigten Vektoren basieren auf pFrt#39 (s. Abb. 8.6, S. 92). HC-AdSVGFP synthetisiert EGFP. HC-AdSVLam enthält zusätzlich ein 1,2 kB Fragment des humanen LaminB2-Lokus, das als Replikationsursprung beschrieben ist. HC-AdSVEBNAs enthält den EBV-oriP und eine durch den SR α -Promotor gesteuerte Expressionskassette für EBNA-1. HC-AdSVEBNAs Δ FR entspricht HC-AdSVEBNAs, besitzt aber kein *family of repeats*-Element (FR). HC-AdSVEBNAw enthält das EBNA-1-Gen aus dem EBV-Stamm B95-8.

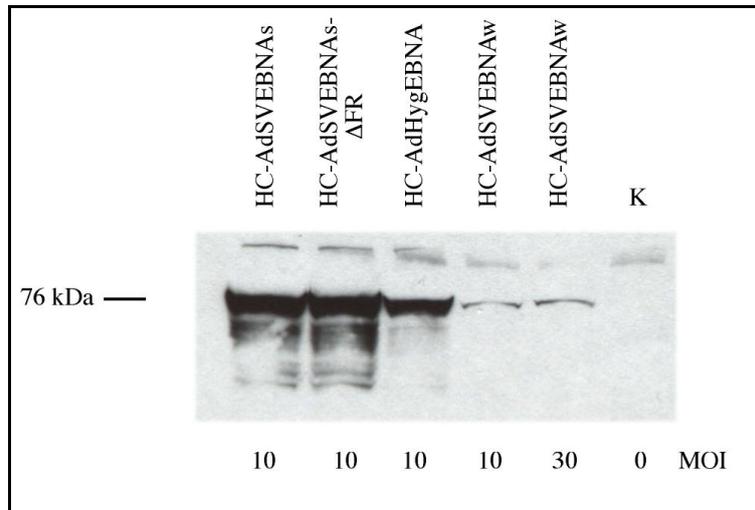


Abbildung 8.10: Nachweis von EBNA-1 in 293-Zellen, die mit den entsprechenden Vektoren transduziert wurden. Die Transduktion mit den Vektoren, die *EBNA-1* unter Kontrolle des *SR α* -Promotors exprimieren, führt zu stärkerer Synthese von EBNA-1 als die Transduktion mit HC-AdSVEBNAw. Die untere Zahlenreihe gibt die für die Transduktion eingesetzten Vektormengen an. K ist Totalprotein aus nicht-transduzierten Zellen.

Nachweis der Expression von *EBNA-1*

Zum Nachweis der Expression von *EBNA-1* durch die entsprechenden HC-Ad-Vektoren und zum Vergleich der Expressionsstärke zwischen den Vektoren wurden je $2 \cdot 10^6$ 293-Zellen mit 10 MOI HC-AdSVEBNAs, HC-AdSVEBNAs Δ FR, HC-AdHygEBNA und HC-AdSVEBNAw transduziert. Zusätzlich wurde dieselbe Zellzahl mit 30 MOI HC-AdSVEBNAw transduziert. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte 293-Zellen. 48 h nach Transduktion wurden die Zellen geerntet und eine Totalproteinpräparation vorgenommen. Gleich große Aliquots der Proteinpräparationen wurden einer SDS-PAGE und anschließend einem Western-Transfer unterzogen. Der Nachweis von EBNA-1 auf der Nitrocellulosemembran erfolgte mittels anti-EBNA-1-Hybridomüberstand (Geschenk von W. Hammerschmidt, München) und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Abbildung 8.10, S. 100 zeigt das Ergebnis des immunchemischen Nachweises. Nach Transduktion mit den Vektoren HC-AdSVEBNAs, HC-AdSVEBNAs Δ FR und HC-AdHygEBNA wird deutlich mehr EBNA-1 synthetisiert als nach Transduktion mit HC-AdSVEBNAw.

Assays zum Verfolgen der *EGFP*-Expression und Kontrolle der Replikationsfähigkeit

Die Substratvektoren HC-AdSVGFP, HC-AdSVLam und HC-AdSVEBNAw

Verlustkinetik in A549 und HeLa-Zellen Zur Kontrolle der Replikationsfähigkeit sowie zum Verfolgen der Transgenexpression über die Dauer des Experimentes wurden in Doppelbestimmung je $2 \cdot 10^6$ HeLa und A549-Zellen mit 100 MOI des entsprechenden Substratvektors sowie der gleichen Menge HC-AdFLPe kotransduziert. Des Weiteren wurden in Doppelbestimmung je $2 \cdot 10^6$ HeLa und A549-Zellen nur mit den jeweiligen Substratvektoren transduziert. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Zellen. Die Zellen wurden vier Tage nach Transduktion in einem Verhältnis von 1:8 passagiert. Fortan wurden die Zellen zweimal pro Woche 1:8 passagiert. Bei jeder Passage wurde 1/4 der Zellen bei 300xg 5 min zentrifugiert, in 200 μ l PBS/50 mM EDTA resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Zusätzlich wurde 1/8 der Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der Expression von *EGFP* untersucht.

Der zeitliche Verlauf der Expression war unabhängig von einer Kotransduktion mit HC-AdFLPe. Abbildung 8.11, S. 102 zeigt diesen Verlauf nach Kotransduktion mit HC-AdFLPe für den jeweiligen Substratvektor in beiden Zelllinien. Nach 15-20 Tagen war in allen Fällen keine Expression von *EGFP* mehr nachweisbar.

Von ausgewählten Zeitpunkten wurde aus den eingefrorenen Zellen genomische DNA präpariert, mit *HindIII* verdaut und nach Fragmenttrennung in einem 0,8% Agarosegel einem Southern-Transfer unterzogen. Der Assay ist derselbe wie in Abschnitt 8.1.2, S. 91 beschrieben.

Abbildung 8.12, S.103 zeigt den Transfer mit genomischer DNA, die aus A549-Zellen präpariert wurde. Aus dem Vergleich der Bandenintensitäten bei 2200 bp (diagnostisch für die zirkuläre Form) und 3300 bp (diagnostisch für die lineare Form) kann bei Kotransduktion mit 100 MOI HC-AdFLPe eine Rekombinationseffizienz von 60-80% ermittelt werden. Unabhängig von der Rekombination durch FLPe kommt es bei allen Substratvektoren zu einem starken initialen Verlust, so dass an Tag 4 nach Transduktion nur noch 10-15 Kopien des jeweiligen Vektors vorliegen. Im weiteren zeitlichen Verlauf gehen die Genome sukzessive verloren, an Tag 16 nach Transduktion sind weder zirkuläre noch lineare Vektoren nachweisbar. Der Verlust von HC-AdSVEBNAw scheint sowohl für die lineare als auch für die zirkuläre Form möglicherweise geringfügig langsamer zu verlaufen, als der der Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam. Der Vergleich der Bandenintensitäten bei 6800 bp (diagnostisch für das zelleigene *HPRT*-Fragment und den Vektor HC-AdFLPe) zwischen nicht-transduzierten Kontrollzellen und mit HC-AdFLPe transduzierten Zellen zeigt, dass dieser Vektor bereits nach 9 Tagen nicht mehr nachweisbar ist.

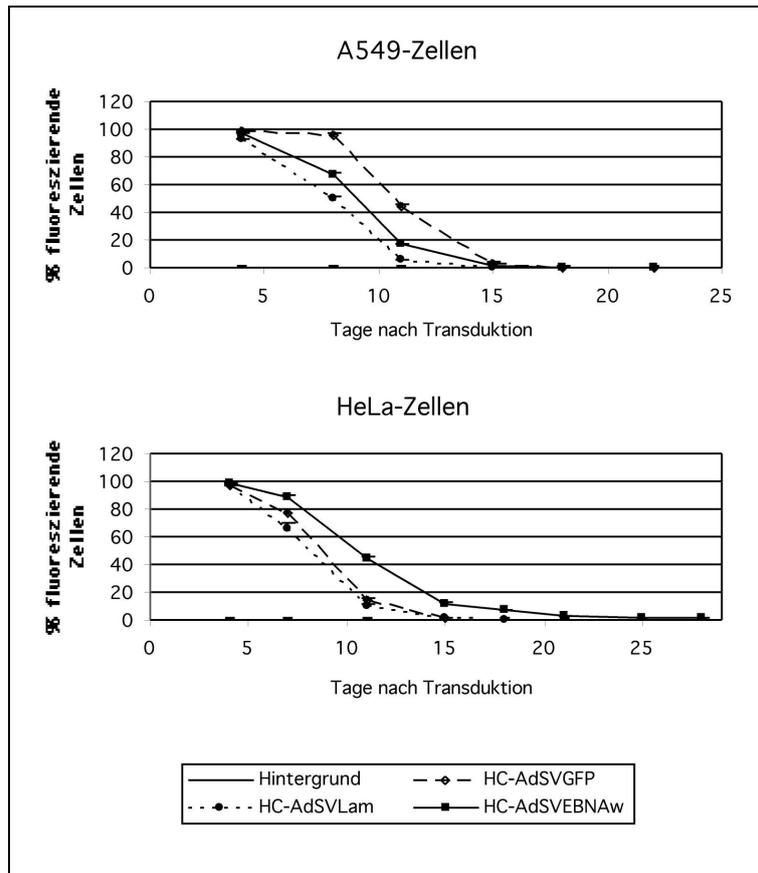


Abbildung 8.11: Zeitlicher Verlauf der Expression von *EGFP* nach Kotretransduktion von A549- (obere Hälfte) und HeLa-Zellen (untere Hälfte) mit 100 MOI des jeweiligen Substratvektors und 100 MOI HC-AdFLPe. Nach 15-20 Tagen war keine Expression von *EGFP* mehr nachweisbar.

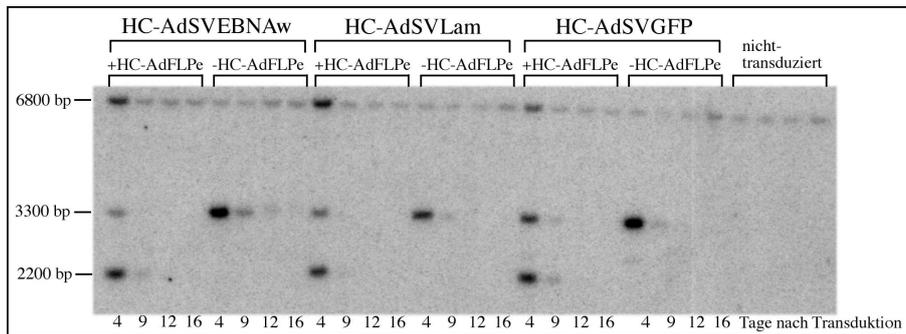


Abbildung 8.12: Southern-Transfer mit genomischer DNA aus A549-Zellen. Die Zellen wurde mit 100 MOI des jeweiligen Substratvektors transduziert. Bei Kotransduktion mit derselben Menge HC-AdFLPe ist eine Rekombinationseffizienz von 60-80% feststellbar (Vergleich der Bandenintensität bei 3300 bp für die lineare und 2200 bp für die zirkuläre Form. Bei allen Substratvektoren kommt es unabhängig von der Kotransduktion mit HC-AdFLPe zu einem starken initialen Verlust, so dass an Tag 4 nach Transduktion nur noch 10-15 Kopien des jeweiligen Vektors vorliegen. Im weiteren zeitlichen Verlauf gehen diese Kopien verloren, an Tag 16 nach Transduktion sind weder zirkuläre noch lineare Vektoren nachweisbar. Der Verlust von HC-AdSVEBNAw scheint möglicherweise geringfügig langsamer zu verlaufen als der der Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam. Auch HC-AdFLPe ist nach 9 Tagen nicht mehr nachweisbar.

Verlustkinetik in HeLa-EBNA1-Zellen Auf gleiche Weise wie in A549 und HeLa-Zellen wurde die Verlustkinetik der Vektoren HC-AdSVGFP, HC-AdSVLam und HC-AdSVEBNAw in *EBNA-1*-exprimierenden HeLa-Zellen (HeLa-EBNA1) ermittelt. HeLa-EBNA1-Zellen wachsen langsamer als A549- und HeLa-Zellen. Daher wurden diese Zellen erstmalig 4 Tage nach Transduktion und dann zweimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:3 passagiert. Abbildung 8.13, S. 105 zeigt den zeitlichen Verlauf der Transgenexpression. Nach Transduktion mit den Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam ist nach 20 Tagen unabhängig von einer Kotransduktion mit HC-AdFLPe keine *EGFP*-Expression mehr feststellbar. Ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe kommt es mit dem Vektor HC-AdSVEBNAw zunächst zu einem deutlichen Verlust der *EGFP*-Expression. Ab Tag 20 nach Transduktion ist der Verlust abgeschwächt, so dass am Ende des Beobachtungszeitraumes von 110 Tagen noch 5% der Zellen *EGFP* exprimieren. Bei Kotransduktion von HC-AdSVEBNAw und HC-AdFLPe ist über den Beobachtungszeitraum ein langsamer, linearer Verlust der Transgenexpression zu beobachten. An Tag 110 nach Transduktion exprimieren noch über 10% der Zellen *EGFP*.

Auch hier wurde von ausgewählten Zeitpunkten genomische DNA aus den eingefrorenen Zellen präpariert, mit *HindIII* verdaut und nach Fragmenttrennung in einem 0,8% Agarosegel einem Southern-Transfer unterzogen. Abbildung 8.14, S.106 zeigt das Ergebnis des Transfers. Der Vergleich der Bandenintensitäten bei 2200 bp (zirkuläre Form) und 3300 bp (lineare Form) ergibt für alle Vektoren eine Rekombinationseffizienz von 60-80% bei Kotransduktion mit HC-AdFLPe. Unabhängig von einer Kotransduktion mit HC-AdFLPe kommt es bei allen Vektoren zu einem starken initialen Verlust, so dass an Tag 4 nach Transduktion nur noch 20-25 Kopien des jeweiligen Vektors nachzuweisen sind. Die Vektoren HC-AdSVLam und HC-AdSVGFP gehen sowohl in der linearen als auch in der zirkulären Form im weiteren zeitlichen Verlauf rasch verloren und sind nach Tag 15 nicht mehr nachweisbar. Die zirkuläre Form von HC-AdSVEBNAw ist hingegen bis Tag 60 nach Transduktion nachweisbar. Die Kopienzahlen betragen an Tag 15 nach Transduktion 12 Kopien/Zelle, an Tag 24 11 Kopien/Zelle, an Tag 35 9 Kopien/Zelle und an Tag 60 7 Kopien/Zelle. Dies entspricht für den Zeitraum zwischen Tag 24 und 60 nach Transduktion einem Erhalt von ca. 98% der Genome pro Verdopplung der Zellpopulation und steht in Übereinstimmung mit den Literaturwerten für oriP/EBNA-1-Plasmidsysteme [126]. Auch ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe bleibt der Vektor in niedrigen Kopienzahlen bis Tag 60 nach Transduktion mit 0,5-1 Kopie/Zelle nachweisbar. Die diagnostische Bande für HC-AdSVEBNAw ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe liegt bei 3300 bp. Ab Tag 24 scheint die nachgewiesene Bande möglicherweise geringfügig größer zu sein. Der Vektor HC-AdFLPe geht, ebenso wie die Vektoren HC-AdSVLam und HC-AdSVGFP innerhalb der ersten 15-20 Tage verloren, wie ein Vergleich der Bandenintensitäten bei 6800 bp mit nicht-transduzierten Kontrollzellen zeigt.

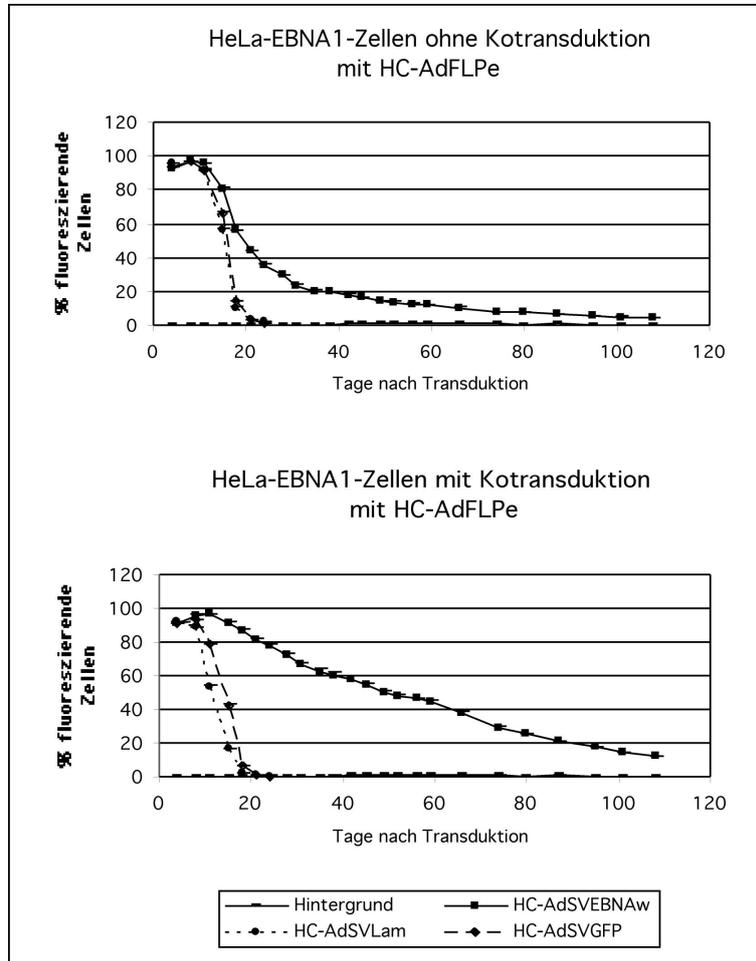


Abbildung 8.13: Zeitlicher Verlauf der Transgenexpression in HeLa-EBNA1-Zellen. Mit und ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe ist für die Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam nach 20 Tagen keine *EGFP*-Expression mehr feststellbar. Die Expression von HC-AdSVEBNAw stabilisiert sich ohne Kotransduktion nach initialen Verlusten auf niedrigem Niveau. Mit Kotransduktion von HC-AdFLPe ist eine langsame, lineare Abnahme der Expression zu beobachten.

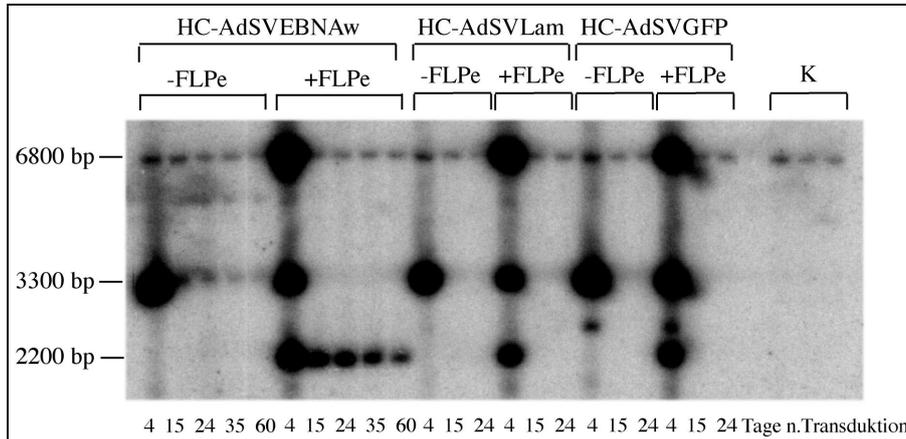


Abbildung 8.14: Southern-Transfer mit DNA aus HeLa-EBNA1-Zellen. Die Zellen wurden mit 100 MOI des jeweiligen Substratvektors transduziert (-FLPe). Bei Kotransduktion mit derselben Menge HC-AdFLPe (+FLPe) ist eine Rekombinationseffizienz von 60-80% feststellbar (Vergleich der Bandenintensität bei 3300 bp für die lineare und 2200 bp für die zirkuläre Form). Bei allen Substratvektoren kommt es unabhängig von der Kotransduktion mit HC-AdFLPe zu einem starken initialen Verlust, so dass an Tag 4 nach Transduktion nur noch 20-25 Kopien des jeweiligen Vektors vorliegen. Die Vektoren HC-AdSVLam und HC-AdSVGFP gehen im weiteren zeitlichen Verlauf rasch verloren und sind nach Tag 15 nicht mehr nachweisbar. Für HC-AdSVEBNAw ist bei Kotransduktion mit HC-AdFLPe ein langsamer linearer Verlust zu verzeichnen (12 Kopien an Tag 15, 7 Kopien an Tag 60). Dieser entspricht einem Erhalt von ca. 98% der Vektorgenome pro Verdopplung der Zellpopulation. Ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe bleiben deutlich weniger Kopien erhalten (2-3 Kopien/Zelle an Tag 15, 0,5-1 Kopie/Zelle an Tag 60). Des Weiteren scheint die erhaltenen Kopien eine geringfügig größere diagnostische Bande als 3300 bp auszuzeichnen. K ist DNA aus nicht-transduzierten HeLa-EBNA1-Zellen. Der Vektor HC-AdFLPe geht, ebenso wie die Vektoren HC-AdSVLam und HC-AdSVGFP innerhalb der ersten 15-20 Tage verloren, wie ein Vergleich der Bandenintensitäten bei 6800 bp mit nicht-transduzierten Kontrollzellen zeigt.

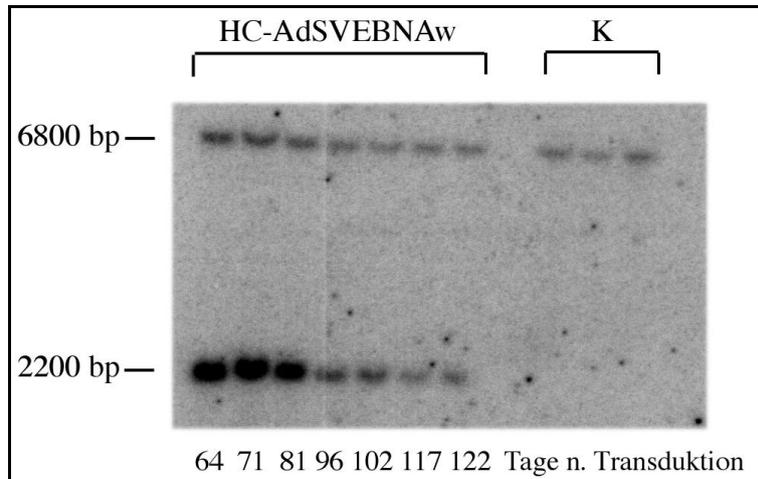


Abbildung 8.15: Genomische DNA aus HeLa-EBNA1-Zellen koinfiziert mit je 100 MOI HC-AdSVEBNAw und HC-AdFLPe zu späten Zeitpunkten nach Transduktion. Die zirkuläre Form von HC-AdSVEBNAw bleibt über den gesamten Beobachtungszeitraum von 122 Tagen erhalten. An diesem Tag liegt noch ca. 1 Kopie pro Zelle vor.

Es wurde ein weiterer Southern-Transfer mit DNA aus mit HC-AdSVEBNAw und HC-AdFLPe kotransduzierten HeLa-EBNA1-Zellen zu späteren Zeitpunkten als Tag 60 durchgeführt. Abbildung 8.15, S. 107 zeigt das Ergebnis dieses Transfers. Die zirkuläre Form von HC-AdSVEBNAw (diagnostische Bande bei 2200 bp) ist bis Tag 122 nach Transduktion nachweisbar. Analog zu Abb. 8.14, S. 106 ist eine langsame, lineare Abnahme der Kopienzahl von ca. 6 Kopien/Zelle an Tag 64 auf ca. 1-2 Kopien/Zelle an Tag 122 zu beobachten. Hier bestätigt sich ein Erhalt von 96-98% der Vektorgenome pro Verdopplung der Zellpopulation.

Um eine eventuelle Abhängigkeit des Erhalts der zirkulären Form von HC-AdSVEBNAw von der initial eingesetzten Vektormenge zu überprüfen, wurden in Doppelbestimmung je $2 \cdot 10^6$ HeLa-EBNA1-Zellen mit nur 20 MOI HC-AdSVEBNAw und 20 MOI HC-AdFLPe kotransduziert und die Expression von *EGFP* wie bereits beschrieben verfolgt. Abbildung 8.16, S. 108 zeigt den Verlauf der *EGFP*-Expression während des Beobachtungszeitraumes von 4 Wochen. Auch bei Einsatz von nur 20 MOI des Vektors HC-AdSVEBNAw ist bei Kotransduktion mit HC-AdFLPe eine langsame, lineare Abnahme der Transgenexpression im Beobachtungszeitraum festzustellen. An Tag 28 nach der Transduktion exprimieren noch ca. 60% der Zellen *EGFP*. Bei Transduktion mit 100 MOI sind es zum gleichen Zeitpunkt 70% (s. Abb. 8.13, S. 105). Auch die genomische DNA der Zellen aus diesem Experiment wurde in einem Southern-Transfer analysiert. Abbildung 8.17, S. 109 zeigt diesen Transfer. Die zirkuläre Form von HC-AdSVEBNAw bleibt auch nach

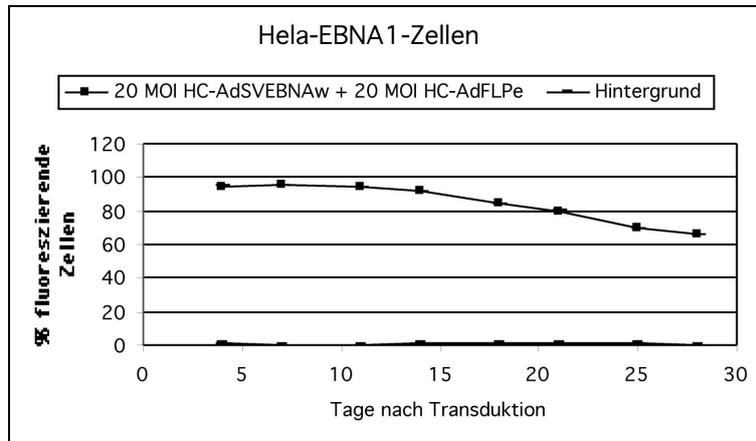


Abbildung 8.16: Zeitlicher Verlauf der *EGFP*-Expression in HeLa-EBNA1-Zellen nach Kotransduktion mit 20 MOI HC-Ad-SVEBNAw und HC-AdFLPe. Die Expression zeigt eine langsame lineare Abnahme im Beobachtungszeitraum von 4 Wochen.

Transduktion mit nur 20 MOI in HeLa-EBNA1-Zellen erhalten. Dies steht in Übereinstimmung mit den Expressionsdaten (s. Abb. 8.16, S. 108).

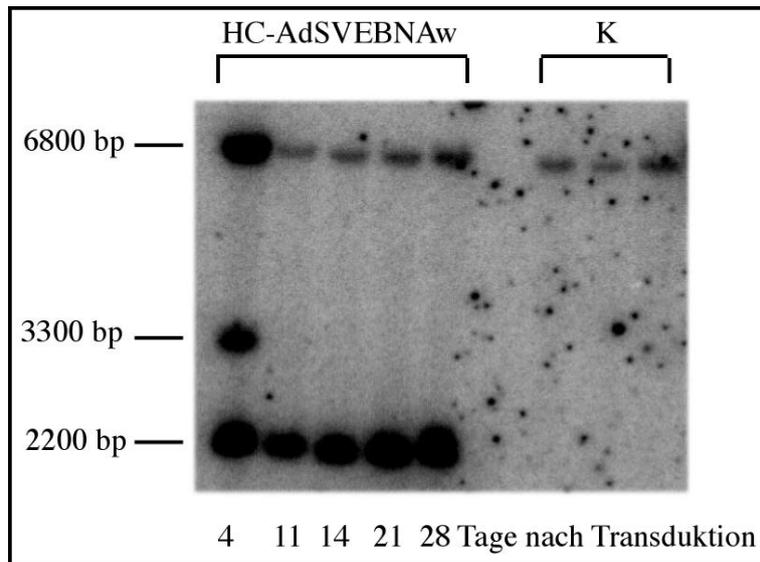


Abbildung 8.17: Southern-Transfer mit DNA aus HeLa-EBNA1-Zellen nach Kotransduktion mit 20 MOI HC-AdFLPe und 20 MOI HC-AdSVEBNAw. Die zirkuläre Form dieses Vektors bleibt über den Beobachtungszeitraum von 28 Tagen erhalten. Dies korreliert mit den Expressionsdaten (s. Abb. 8.16, S. 108). K ist DNA aus nicht-transduzierten HeLa-EBNA1-Zellen.

Die Substratvektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs Δ FR

Verlustkinetik in A549- und HeLa-Zellen Die Verlustkinetik der Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs Δ FR wurde ebenfalls auf die beschriebene Weise in A549- und HeLa-Zellen ermittelt. Je $2 \cdot 10^6$ HeLa- und A549-Zellen wurden in Doppelbestimmung mit 100 MOI des entsprechenden Substratvektors und 100 MOI HC-AdFLPe kotransduziert. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Zellen. Die Zellen zeigten ähnlich wie nach Transduktion mit HC-AdHygEBNA auch nach Transduktion mit diesen stark *EBNA-1*-exprimierenden Vektoren ein verlangsamtes Wachstum und wurden erstmalig vier Tage nach Transduktion und im Folgenden zweimal pro Woche 1:5 passagiert. Abbildung 8.18, S. 111 zeigt den Verlauf der Expression von *EGFP*. In beiden Zelllinien zeigt der Vektor HC-AdSVEBNAs, der einen vollständigen oriP besitzt, geringfügig längere Expression als der Vektor HC-AdSVEBNAs Δ FR. Nach 15 Tagen (A549-Zellen) beziehungsweise 21 Tagen (HeLa-Zellen) kann in keinem der Fälle noch *EGFP*-Expression nachgewiesen werden.

Von ausgewählten Zeitpunkten wurde aus den eingefrorenen HeLa-Zellen genomische DNA präpariert und nach Restriktion mit *Hind*III und Fragmenttrennung in einem 0,8% Agarosegel einem Southern-Transfer unterzogen. Abbildung 8.19, S. 112 zeigt das Ergebnis des Transfers. Beide Vektoren werden durch FLPe mit der typischen Effizienz von 70% rekombiniert. HC-AdFLPe ist bereits 9 Tage nach Transduktion nicht mehr nachweisbar (diagnostische Bande bei 6800 bp im Vergleich mit nicht-transduzierten Kontrollzellen). Die Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs Δ FR bleiben länger erhalten als HC-AdFLPe. Der längste Erhalt ist für HC-AdSVEBNAs festzustellen. Dieser bleibt mindestens 7 Tage länger erhalten als HC-AdEBNAs Δ FR, der einen teildeletierten oriP besitzt.

Der zeitliche Verlauf der Transgenexpression wurde zusätzlich bei Einsatz niedriger Vektormengen ermittelt. Hierzu wurden je $2 \cdot 10^6$ HeLa- oder A549-Zellen mit je 20 MOI des jeweiligen Substratvektors und 20 MOI HC-AdFLPe in Doppelbestimmung kotransduziert. Auch hier war ein verlangsamtes Wachstum der Zellen nach Transduktion festzustellen, so dass diese erstmalig 4 Tage nach Transduktion und dann zweimal pro Woche 1:5 passagiert wurden. Abbildung 8.20, S. 113 zeigt den Verlauf der Transgenexpression. Dieser entspricht weitgehend dem Verlauf der Transgenexpression bei Einsatz von 100 MOI dieser Vektoren. In beiden Zelllinien exprimiert HC-AdSVEBNAs *EGFP* über einen längeren Zeitraum als HC-AdSVEBNAs Δ FR.

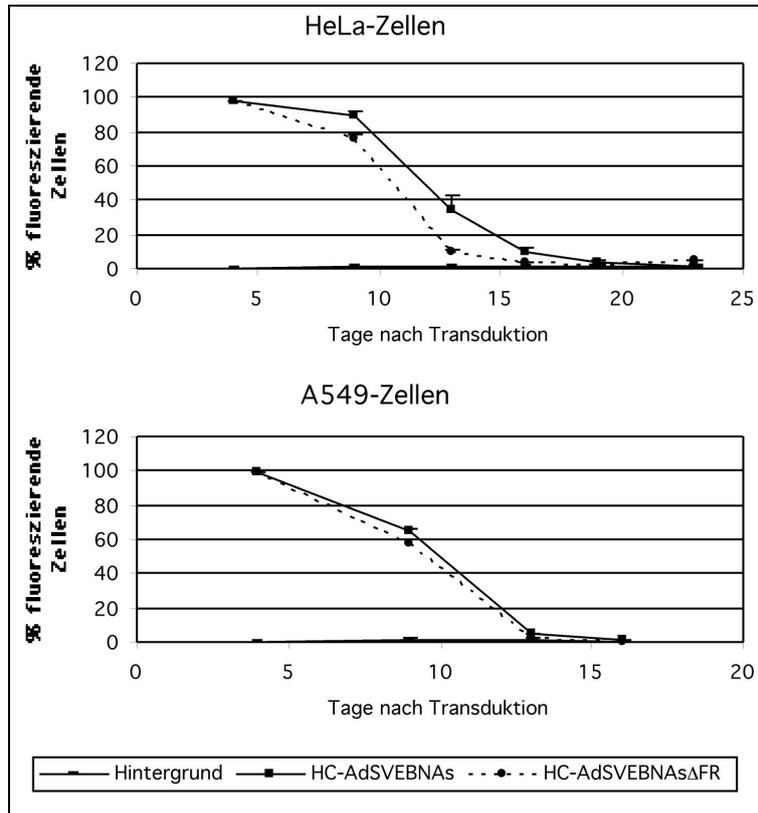


Abbildung 8.18: Verlauf der *EGFP*-Expression in HeLa- und A549-Zellen nach Kotransduktion mit 100 MOI HC-AdFLPe und 100 MOI des jeweiligen Substratvektors. Sowohl in HeLa- als auch in A549-Zellen sinkt die Expression nach Transduktion mit dem Vektor HC-AdSVEBNAs Δ FR geringfügig schneller als nach Transduktion mit HC-AdSVEBNAs, der einen vollständigen oriP besitzt. Nach 15 Tagen (A549-Zellen) und 21 Tagen (HeLa-Zellen) ist keine Expression mehr nachweisbar.

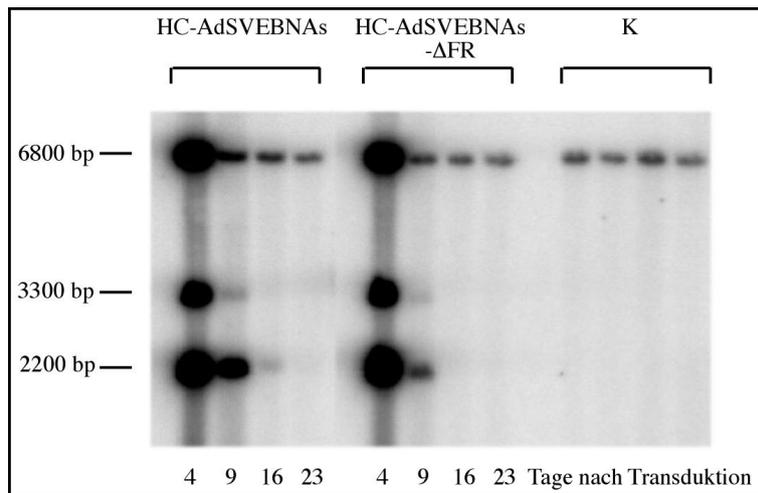


Abbildung 8.19: Southern-Transfer mit DNA aus HeLa-Zellen. Die Zellen wurde mit 100 MOI des jeweiligen Substratvektors und 100 MOI HC-AdFLPe transduziert. K ist DNA aus nicht-transduzierten HeLa-Zellen. HC-AdFLPe ist bereits 9 Tage nach Transduktion nicht mehr nachweisbar (diagnostische Bande bei 6800 bp). Die zirkuläre Form von HC-AdSVEBNAs ist mindestens 7 Tage länger nachweisbar, als die zirkuläre Form von HC-AdSVEBNAs Δ FR (diagnostische Banden bei 2200 bp). Dies korreliert mit den Expressionsdaten. Beide Substratvektoren bleiben länger erhalten als der Vektor HC-AdFLPe.

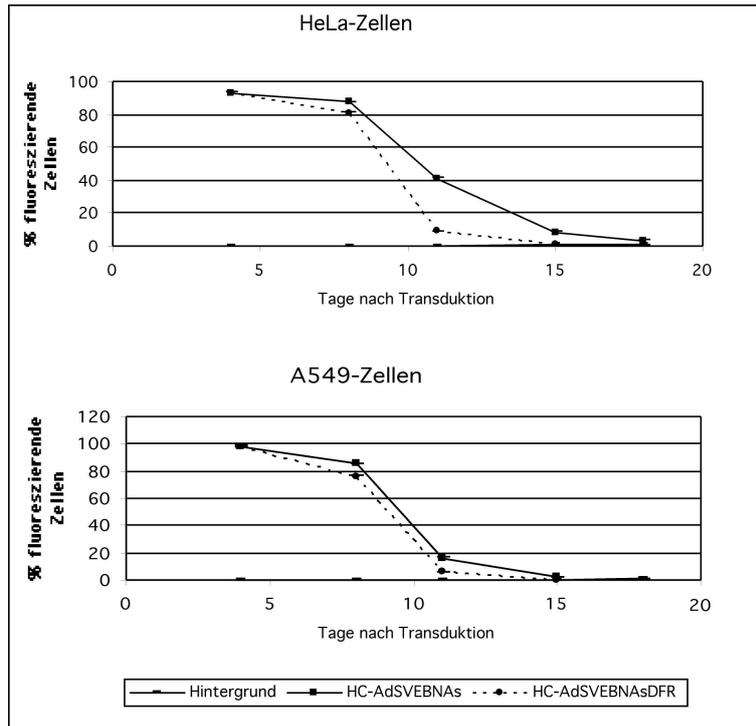


Abbildung 8.20: Zeitlicher Verlauf der Transgenexpression bei Einsatz von nur 20 MOI der Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdEBNAs Δ FR in HeLa- und A549-Zellen bei Kotransduktion mit HC-AdFLPe. Der Verlauf entspricht dem, der bei Einsatz von 100 MOI beobachtet wurde (s. Abb. 8.18, S. 111). HC-AdEBNAs exprimiert *EGFP* über einen längeren Zeitraum als HC-AdSVEBNAs Δ FR.

Verlustkinetik in HeLa-EBNA1-Zellen Auf gleiche Weise wie in A549- und HeLa-Zellen wurde die Verlustkinetik der Substratvektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs Δ FR nach Transduktion mit 20 MOI des jeweiligen Vektors und Kotransduktion mit derselben Menge HC-AdFLPe in *EBNA-1*-exprimierenden HeLa-Zellen (HeLa-EBNA1) ermittelt. Auch diese Zellen zeigten nach Transduktion mit diesen stark *EBNA-1*-exprimierenden Vektoren ein verlangsamtes Wachstum und wurde erstmalig vier Tage nach Transduktion und im Anschluss zweimal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:2 passagiert. Abbildung 8.21, S. 115 zeigt den zeitlichen Verlauf der *EGFP*-Expression bei Einsatz von 20 MOI. Nach Transduktion der Zellen mit HC-AdSVEBNAs kann bis Tag 25 nach Transduktion die Expression von *EGFP* nachgewiesen werden, bei Transduktion mit HC-AdSVEBNAs Δ FR hingegen nur bis Tag 18 nach Transduktion. Dieses Ergebnis war überraschend, da bereits für den Vektor HC-AdSVEBNAs_w, der nur schwache Expression von *EBNA-1* zeigt, der Erhalt in HeLa-EBNA1-Zellen bewiesen werden konnte (s. Abb. 8.14, S. 106). Daher wurde das gleiche Experiment zusätzlich mit dem Vektor HC-AdHygEBNA durchgeführt. Dieser beinhaltet dieselbe Expressionskassette und denselben oriP wie HC-AdSVEBNAs und kann unter Selektionsbedingungen sowohl in HeLa- als auch in A549-Zellen effizient replizieren (s. Abschnitt 8.1.2, S. 91). Allerdings wurde auf Grund der schwachen Expression von *EGFP* durch diesen Vektor auf eine Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs der Transgenexpression verzichtet. Statt dessen wurde zu ausgewählten Zeitpunkten genomische DNA aus den transduzierten Zellen präpariert, mit *Hind*III verdaut und nach Fragmenttrennung in einem 0,8% Agarosegel einem Southern-Transfer unterzogen. Ebenso wurde mit präparierter DNA aus dem entsprechenden Experiment mit den Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs Δ FR verfahren. Abbildung 8.22, S. 115 zeigt das Ergebnis des Transfers. Sowohl der Vektor HC-AdHygEBNA, für den unter Selektionsbedingungen und nach Absetzen der Selektion ein stabiler Erhalt gezeigt werden konnte (s. Abb. 8.8, S. 95), als auch die Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs Δ FR gehen im Beobachtungszeitraum verloren. HC-AdSVEBNAs, der einen vollständigen oriP besitzt, bleibt geringfügig länger erhalten als HC-AdSVEBNAs Δ FR. Dies korreliert mit dem zeitlichen Verlauf der *EGFP*-Expression (s. Abb. 8.20, S. 113) und bestätigt die in HeLa- und A549-Zellen gemachte Beobachtung (s. Abb. 8.19, S. 112).

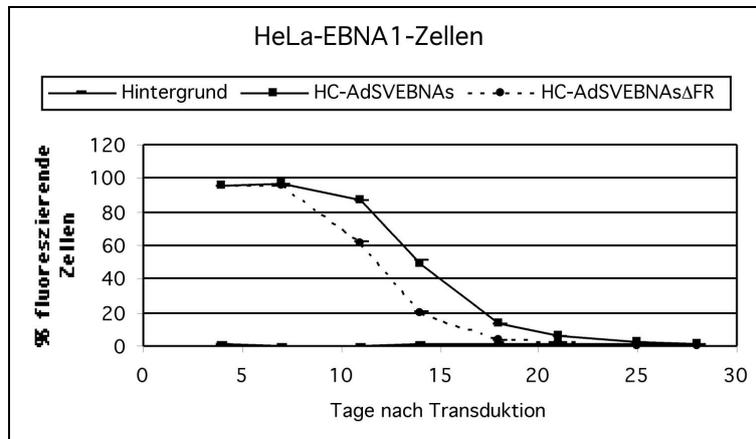


Abbildung 8.21: Zeitlicher Verlauf der Transgenexpression der Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdEBNAs Δ FR in HeLa-EBNA1-Zellen nach Transduktion mit 20 MOI und Kotransduktion mit 20 MOI HC-AdFLPe. Nach Transduktion mit HC-AdSVEBNAs kann bis Tag 25 nach Transduktion die Expression von *EGFP* nachgewiesen werden, bei Transduktion mit HC-AdSVEBNAs Δ FR hingegen nur bis Tag 18 nach Transduktion.

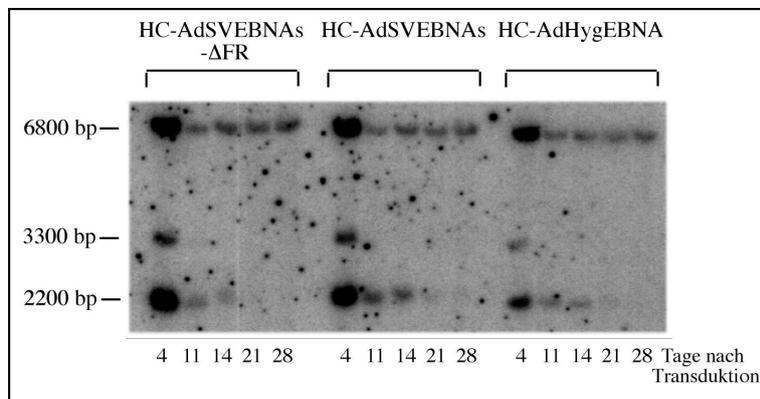


Abbildung 8.22: Southern-Transfer von DNA aus HeLa-EBNA1-Zellen nach Transduktion mit 20 MOI der Vektoren HC-AdSVEBNAs, HC-AdSVEBNAs Δ FR und HC-AdHygEBNA. Alle Vektoren gehen im Beobachtungszeitraum verloren. HC-AdSVEBNAs und HC-AdHygEBNA bleiben geringfügig länger erhalten als HC-AdSVEBNAs Δ FR.

Teilzusammenfassung

Die bislang dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Vektor HC-AdSVEBNAw im Gegensatz zu den Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSCLam mit und ohne Zirkularisierung durch FLPe in HeLa-EBNA1-Zellen replizieren kann. 96-98% der durch FLPe zirkularisierten Genome dieses Vektors bleiben bei einer Verdopplung der Zellpopulation in jeder Zelle erhalten. Dies entspricht einer Replikation synchron zum Zellzyklus und steht in Übereinstimmung mit entsprechenden Literaturwerten für oriP/EBNA-1-basierte Plasmidsysteme. In A549- und HeLa-Zellen hingegen bleibt die zirkuläre Form dieses Vektors nur geringfügig länger erhalten, als die lineare oder zirkuläre Form der Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam. Die Verwendung des als Replikationsursprung beschriebenen Fragmentes aus dem humanen Lamin-B2-Genlocus ermöglicht die Ausbildung stabiler Replikons auch ohne Selektionsbedingungen nicht.

Die zirkuläre Form des Vektors HC-AdSVEBNAs bleibt in HeLa-, A549- und HeLa-EBNA-Zellen länger erhalten als die zirkuläre Form des Vektors HC-AdSVEBNAs Δ FR, der einen teildeletierten oriP besitzt. Die zirkuläre Form dieser beiden Vektoren bleibt länger erhalten als ihre jeweilige lineare Form und als der lineare Vektor HC-AdFLPe. Dies ist ein Hinweis auf Replikation von zumindest einem Teil der Moleküle der zirkulären Formen von HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs mithilfe des oriP/EBNA-1-Replikationssystems. Der schnellere Verlust der zirkulären Form von HC-AdSVEBNAs Δ FR ist wahrscheinlich auf eine gegenüber HC-AdSVEBNAs beeinträchtigte nukleäre Retention und Regulation der Verteilung der replizierten DNA-Moleküle auf die Tochterzellen zurückzuführen.

In HeLa-EBNA1-Zellen geht der Vektor HC-AdSVEBNAs im Vergleich zu HC-AdSVEBNAw, der eine schwache Expressionskassette für *EBNA-1* besitzt, relativ schnell verloren. Ein Kontrollexperiment mit HC-AdHygEBNA, der die gleiche *EBNA-1*-Expressionskassette besitzt wie HC-AdSVEBNAs und unter Selektionsbedingungen in HeLa- und A549-Zellen effizient repliziert, konnte zeigen, dass dieser Vektor in HeLa-EBNA1-Zellen mit der gleichen Geschwindigkeit verloren geht, wie HC-AdSVEBNAs.

Bereits mit HC-AdHygEBNA konnte nach Transduktion der Zellen mit 20 MOI eine deutliche Verlangsamung des Zellwachstums festgestellt werden. Diese wurde auch mit den Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs Δ FR, die die gleiche Expressionskassette für *EBNA-1* besitzen, festgestellt. Keiner der anderen vorgestellten Substratvektoren, auch nicht HC-AdSVEBNAw, zeigte diesen Effekt.

8.1.4 Modell zur mathematischen Beschreibung der Erhaltungseffizienz

Der zeitliche Verlauf der *EGFP*-Expression zeigt für alle Vektoren einen Bereich linearen Verlustes. Dieser geht einher mit einem entsprechenden linearen Verlust der Kopienzahlen. Auf diesen Beobachtungen aufbauend wurde eine einfache mathematische Beschreibung der Erhaltungseffizienz entwickelt. Grundlage dieser Beschreibung sind die ermittelten Fluoreszenzdaten in Abhängigkeit der Zeit nach Transduktion. Zunächst wurden für die einzelnen Zeitpunkte anhand der regelmässigen Passageraten die bis dahin erfolgten Verdopplungen der Zellpopulationen berechnet. Dies erfolgte gemäß

$$d_t = n_t \cdot \frac{\ln x}{\ln 2},$$

wobei d_t die Zahl der Verdopplungen zum Zeitpunkt t , n_t die Anzahl der zum jeweiligen Zeitpunkt t erfolgten Passagen und x den Kehrwert der für die jeweilige Zelllinie verwendeten Passagerate darstellen. Auf diese Weise konnte der Verlauf der Transgenexpression in Abhängigkeit von den erfolgten Verdopplungen der Zellpopulation dargestellt werden. Da die Proliferationsgeschwindigkeit direkten Einfluss auf den Verlust nicht oder nur in geringem Ausmaß replizierender Vektoren hat, und somit den Verlust der Transgenexpression beeinflusst, erlaubt diese Darstellung den direkten Vergleich zwischen verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten. Für den linearen Bereich des Verlusts der *EGFP*-Expression wurde anhand der allgemeinen Geradengleichung die Steigung m der zugehörigen Geraden ermittelt. Als Erhaltungswert M wurde das negative Reziproke dieser Steigung multipliziert mit 100 definiert:

$$M = -\frac{1}{m} \cdot 100$$

Mithilfe dieser Technik wurde ein Teil der vorgestellten Fluoreszenzdaten analysiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die ermittelten linearen Bereiche aus mindestens 4 Messpunkten bestanden und der Korrelationskoeffizient der entsprechenden Geraden mindestens 0,98 betrug. Die Darstellung der M-Werte erlaubt sowohl die Quantifizierung als auch den direkten Vergleich der Erhaltungseffizienz der Vektoren in Zelllinien mit unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten. Bereits geringe Unterschiede in der Erhaltungseffizienz, die bei der Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Transgenexpression nicht sichtbar sind, sollten so erfasst werden können.

M-Werte der Substratvektoren HC-AdSVGFP, HC-AdSVLam und HC-AdSVEBNAw Anhand der Fluoreszenzdaten aus Abbildung 8.11, S. 102 wurden die M-Werte für die Vektoren HC-AdSVGFP, HC-AdSVLam und HC-AdSVEBNAe in A549- und HeLa-Zellen bei Kotransduktion mit HC-AdFLPe berechnet. Abbildung 8.23, S. 118 zeigt das Ergebnis. Die Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam weisen in beiden

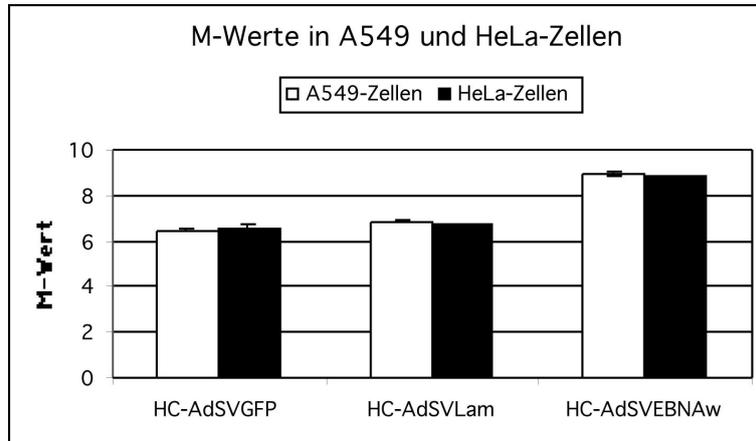


Abbildung 8.23: Vergleich der M-Werte in A549- und HeLa-Zellen nach Kotransduktion mit 100 MOI HC-AdFLPe und derselben Menge Substratvektor. Die M-Werte für jeden einzelnen Substratvektor sind in beiden Zelllinien bei Kotransduktion mit HC-AdFLPe nahezu gleich. Die M-Werte für HC-AdSVEBNAw sind gegenüber denen für HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam leicht erhöht.

Zelllinien den gleichen M-Wert auf. Der M-Wert für den Vektor HC-AdSVEBNAw ist gegenüber diesen leicht erhöht und ebenfalls in beiden Zelllinien gleich.

Die M-Werte der Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam in HeLa-EBNA1-Zellen zeigt Abbildung 8.24a, S. 120. Diese M-Werte liegen zwischen 5 und 6. Es konnte bei dieser Analyse ein geringer Unterschied zwischen den M-Werten mit und ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe zu Gunsten der zirkulären Vektoren ermittelt werden. Allerdings hat die Zirkularisierung dieser Vektoren durch die FLPe-Rekombinase nur geringe Auswirkung auf ihren Erhalt in HeLa-EBNA1-Zellen.

Des Weiteren wurden die M-Werte für den Vektor HC-AdSVEBNAw bei Einsatz von 100 MOI mit und ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe errechnet und mit den entsprechenden M-Werten für die Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam verglichen. Abbildung 8.24b, S. 120 zeigt, dass die M-Werte für HC-AdSVEBNAw sowohl mit, als auch ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe deutlich höher liegen, als die entsprechenden M-Werte für HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam. Der M-Wert für HC-AdSVEBNAw ist bei Kotransduktion mit HC-AdFLPe um Faktor 10, ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe um Faktor 26 höher als für die Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam.

Um eine eventuelle Abhängigkeit des M-Wertes von der initial eingesetzten Vektormenge zu überprüfen, wurden die M-Werte für den Vektor HC-AdSVEBNAw in HeLa-EBNA1-Zellen nach Transduktion mit 20 und 100 MOI bei Kotransduktion mit derselben Menge HC-AdFLPe errechnet und verglichen (s. Abb. 8.25, S. 121). Der M-Wert nach Transduk-

Tabelle 8.1: M-Werte für stark *EBNA-1*-exprimierende Substratvektoren.

	HeLa	HeLa	A549	A549
	100 MOI	20 MOI	100 MOI	20 MOI
HC-AdSVEBNAs	8,5	8,9	6,5	6,4
HC-AdSVEBNAs Δ FR	6,5	6,6	4,7	5,0

tion mit 100 MOI HC-AdSVEBNAs ist um Faktor 1,6 höher, als der bei Transduktion mit 20 MOI. Die Effizienz des Erhalts des Vektors HC-AdSVEBNAs zeigt daher eine Abhängigkeit von der initial eingesetzten Vektormenge.

M-Werte der Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs Δ FR Die M-Werte für die Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSVEBNAs Δ FR in den verschiedenen Zelllinien sind in Tabelle 8.1, S. 119 zusammengefasst. Der Vektor HC-AdSVEBNAs weist in allen Zelllinien einen höheren M-Wert auf, als der Vektor HC-AdSVEBNAs Δ FR. Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten aus den Southern-Transferexperimenten (s. Abb. 8.22, S. 115). Hier ist keine deutliche Abhängigkeit des M-Wertes von der initialen Vektormenge festzustellen. Der M-Wert für HC-AdSVEBNAs nach Transduktion von HeLa-Zellen mit 100 MOI und Koinfektion mit derselben Menge HC-AdFLPe entspricht dem des Vektors HC-AdSVEBNAs und liegt über dem der Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam (s. Abb.8.23, S. 118).

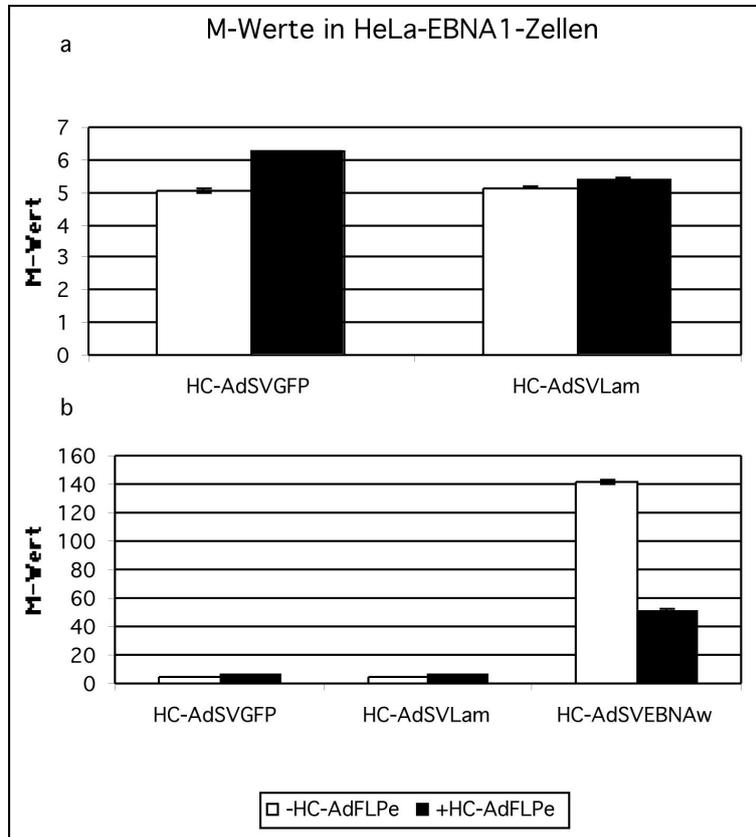


Abbildung 8.24: (a) Vergleich der M-Werte der Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam nach Transduktion von HeLa-EBNA1-Zellen mit 100 MOI. Es ist nur ein geringer Unterschied zwischen den M-Werten mit und ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe zu verzeichnen. (b) Vergleich der M-Werte zwischen HC-AdSVEBNaw und HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam. Bei Kotransduktion mit HC-AdFLPe ist der M-Wert für HC-AdSVEBNaw um Faktor 10, ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe um Faktor 26 höher als für HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam (jeweils 100 MOI).

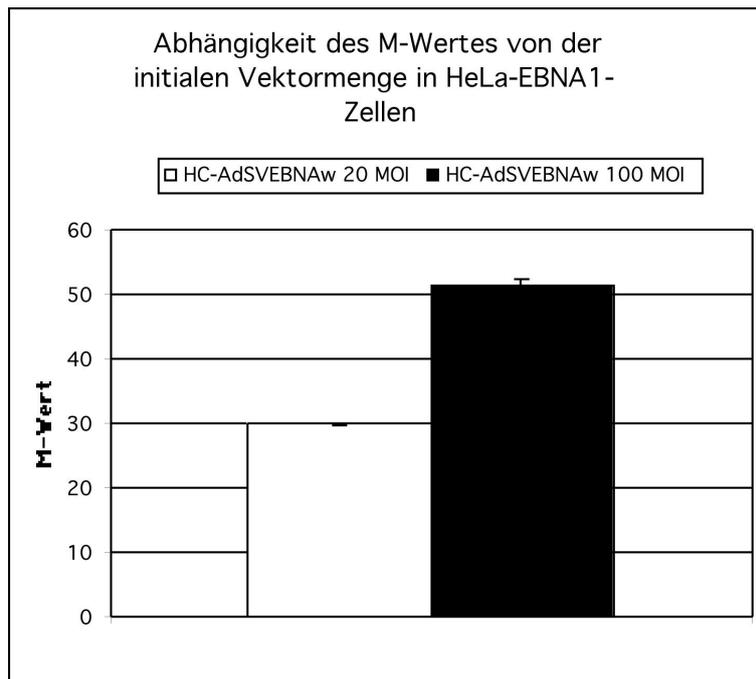


Abbildung 8.25: Abhängigkeit des M-Wertes von der initialen Vektormenge. Verglichen sind die M-Werte für HC-AdSVEBNAw nach Kotransduktion von HeLa-EBNA1-Zellen mit 20 und 100 MOI sowie der entsprechenden Menge HC-AdFLPe. Bei Transduktion mit 100 MOI ist der M-Wert um Faktor 1,6 höher als bei Transduktion mit 20 MOI.

8.1.5 Molekulare Analyse der Erhaltungsform von HC-AdSVEBNAw

In Abschnitt 8.1.3, S. 97 wurde beschrieben, dass der Vektor HC-AdSVEBNAw, der eine Expressionskassette für *EBNA-1* und den Replikationsursprung oriP besitzt, auch ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe, also ohne Zirkularisierung durch FLPe in HeLa-EBNA1-Zellen erhalten bleibt. Dies wurde sowohl in Southern-Transferexperimenten (s. Abb. 8.14, S. 106) als auch durch Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs der Transgenexpression durch diesen Vektor gezeigt (s. Abb. 8.13, S. 105). Der M-Wert ist mit 140 der höchste ermittelte und liegt um Faktor 3 über dem M-Wert für die durch FLPe-rekombinierte Form von HC-AdSVEBNAw (s. Abb. 8.24, S. 120). Im Southern-Transferexperiment wurde festgestellt, dass die Form des Vektors, die ohne Rekombination durch FLPe erhalten bleibt, eine geringfügig größere diagnostische Bande aufweist, als für die lineare Form dieses Vektors zu erwarten wäre (s. Abb. 8.14, S. 106). Dies könnte durch eine Zirkularisierung des Vektors unter Erhalt der ITRs erklärt werden. Abbildung 8.2, S. 87, zeigt, dass durch eine solche Zirkularisierung auf Grund der *HindIII*-Schnittstelle am rechten ITR des Vektors eine um 200 bp größere diagnostische Bande im Southern-Transfer nachweisbar wäre. Um diese Theorie einer spontanen Selbstzirkularisierung unter Erhalt der ITRs des Vektors zu überprüfen, wurde eine molekulare Analyse der in HeLa-EBNA-1-Zellen ohne Kotransduktion mit HC-AdFLPe replizierenden Moleküle von HC-AdSVEBNAw vorgenommen. Gemäß den Southern-Transferdaten würden 1-3% der initial in die Zellen eingebrachten Vektorgenome spontan zirkularisiert.

Nachweis der spontanen Selbstzirkularisierung durch PCR

Die spontane Selbstzirkularisierung von HC-AdSVEBNAw sollte eindeutig mittels PCR nachgewiesen werden können. Hierzu wurden die Primer bigcircseq (5'-AGATACGAGC-ATGGATTCTTGG-3') und bigcircrev (5'-CCACCTTCTCTTCCCACACG-3') verwendet. Abbildung 8.26, S. 123 zeigt das Prinzip der PCR. Die Primer binden jeweils kurz vor dem linken beziehungsweise rechten ITR des Vektors. Ein PCR-Produkt kann nur bei Vorliegen von zirkulären DNA-Molekülen gebildet werden, die die ITRs enthalten. Das in einem solchen Fall erwartete PCR-Produkt besitzt eine Größe von 974 bp. Die PCR wurde mit je 1 µg der genomischen DNA aus HeLa-EBNA1-Zellen 15, 24, und 35 Tage nach Transduktion mit 100 MOI HC-AdSVEBNAw durchgeführt. Ebenso wurde je 1 µg genomische DNA aus HeLa-EBNA1-Zellen 15 und 24 Tage nach Transduktion mit 100 MOI HC-AdSVLam oder HC-AdSVGFP eingesetzt. Sollten auch diese Vektoren spontan zirkularisieren, wäre ebenfalls ein 974 bp PCR-Produkt zu erwarten. Als Kontrollen dienten 1 µg genomische DNA aus nicht-transduzierten HeLa-EBNA1-Zellen, Wasser und 1 ng pFrt#39. Für dieses Plasmid ist ein PCR-Produkt in einer Größe von 3900 bp zu erwarten, da es zwischen den adenoviralen ITRs 3000 bp pBluescript-Sequenzen beinhaltet. Abbildung 8.27, S. 124 zeigt das Ergebnis der PCR. Sowohl nach Transduktion von HeLa-EBNA1-Zellen mit HC-AdSVEBNAw als auch mit den Vektoren HC-AdSVLam

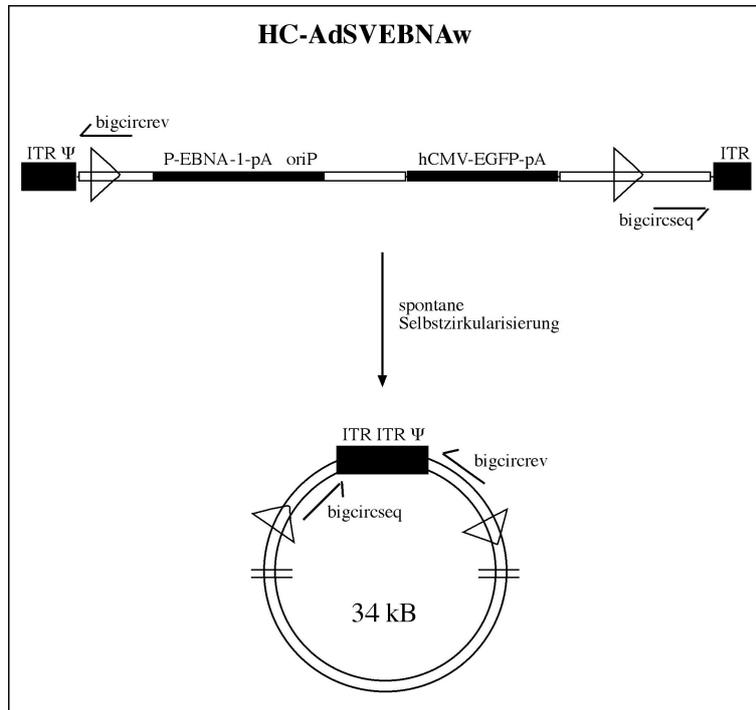


Abbildung 8.26: Schematische Darstellung der PCR zum Nachweis spontan gebildeter Zirkel von HC-AdSVEBNAw. Die Primer bigcircrev und bigcircseq ergeben nur dann ein PCR-Produkt, wenn zirkuläre DNA-Moleküle vorliegen.

und HC-AdSVGFP ist ein PCR-Produkt der erwarteten Größe nachzuweisen. Spontan gebildete Zirkel von HC-AdSVEBNAw sind noch mindestens 35 Tage nach Transduktion nachweisbar. Die Menge des PCR-Produktes nach Transduktion mit diesem Vektor ist größer als die Mengen der PCR-Produkte nach Transduktion mit den gleichen Mengen HC-AdSVLam oder HC-AdSVGFP. Diese Daten sind weitere starke Hinweise für die Fähigkeit der Vektoren zur spontanen Selbstzirkularisierung und einen Erhalt der zirkulären Form von HC-AdSVEBNAw durch das oriP/EBNA-1-Replikationssystem.

Charakterisierung der spontan gebildeten Zirkel

Sequenzierung des PCR-Produktes Zunächst wurde das PCR-Produkt, das mit genomischer DNA 24 Tage nach Transduktion mit HC-AdSVEBNAw erhalten wurde, gereinigt. Anschließend wurde eine Sequenzierung mit den Primern bigcircseq und bigcircrev vorgenommen. Diese Sequenzierung erbrachte jedoch nur bis 2 Basenpaare vor den Anfang des linken ITR (bigcircrev) und 1 Basenpaar vor das Ende des rechten ITR (big-

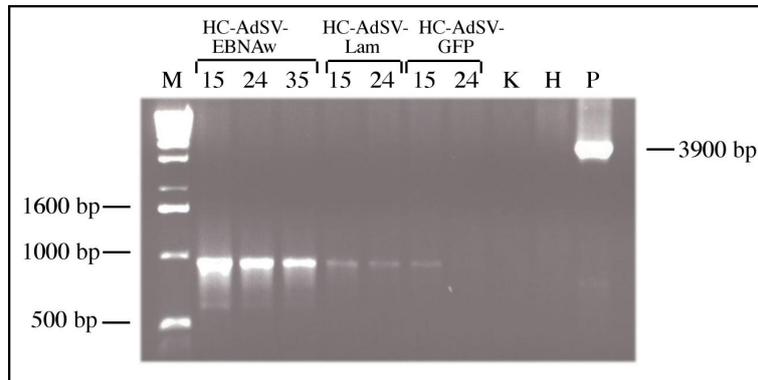


Abbildung 8.27: PCR zum Nachweis spontan gebildeter Zirkel von HC-AdSVEBNAw. K ist das Ergebnis der PCR-Reaktion mit DNA aus nicht-transduzierten Zellen, H das Ergebnis mit Wasser und P das Ergebnis mit dem Kontrollplasmid pFrt#39. Die Zahlen über den Gelspuren geben in Tagen den Zeitpunkt an, zu dem nach Transduktion der Zellen die genomische DNA präpariert wurde.

circseq) eindeutig lesbare Signale. Der Übergang von ITR zu ITR konnte nicht eindeutig sequenziert werden. Dies wurde als Hinweis auf ein Gemisch unterschiedlicher Sequenzen gewertet, das daraus resultieren könnte, dass die Zirkel nicht einheitlich gebildet werden.

Restriktionsanalyse des PCR-Produktes Da bei der Bildung großer Zirkel, die ein Aneinanderfügen der ITRs des Vektors beinhaltet, neue Palindrome entstehen, wurde eine Restriktionsanalyse des PCR-Produktes durchgeführt. Diese Restriktionsanalyse sollte bei Auftreten eines nur partiellen Verdau des PCR-Produktes auch einen Hinweis auf ein vorliegendes Gemisch von Molekülen mit verschiedenen Sequenzen liefern können. Bei der Wahl der Restriktionsenzyme wurden zwei Fälle mit unterschiedlichen Sequenzen zu Grunde gelegt. Fall 1 setzte das vollständige Vorhandensein beider ITRs voraus. In diesem Fall entstünde eine neue *Bfr*BI-Schnittstelle und das 974 bp PCR-Produkt würde in ein 623 bp und ein 351 bp Fragment gespalten. Fall 2 setzt voraus, dass den gebildeten Zirkeln das jeweils terminale Basenpaar beider ITRs fehlt. In diesem Fall entstünde eine neue *EcoRV*-Schnittstelle und das PCR-Produkt würde in ein 174 bp, ein 343 bp und ein 455 bp Fragment gespalten. Sollte keine zusätzliche *EcoRV*-Schnittstelle vorhanden sein, wird das PCR-Produkt in ein 174 bp und ein 800 bp großes Fragment gespalten. Eine Restriktion mit *Hinf*I würde für beide Fälle ein 13 bp, ein 86 bp, ein 247 bp und ein 628 bp Fragment liefern. In Tabelle 8.2, S. 125 sind die verschiedenen Fälle zusammengefasst. Abbildung 8.28, S. 126 zeigt das Ergebnis der Restriktionsanalyse. Der Verdau des PCR-Produktes mit *Bfr*BI ergibt eine starke Bande bei 974 bp und zwei schwache Banden bei 623 und 351 bp. Dieser partielle Verdau deutet darauf hin, dass ein kleiner

Tabelle 8.2: Fallunterscheidung für die Restriktionsanalyse der PCR-Produkte der aus HC-AdSVEBNAw ohne FLPe entstandenen zirkulären DNA-Moleküle.

	<i>Bfr</i> BI	<i>Eco</i> RV	<i>Hinf</i> I
beide ITRs vollständig	623 bp	800 bp	628 bp
	351 bp	174 bp	247 bp
			86 bp
			13 bp
terminales bp beider ITRs fehlt	972 bp	455 bp	627 bp
		343 bp	247 bp
		174 bp	85 bp
			13 bp

Teil der Moleküle vollständige ITRs besitzt. Der Verdau mit *Eco*RV liefert zwei Fragmente mit den Größen 800 und 174 bp. Zusätzlich entstehen aber auch ein 343 und ein 455 bp Fragment. Diese können nur entstehen, wenn einem Teil der Moleküle die terminalen Basenpaare beider ITRs fehlen. Nach Restriktion mit *Hinf*I entstehen Fragmente mit den Größen 628 und 247 bp. Unter der Annahme, dass die zusätzlich erwarteten, kleineren Fragmente mit 86 und 13 bp Größe auf Grund zu geringer Mengen nicht mehr nachzuweisen sind, ist dies ein weiterer Beweis für die Bildung großer Zirkel über die ITRs des Vektors. Diese Zirkel werden offensichtlich nicht einheitlich gebildet, sondern es entsteht ein Gemisch unterschiedlicher Moleküle mit leichten Sequenzvariationen an den Enden der ITRs.

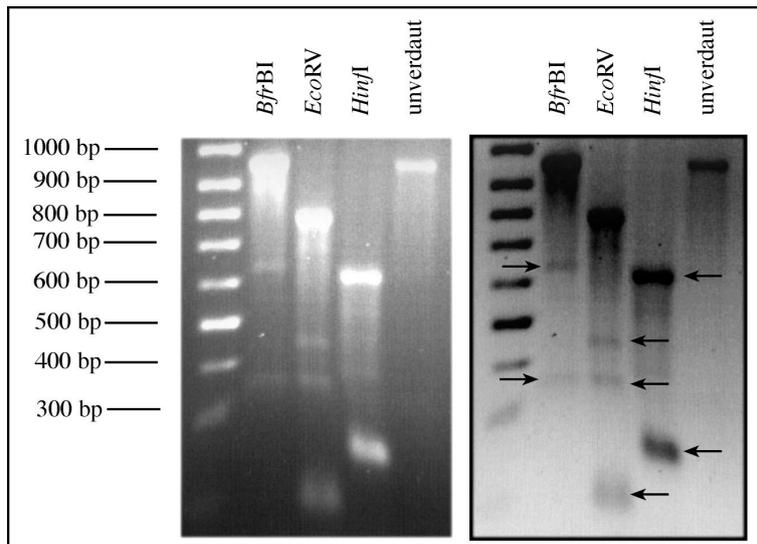


Abbildung 8.28: Restriktionsanalyse des PCR-Produktes der aus HC-AdSVEBNAw spontan gebildeten Zirkel. Die linke Hälfte der Abbildung stellt das Originalfoto des zur Trennung der Fragmente eingesetzten 2% Agarosegels dar, die rechte Hälfte ist eine Negativdarstellung desselben Bildes, in der die entscheidenden DNA-Fragmente mit Pfeilen markiert sind. Mit allen drei Enzymen können die erwarteten Fragmente in geringer Menge nachgewiesen werden.

8.2 Zusammenfassung

- Das FLP/Frt-Rekombinasesystem eignet sich zur Exzision und Zirkularisierung 22-28 kB großer DNA-Fragmente aus HC-Ad-Vektorgenomen. Mit der temperaturoptimierten Rekombinase FLPe kann hierbei eine Rekombinationsrate von 60-80% erzielt werden. Die Zirkularisierung ermöglicht die Anwendung des oriP/EBNA-1-Replikationssystems zur Replikation der zirkulären HC-Ad-Vektorgenome synchron zum Zellzyklus.
- Der Vektor HC-AdHygEBNA kann nach FLPe-vermittelter Zirkularisierung in den stark proliferierenden humanen Tumorzelllinien A549 und HeLa unter Selektionsbedingungen mithilfe des oriP/EBNA-1-Replikationssystems synchron zum Zellzyklus replizieren. Nach Transduktion der Zellen mit 20 MOI waren in HeLa-Zellen bis nach Tag 40, in A549-Zellen bis an das Ende des Beobachtungszeitraumes von 75 Tagen die zirkularisierten HC-AdHygEBNA-Genome nachweisbar. In A549-Zellen blieb der Vektor auch nach Absetzen der Selektion erhalten.
- Der Vektor HC-AdHygLam, der einen humanen Replikationsursprung aus dem Lamin-B2-Genlokus enthält, bildet unter Selektionsbedingungen keine stabilen Replikons aus.
- Alle gezeigten Vektoren, die das oriP/EBNA-1-System enthalten, können nach FLPe-vermittelter Zirkularisierung in den Zelllinien A549, HeLa und HeLa-EBNA1 ohne Selektion replizieren. Besonders effizient funktioniert die Replikation des Vektors HC-AdSVEBNA in HeLa-EBNA1-Zellen, der noch 122 Tage nach Transduktion der Zellen nachweisbar ist.
- Die Anwendung des humanen Replikationsursprungs aus dem Lamin-B2-Genlokus erlaubt auch ohne Selektion die Ausbildung stabiler Replikons nicht.
- Die Effizienz der Replikation der oriP/EBNA-1-enthaltenden Vektoren ohne Selektion zeigt eine Abhängigkeit von der verwendeten Expressionskassette für *EBNA-1*. Die Anwendung des starken $SR\alpha$ -Promotors zur Expression von *EBNA-1* führt hierbei zu einer niedrigeren Effizienz der Replikation und darüber hinaus zu einer deutlichen Verlangsamung des Zellwachstums.
- Es wurde ein einfaches mathematisches Modell zur quantitativen Beschreibung der Erhaltung der Transgenexpression episomal replizierender HC-Ad-Vektoren entwickelt. Dieses erlaubt einen direkten Vergleich der Erhaltungseffizienz von Vektoren in unterschiedlich schnell proliferierenden Zellen und kann bereits geringe Unterschiede deutlich machen.
- Am Beispiel der Vektoren HC-AdSVEBNAw, HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam konnte gezeigt werden, dass HC-Ad-Vektoren auch ohne Mitwirkung einer extern

eingebrachten Rekombinase in geringen Mengen (1-3% der eingebrachten Genome) spontan zirkularisieren können, wobei die ITRs der Vektoren erhalten bleiben. Enthalten diese Zirkel das oriP/EBNA-1-Replikationssystem, können sie mit hoher Effizienz synchron zum Zellzyklus replizieren. Die gezeigten Experimente liefern Hinweise auf die molekulare Struktur der spontan gebildeten Zirkel. Es ist davon auszugehen, dass es nicht zu einer exakten Ligation der vollständigen ITRs kommt. Vielmehr entsteht auf Grund des Verlustes einzelner Basenpaare ein Gemisch von Molekülen mit unterschiedlicher Sequenz. Zwei dieser Spezies, Moleküle mit vollständigen ITRs und Moleküle, denen die terminalen Basenpaare der ITRs fehlen, konnten mittels Restriktionsanalyse nachgewiesen werden.

9 Diskussion - Teil III

9.1 Konstruktion eines HC-Ad-Vektorsystems zur stabilen Transgenexpression in proliferierenden Geweben

9.1.1 Rekombinase-vermittelte Zirkularisierung von HC-Ad-Vektorgenomen

Durch HC-Ad-Vektor-vermittelte Expression der *FLP*-Rekombinase aus Hefe gelingt es, in humanen Zelllinien 22-28 kB große DNA-Fragmente aus HC-Ad-Vektoren zu exzidieren und zirkularisieren. Bei Anwendung der *FLPe*-Rekombinase beträgt die Rekombinationsrate 60-80%. Edukt und Produkt zeigen bezüglich der Erkennungssequenzen für die *FLP*-Rekombinase keinen Unterschied; es gibt es eine Hin- und eine Rückreaktion. Dies ist wahrscheinlich ein Grund dafür, dass die die Rekombinationseffizienz nicht höher ist. Zusätzlich könnte die Größe der zu exzidierenden Fragmente einen Einfluss auf die Effizienz der Rekombination haben. Die Effizienz des *FLP*/*Frt*-Systems zur Exzision des Verpackungssignales der Helfervirusgenome in einem alternativen Produktionssystem für HC-Ad-Vektoren [118], bei der lediglich einige hundert Basenpaare exzidiert werden, liegt deutlich höher. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Größe der zu exzidierenden Fragmente Einfluss auf die Rekombinationseffizienz hat. Die Mehrheit der in eine Zelle eingebrachten HC-Ad-Vektorgenome wird allerdings auch in dem hier vorgestellten System rekombiniert.

9.1.2 Replizierende HC-Ad-Vektoren unter Selektionsbedingungen

Mit HC-AdHygEBNA konnte ein Vektor entwickelt werden, der nach Zirkularisierung durch *FLPe* in den stark proliferierenden humanen Tumorzelllinien A549 und HeLa unter Selektionsbedingungen mithilfe des *oriP*/*EBNA-1*-Systems repliziert. Hierbei ist die Effizienz in A549-Zellen höher als in HeLa-Zellen. Es wurden bereits zelluläre Faktoren publiziert, die neben *oriP*/*EBNA-1* für eine effiziente Replikation von *oriP*/*EBNA-1*-basierten Plasmidsystemen notwendig sind [98]. Hierzu zählen unter anderem der „telomeric repeat binding factor 2“ TRF2, das mit diesem interagierende Protein hRap1, die Telomer-assoziierte Poly(ADP-ribose)-Polymerase sowie das p32/Tat-assoziierte Protein [127][128]. Es ist denkbar, dass diese Faktoren nicht in allen Zelllinien im gleichen Ausmass vorhanden sind. Dies könnte die unterschiedliche Effizienz der Replikation in

den beiden Zelllinien erklären. Bemerkenswert ist, dass die durch FLPe zirkularisierten Genome von HC-AdHygEBNA auch nach Absetzen der Selektion in A549-Zellen erhalten bleiben. Unter Selektion scheinen sich stabile Replikons zu bilden, die auch nach Absetzen der Selektion erhalten bleiben. Dieses Phänomen konnte auch für einige oriP/EBNA-1-basierte Plasmidsysteme beobachtet werden [129]. Dieser Umstand ermöglicht eventuell eine Anwendung des Systems in einer *ex vivo* Gentherapie. Hierbei würden den Patienten Zellen entnommen, *in vitro* mit einem solchen oriP/EBNA-1 basierten Vektorsystem transduziert und nach Selektion und klonaler Analyse die Zellen dem Patienten zurückgegeben, die das therapeutische Gen von einem stabilen Replikon exprimieren. Ein Vorteil eines solchen Ansatzes liegt darin, dass während der Zeit der Selektion der FLPe-exprimierende Vektor verloren geht und somit kein therapeutisch unerwünschtes Neoantigen mit möglicherweise toxischen Wirkungen im Patienten exprimiert werden muss. Des Weiteren könnte das Risiko möglicher Nebenwirkungen durch eine genaue genetische Analyse der transduzierten Zellen vor ihrer Rückgabe in den Patienten reduziert werden.

Die Literatur beschreibt für oriP/EBNA-1-basierte Plasmidsysteme unter Selektionsbedingungen den effizienten Erhalt von 2-10 Kopien der Replikons [125]. Das hier gezeigte System liegt bezüglich der Kopienzahlen an der unteren Grenze dieses Bereichs. Auf Grund der beobachteten Beeinträchtigung des Zellwachstums nach Transduktion mit HC-AdHygEBNA ohne Selektion kann davon ausgegangen werden, dass die starke Überexpression von *EBNA-1* durch den $SR\alpha$ -Promotor negative Konsequenzen für die Zellen hat. Da ein Zusammenhang zwischen der Menge an synthetisiertem EBNA-1 und der Kopienzahl des Vektors besteht, scheint es wahrscheinlich, dass die Zellen negativen Konsequenzen durch EBNA-1 dadurch entgegenwirken, dass sie die *EBNA-1*-exprimierenden Replikons nur in der minimal nötigen Kopienzahl erhalten. Dies könnte erklären, warum relativ wenige Kopien des Vektors HC-AdHygEBNA erhalten bleiben. Bislang existieren keine Studien über eine Wechselbeziehung zwischen der Menge an synthetisiertem EBNA-1 und der Zahl der etablierten, stabilen Replikons.

Während der Arbeiten an diesem System wurde von Tan *et al* ein ähnliches, auf Erstgenerationsvektoren basiertes System publiziert [113]. Dieses System arbeitet mit der cre-Rekombinase zur Exzision und Zirkularisierung eines oriP/EBNA-1 tragenden DNA-Fragmentes aus einem Erstgenerationsvektor. Der erzeugte Zirkel ist hierbei mit 7 kB relativ klein und bietet auf Grund der Limitierung des Erstgenerationsvektors nicht ausreichend Platz für ein weiteres Transgen. Die Replikation dieser Zirkel wurde unter Selektionsbedingungen in einer Osteosarkom-Zelllinie aus Hunden nachgewiesen. Es konnte eine mit dem hier vorgestellten System vergleichbare Effizienz der Replikation festgestellt werden. Allerdings wurde keine Analyse über den Erhalt der Replikons nach Absetzen der Selektion vorgenommen. Zudem wurden keine menschlichen Zelllinien verwendet. Ein weiterer, wichtiger Unterschied zwischen dem hier vorgestellten System und der Arbeit von Tan liegt in der Strategie zur Expression von *EBNA-1*. Tan *et al* konnten zeigen, dass es nicht möglich ist, Erstgenerationsvektoren zu erzeugen, die konstitutiv

EBNA-1 exprimieren. Daher wurde ein Vektor konstruiert, bei dem die *EBNA-1*-cDNA erst durch die Rekombination des Vektors in der Zielzelle stromaufwärts von dem zugehörigen Promotor platziert wurde. Es wurde postuliert, dass die Präsenz von *EBNA-1* die Replikation von oriP-tragenden, adenoviralen Vektoren in den Produktionszellen hemmt. Um dieses Problem in der vorliegenden Arbeit zu umgehen, wurde eine leichte Abwandlung des Protokolls zur seriellen Amplifikation der Vektoren vorgenommen, bei der die Infektion der Produktionszellen mit Helfervirus immer 4-6 h vor der Infektion mit vektorhaltigen Rohlysaten erfolgte. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die adenovirale Replikation bereits erfolgt war, bevor signifikante Mengen *EBNA-1* in den Produktionszellen synthetisiert wurden. Mit dieser Strategie gelang es problemlos, konstitutiv *EBNA-1*-exprimierende HC-Ad-Vektoren mit hohen Titern zu erzeugen. Eine detaillierte Charakterisierung dieser Strategie wurde bislang nicht vorgenommen.

9.1.3 Replikation von HC-Ad-Vektoren ohne Selektion

Alle gezeigten Vektoren, die das oriP/*EBNA-1*-System enthalten, können nach FLPe-vermittelter Zirkularisierung in den Zelllinien A549, HeLa und HeLa-*EBNA1* ohne Selektion replizieren. Die Replikation der durch FLPe zirkularisierten Genome der Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdHygEBNA ist aber ohne Selektion wenig effizient. Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur, die für oriP/*EBNA-1*-basierte Plasmidsysteme die Notwendigkeit von Selektion zur Ausbildung stabiler oriP-Replikons beschreibt [130]. Es wird davon ausgegangen, dass nur ein kleiner Teil der initial in die Zellen eingebrachten Replikons einen stabilen Status erhält. Die Ursachen für die Ausbildung dieses stabilen Status sind unbekannt. Hierbei wird ein seltenes, epigenetisches Ereignis vermutet [130]. Leight *et al* konnten zeigen, dass auch bei der Transfektion von oriP-Plasmiden in Zellklone, die bereits stabile oriP-Replikons tragen, die neu transfizierten Plasmide verloren gehen und vermuten einen Mechanismus, bei dem die Chromatinstruktur der Plasmide deren Erhaltungseffizienz beeinflusst.

Es gibt deutliche Hinweise, dass auch die DNA des Epstein-Barr-Virus nicht per se stabile Replikons bildet. Reisman und Sugden konnten zeigen, dass nach Infektion der EBV-positiven Lymphoblasten-Zelllinie TG8 mit dem EBV-Stamm B95-8, 85% der superinfizierten B95-8-DNA innerhalb von 7 Tagen verloren ging. In normalen TG8-Zellen können *EBNA*-Proteine nicht detektiert werden. 2 Tage nach Superinfektion der Zelllinie mit B95-8 waren in 60% der Zellen *EBNA*-Proteine nachweisbar. 10-15 Tage nach Infektion ließen sich *EBNA*-Proteine nur noch in 1% der Zellen nachweisen [131]. Yang *et al* infizierten die EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie mit dem rekombinanten Akata-Stamm von EBV, der ein Neomycin-Resistenzgen trägt. Auch hierbei entwickelte sich nur 1% der infizierten Zellen zu Neomycin-resistenten, EBV-positiven Klonen [132]. Auch die Infektion von 15 verschiedenen, epithelialen Zelllinien mit diesem rekombinanten Stamm führte unter Selektionsbedingungen zur Ausbildung stabiler Klone bei im Durchschnitt nur 4% der infizierten Zellen [133].

Der Vektor HC-AdSVEBNAs Δ FR ist in der Lage, ohne Selektion in A549-, HeLa- und HeLa-EBNA1-Zellen zu replizieren. Allerdings ist durch die Deletion des FR die regelgerechte Verteilung der replizierten Genome auf die Tochterzellen beeinträchtigt. Dies erklärt den schlechteren Erhalt dieses Vektors im Vergleich zu HC-AdSVEBNAs und HC-AdHygEBNA, die die gleiche Expressionskassette für *EBNA-1*, aber einen vollständigen oriP besitzen.

Nach Transduktion gleich welcher Zelllinie mit 20 MOI der Vektoren HC-AdSVEBNAs und HC-AdSCEBNAs Δ FR, die beide eine durch den SR α -Promotor gesteuerte Expressionskassette für *EBNA-1* besitzen, ist ein deutlich verlangsamtes Wachstum der Zellen zu beobachten. Dieses verlangsamte Zellwachstum konnte auch mit HC-AdHygEBNA, der die gleiche Expressionskassette besitzt, nicht aber mit einem der anderen Substratvektoren beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass die starke Überexpression von *EBNA-1* negative Auswirkungen auf das Zellwachstum hat. Dies könnte für die Experimente mit diesen Vektoren, die ohne Selektion durchgeführt wurden, bedeuten, dass Zellen mit weniger oder sogar keinen Kopien des Vektors einen Wachstumsvorteil besitzen und die Zellen überwachsen werden, in denen sich stabile Replikons gebildet haben. Für den relativ schlechten Erhalt des Vektors HC-AdSVEBNAs in den Zelllinien A549, HeLa und HeLa-EBNA1 sind daher wahrscheinlich zwei Faktoren verantwortlich. Zum einen bildet nur ein kleiner Teil der zirkularisierten Vektorgenome stabile Replikons und zum anderen haben Zellen, in denen sich diese Replikons nicht ausbilden, einen Wachstumsvorteil.

Hervorzuheben ist die hohe Effizienz der Replikation des Vektors HC-AdSVEBNAs ohne Selektion in HeLa-EBNA1-Zellen, dessen durch FLPe zirkularisierte Form noch 122 Tage nach Transduktion in den Zellen nachweisbar ist. Dieser Vektor zeigt eine Erhaltungseffizienz von 96-98% der Genome pro Verdopplung der Zellpopulation. Dies steht in Übereinstimmung mit Literaturwerten für oriP/*EBNA-1* basierte Plasmidsysteme unter Selektionsbedingungen. Im Vergleich zu HC-AdSVEBNAs ist die Expression von *EBNA-1* durch diesen Vektor nur schwach und es konnte auch bei hohen Vektordosen von 100 MOI keine Verlangsamung des Zellwachstums festgestellt werden. Dies scheint eine Ausbildung stabiler Replikons in HeLa-EBNA1-Zellen zu ermöglichen. Allerdings ist hierbei zu beobachten, dass bei Transduktion mit 100 MOI dieses Vektors nur ca. 10 stabile Replikons gebildet werden. Auch hier scheint also die Beschreibung der Literatur für oriP/*EBNA-1* basierte Plasmidsysteme auf das HC-Ad-Vektorsystem übertragbar zu sein.

9.1.4 Modell zur mathematischen Beschreibung der Erhaltungseffizienz

Es konnte ein Modell zur mathematischen Beschreibung der Erhaltungseffizienz der HC-Ad-Vektoren in replizierenden Zelllinien anhand des zeitlichen Verlaufs der Transgenexpression von diesen Vektoren entwickelt werden. Dieses Modell erlaubt den direkten,

quantitativen Vergleich der Erhaltungseffizienz der Vektoren in Zellen mit unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten. Die übersichtliche Darstellbarkeit der ermittelten M-Werte erlaubt es, auch kleine Unterschiede direkt sichtbar zu machen. Es konnte gezeigt werden, dass die ermittelten M-Werte, die auf den Daten der zeitlichen Verläufe der Transgenexpression basieren, mit den Daten aus den Southerntransfer-Assays korrelieren. Besonders augenscheinlich wird der Nutzen des Modells beim Vergleich der Vektoren HC-AdSVEBNA_w, HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam. Hier ist beim Vergleich der M-Werte ein geringer Unterschied der Erhaltungseffizienz zu Gunsten des Vektors HC-AdSVEBNA_w sichtbar, der sich nur schwer aus der Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Transgenexpression ablesen lässt. Ebenso deutlich wird der Unterschied in der Erhaltungseffizienz zwischen der durch FLPe-rekombinierten und der nicht-rekombinierten Form des Vektors HC-AdSVEBNA_w in HeLa-EBNA1-Zellen.

Der theoretische M-Wert ohne Replikation, aber mit regelgerechter Verteilung der Vektorgenome auf die Tochterzellen beträgt $M=2$. Alle hier ermittelten M-Werte liegen über diesem theoretischen Wert. Dies könnte durch eine unregelmäßige Replikation der Vektoren erklärt werden. Für humane DNA-Fragmente wurde gezeigt, dass sie bei einer Größe von über 20 kB in der Lage sind, autonom zu replizieren [102][103][104]. Dies wird darauf zurückgeführt, dass humane DNA-Moleküle dieser Größe statistisch betrachtet eine Sequenz besitzen können, die zumindest Replikationsursprung-ähnliche Aktivität zeigt. Allerdings ist kein Mechanismus vorhanden, der die regelgerechte Segregation der replizierten Moleküle auf die Tochterzellen erlaubt. Daher liegen die M-Werte für die Vektoren, die kein oriP/EBNA-1-System besitzen, das eine regelgerechte Segregation erlaubt, unter denen der Vektoren mit diesem System. Interessanterweise entspricht der M-Wert für den Vektor HC-AdSVEBNA_sΔFR in HeLa-Zellen dem M-Wert der Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam in diesen Zellen. Dies kann als weiterer Hinweis auf Replikation der Vektoren HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam gewertet werden. Die Identifikation eines mit einem solchen Vektorsystem anwendbaren, nicht-viralen Mechanismus zur nukleären Retention und regelgerechten Segregation der replizierten Vektorgenome auf die Tochterzellen würde einen Idealfall darstellen. Möglicherweise könnte die Einbringung von sogenannten „matrix attachment regions“ MARs in die Vektor-DNA eine Wirkung in diese Richtung ausüben [134].

9.1.5 Molekulare Analyse der Erhaltungsform von HC-AdSVEBNA_w

Am Beispiel der Vektoren HC-AdSVEBNA_w, HC-AdSVGFP und HC-AdSVLam konnte gezeigt werden, dass HC-Ad-Vektoren auch ohne Mitwirkung einer extern eingebrachten Rekombinase in geringen Mengen spontan zirkularisieren können, wobei die ITRs der Vektoren erhalten bleiben. Enthalten diese Zirkel das oriP/EBNA-1-Replikationssystem, können sie mit hoher Effizienz synchron zum Zellzyklus replizieren, wie ein Vergleich der M-Werte zwischen der durch FLPe zirkularisierten und der nicht-rekombinierten Form des Vektors HC-AdSVEBNA_w in HeLa-EBNA1-Zellen zeigt. Diese Zirkularisierung, die

ca. 1-3% der in die Zelle eingebrachten Vektorgenome betrifft, könnte in mehrfacher Hinsicht von großer Bedeutung sein. So könnte sie zum einen ein mitbestimmender Faktor für die Stabilität der HC-Ad-Vektor-vermittelten Transgenexpression in ruhenden Geweben sein. Es ist bislang nicht geklärt, auf welche Weise die Enden der linear vorliegenden Vektoren vor exonukleolytischer Aktivität geschützt werden. Unter der Annahme, dass das Terminale Protein, das kovalent mit den Vektorenden verknüpft ist, verloren geht, muss ein besonderer Schutz vor exonukleolytischer Degradation existieren. Möglicherweise stellt die spontane Selbstzirkularisierung der Vektoren genau diesen Schutz dar. Die beobachteten Sequenzvariationen an den Enden der ITRs in den gebildeten Zirkeln könnten darauf zurückzuführen sein, dass nach Verlust des Terminalen Proteins vor der Zirkularisierung der Vektoren bereits exonukleolytische Degradation stattgefunden hat. Des Weiteren könnte diese Beobachtung der spontanen Selbstzirkularisierung zur Entwicklung neuer Strategien bei der Konstruktion HC-Ad-Vektor-basierter stabiler Replikons von Bedeutung sein. So könnte hierbei in *ex vivo* Gentherapieansätzen, die den Einsatz großer Vektormengen erlauben, möglicherweise auf eine Rekombinase-vermittelte Zirkularisierung der Vektoren verzichtet werden. Dies könnte die möglichen Nebenwirkungen für die behandelten Zellen reduzieren, die durch Expression einer Rekombinase verursacht werden können.

Besonders bemerkenswert ist auch die große Effizienz der Erhaltung dieser Zirkel, wenn sie das oriP/EBNA-1-Replikationssystem besitzen. Die Effizienz der Erhaltung ist um Faktor 1,6 höher als die der FLPe-vermittelten Replikons. Dies könnte zwei Ursachen haben. Zum einen könnte der Größenunterschied der Zirkel von 6 kB eine Rolle spielen. Eventuell sind in den spontan gebildeten Zirkeln Sequenzen enthalten, die eine genauere Verteilung der replizierten Genome auf die Tochterzellen erlauben. Des Weiteren ist denkbar, dass die Zirkel sequenzbedingt Strukturen enthalten, die replikationsunterstützend wirken. Besonders die aneinandergesetzten ITRs könnten hierbei eine Rolle spielen. Eventuell lassen sich hier die DNA-Stränge während der Replikation leichter voneinander lösen.

Eine spontane Zirkularisierung adenoviraler DNA wurde bereits vor 20 Jahren beschrieben [135]. Ruben *et al* konnten nach Infektion mit Ad5 kovalent geschlossene Zirkel von Ad5-DNA in verschiedenen Ratten-Zelllinien und HeLa-Zellen nachweisen. Der Nachweis, dass es sich hierbei um zirkuläre DNA-Moleküle und nicht um Konkatemere handelt, wurde über ³H-Thymidin-Markierung in den Zellen, Extraktion der DNA und anschließender Dichtegradientenzentrifugation mit Fraktionierung des Gradienten geführt. Es wurde postuliert, dass das Terminale Protein oder sein Vorläufer möglicherweise eine Strangbruch-schließende, enzymatische Aktivität besitzen könnte, die zur Bildung der DNA-Zirkel führt [136]. Eventuell wird diese Funktion aber auch von zellulären Proteinen übernommen und das Terminale Protein ist nur beteiligt, indem es die ITR-Enden zueinander bringt. Diese Eigenschaft ist bereits bekannt [136].

Insgesamt ist festzuhalten, dass es auf Grund der gezeigten Daten wahrscheinlich erscheint, ein HC-Ad-Vektor-basiertes, therapeutisches System für episomale und stabile

Transgenexpression in proliferierenden Zellen auf der Basis der vorgestellten HC-Ad-Vektoren mit dem oriP/EBNA-1-System zu entwickeln, das in einer *ex vivo*-Strategie Anwendung finden kann. Nach Transduktion, Selektion und klonaler Analyse von Patientenzellen *in vitro* könnten hierbei die erfolgreich transduzierten Zellen mit stabilen, episomalen Replikons dem Patienten zurückgegeben werden. Mit einem solchen System könnten die bedeutenden Risiken einer insertionellen Mutagenese, die bei der Anwendung von Retrovirus-basierten Vektorsystemen auftritt, reduziert werden. Gleichzeitig könnten alle Vorteile, die HC-Ad-Vektorsysteme auszeichnen, genutzt werden.

10 Zusammenfassung

Adenovirale Vektoren mit hoher DNA-Kapazität (HC-Ad-Vektoren) transduzieren eine Vielzahl ruhender und proliferierender Zellen unterschiedlichen Ursprungs und sind relativ leicht in hohen Titern produzierbar. Sie sind auf Grund ihrer großen Aufnahmekapazität für Transgene, der geringen Toxizität und der geringen Immunogenität gegenüber anderen Vektorsystemen für gentherapeutische Zwecke zu bevorzugen. Die vorliegende Arbeit behandelt verschiedene Strategien zur HC-Ad-Vektor-vermittelten Langzeitexpression von Transgenen und besteht aus drei aufeinander aufbauenden Teilen. Da HC-Ad-Vektoren keine viralen Gene besitzen, können sie nicht über Plaque-Assays titriert werden. In Teil I musste daher zunächst ein mit konventionellen Labormethoden durchführbarer, leicht standardisierbarer, DNA-basierter und Reporter-gen-unabhängiger Assay zur Bestimmung der drei Kenngrößen von HC-Ad-Vektorpräparationen, nämlich der Zahl der infektiösen Partikel, der Zahl der nicht-infektiösen Partikel und der Zahl der Helferviruspartikel entwickelt werden.

Mit dem vorgestellten Assay können diese drei Kenngrößen erstmals mit einheitlicher Methodik verlässlich bestimmt werden. Dies war erforderlich für die Teile II und III der Arbeit, da das Testen verschiedener Strategien zur Langzeitexpression den Titer-abhängigen Vergleich verschiedener HC-Ad-Vektorpräparationen beinhaltet. Darüberhinaus hat der Assay große Bedeutung für klinische Anwendungen, bei denen die Vektordosis eine entscheidende Rolle zur Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen spielt. Da die linearen HC-Ad-Vektorgenome nach der Transduktion der Zielzellen episomal vorliegen, muss bei der Entwicklung von Strategien zur Langzeitexpression von Transgenen durch diesen Vektortyp zwischen postmitotischen, ruhenden Geweben einerseits und proliferierenden Geweben andererseits unterschieden werden. Als Paradigma für postmitotische, ruhende Gewebe wurde das retinale Pigmentepithel (RPE) gewählt. Dieses Gewebe ist gentherapeutisch relevant, da es von einer Reihe von Erkrankungen betroffen sein kann, für die Gentransfervektoren mit langzeitiger Transgenexpression neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnen können. In Teil II dieser Arbeit wurde ein HC-Ad-Vektor entwickelt, der eine stabile Transgenexpression im RPE *in vivo* über den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Monaten vermittelte. Es gab keine Hinweise auf eine durch diesen Vektor induzierte Toxizität oder Immunogenität im RPE. Dies stellte wahrscheinlich die Grundlage für die Langzeitexpression dar. Zudem waren nur sehr niedrige Vektordosen für eine effiziente und spezifische Transduktion des RPEs erforderlich. Diese Vektordosen wurden mithilfe des in Teil I entwickelten Assays bestimmt. Die Ergeb-

nisse bilden die Grundlage für weiterführende Arbeiten zur HC-Ad-Vektor-vermittelten Langzeitexpression therapeutischer Transgene in Modellen zur altersabhängigen Makuladegeneration.

Im Gegensatz zu ruhenden Geweben wie dem RPE gehen episomale HC-Ad-Vektorgenome in proliferierenden Zellen trotz ihrer reduzierten Toxizität und Immunogenität verloren, da sie keine besonderen Mechanismen zur Replikation und regelgerechten Segregation der replizierten Genome auf die Tochterzellen besitzen. Eine Vielzahl von gentherapeutisch relevanten Geweben besitzt aber eine natürliche Proliferationsrate. In Teil III der Arbeit wurde daher auf der Basis von HC-Ad-Vektoren ein System entwickelt, das eine Langzeitexpression von Transgenen auch in proliferierenden Zellen ermöglicht. Als Paradigma für proliferierende Gewebe wurden stark replizierende Tumorzelllinien gewählt. Die linearen Genome der HC-Ad-Vektoren wurden nach Transduktion der Zielzellen über die DNA-Rekombinase FLP mit hoher Effizienz zirkularisiert, um die Probleme zu umgehen, die sich bei der Replikation freier DNA-Enden ergeben können. Zur Replikation der zirkularisierten Genome und deren regelgerechter Verteilung auf die Tochterzellen wurde das oriP/EBNA-1-Replikationssystem aus Epstein-Barr-Virus (EBV) eingesetzt, das eine Replikation synchron zum Zellzyklus erlaubt. In Southern-Assays konnte gezeigt werden, dass in schnell proliferierenden Tumorzelllinien bis zu 98% der Vektorgenome pro Zellzyklus repliziert wurden. Dies wurde bestätigt durch ein Verfolgen der Transgenexpression in durchflusscytometrischen Messungen. Auf der Basis dieser Messungen wurde schließlich ein einfaches mathematisches Modell entwickelt, das die Quantifizierung und den Vergleich der Erhaltungseffizienz unterschiedlicher Vektorgenome in Zelllinien mit unterschiedlicher Proliferationsgeschwindigkeit erlaubt. Des Weiteren wurde entdeckt, dass die HC-Ad-Vektorgenome in geringem Ausmaß nach Transduktion der Zielzelle ohne Mitwirkung einer Rekombinase spontan zirkularisierten, und dass die so gebildeten Zirkel, wenn sie das oriP/EBNA-1-Replikationssystem trugen, mit der höchsten Effizienz replizierten.

Die Rahmenbedingungen, die eine Replikation von zirkularisierten HC-Ad-Vektorgenomen in schnell proliferierenden Tumorzellen mithilfe des oriP/EBNA-1-Systems erlauben, wurden genau charakterisiert und deuten darauf hin, dass das entwickelte HC-Ad-Vektorsystem in naher Zukunft mit geringen Anpassungen in *ex vivo* Gentherapieansätzen einsetzbar ist.

11 Abstract

High-capacity adenoviral vectors (HC-Ad-vectors) can transduce a significant number of resting and proliferating cells of different origin and can be produced to high titers. They feature a high capacity for the uptake of foreign transgenes and low toxicity as well as low immunogenicity and are, therefore, favourable among other gene transfer systems. This thesis deals with different strategies to mediate long-term transgene expression by HC-Ad-vectors. HC-Ad-vectors do not contain any viral genes and conventional plaque-assays for titration cannot be performed. Therefore, it was first necessary to set up a DNA-based and reporter gene-independent assay to determine the three important parameters of HC-Ad-vector preparations, namely the number of infectious particles, the number of non-infectious particles and the number of helpervirus particles (part I). This assay allows for accurate determination of these parameters by standard laboratory methods and was required for parts II and III of the thesis, because testing strategies to mediate long-term transgene expression involves the comparison of different HC-Ad-vector preparations in a titer-dependent manner. Furthermore, the assay will be of significance for clinical applications of HC-Ad-vectors to avoid dose-related unexpected adverse events.

To develop different strategies to mediate long-term transgene expression by episomal HC-Ad-vectors, one has to distinguish between postmitotic, resting cells and proliferating tissues. As a paradigm for resting cells, the retinal pigment epithelium (RPE) was chosen. This tissue can be affected by several diseases, and gene transfer vectors, that mediate long-term transgene expression could lead to the establishment of new therapeutic strategies. In part II of this thesis an HC-Ad-vector was developed, which mediates stable transgene expression for at least six month *in vivo* in the RPE. There was no evidence for toxicity or immunogenicity after transduction of the RPE. This very likely contributes to the long-term expression of the transgene. It was demonstrated, that very low vector dosis are necessary for efficient and specific transduction of the RPE *in vivo*. The vector dosis were determined by the assay developed in part I of the thesis. These results are the basis for further experiments with HC-Ad-vectors mediating long-term expression of therapeutic transgenes in the RPE to address age-related macular degeneration (ARMD), a significant disease of the RPE.

In contrast to resting tissues like the RPE, episomal HC-Ad-vectors are lost in proliferating cells despite their low toxicity and immunogenicity, because they do not possess distinct mechanisms for replication and segregation of replicated genomes to daughter cells. However, a significant number of tissues relevant for gene therapy has a natural tur-

nover. Therefore, in part III of this thesis an HC-Ad-vector-based system was developed, that allows for long-term transgene expression in proliferating cells. As a paradigm for the latter, fast proliferating tumor cell lines were chosen. After transduction, the linear HC-Ad-vector genomes were circularised with high-efficiency by the DNA-recombinase FLP to circumvent problems that could arise from replication of free ends of DNA. The oriP/EBNA-1 replication system derived from Epstein Barr virus (EBV) was used to allow for replication of the circular DNA once per cell cycle. In fast proliferating tumor cells up to 98% of the circularised genomes were replicated and segregated to daughter cells as could be shown by Southern-assays. This was confirmed by monitoring transgene expression in flow cytometry experiments. In addition, the latter was used to establish a simple mathematical model for quantitative description and comparison of the maintenance of different vector genomes in cell lines with different proliferation rates. Finally, it was discovered that a small number of HC-Ad-vector genomes was able to spontaneously circularise after transduction of target cells without any DNA recombinase. These circles could replicate with the highest efficiency when they harboured the oriP/EBNA-1 replication system.

The conditions that allow for oriP/EBNA-1-dependent replication of circularised HC-Ad-vector genomes in proliferating tumor cell lines were characterised in detail. It is possible that after minor modifications this system will be suitable for *ex vivo* gene therapeutic approaches in the near future.

Literaturverzeichnis

- [1] W. F. Anderson. Human gene therapy. *Nature*, 392(6679 Suppl):25–30, 1998.
- [2] M. A. Morsy, K. Mitani, P. Clemens, and C. T. Caskey. Progress toward human gene therapy. *Jama*, 270(19):2338–45, 1993.
- [3] B. N. Fields. *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Cold Spring Harbor, N.Y., 2nd edition, 1996.
- [4] C. A. Gaydos and J. C. Gaydos. Adenovirus vaccines in the U.S. military. *Mil Med*, 160(6):300–4, 1995.
- [5] J. M. Bergelson, J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275(5304):1320–3, 1997.
- [6] F. L. Graham and L. Prevec. Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol*, 3(3):207–20, 1995.
- [7] G. Shaw, S. Morse, M. Ararat, and F. L. Graham. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J*, 16(8):869–71, 2002.
- [8] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1):59–74, 1977.
- [9] N. Louis, C. Eveleigh, and F. L. Graham. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, 233(2):423–9, 1997.
- [10] A. J. Bett, W. Haddara, L. Prevec, and F. L. Graham. 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, 1994.

- [11] K. M. Hehir, D. Armentano, L. M. Cardoza, T. L. Choquette, P. B. Berthelette, G. A. White, L. A. Couture, M. B. Everton, J. Keegan, J. M. Martin, D. A. Pratt, M. P. Smith, A. E. Smith, and S. C. Wadsworth. Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J Virol*, 70(12):8459–67, 1996.
- [12] F. J. Fallaux, A. Bout, I. van der Velde, D. J. van den Wollenberg, K. M. Hehir, J. Keegan, C. Auger, S. J. Cramer, H. van Ormondt, A. J. van der Eb, D. Valerio, and R. C. Hoeben. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 9(13):1909–17, 1998.
- [13] G. Schiedner, S. Hertel, and S. Kochanek. Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum Gene Ther*, 11(15):2105–16, 2000.
- [14] M. Christ, M. Lusky, F. Stoeckel, D. Dreyer, A. Dieterle, A. I. Michou, A. Pavirani, and M. Mehtali. Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol Lett*, 57(1-3):19–25, 1997.
- [15] G. P. Gao, Y. Yang, and J. M. Wilson. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol*, 70(12):8934–43, 1996.
- [16] G. Schiedner, N. Morral, R. J. Parks, Y. Wu, S. C. Koopmans, C. Langston, F. L. Graham, A. L. Beaudet, and S. Kochanek. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet*, 18(2):180–3, 1998.
- [17] A. P. Byrnes, R. E. MacLaren, and H. M. Charlton. Immunological instability of persistent adenovirus vectors in the brain: peripheral exposure to vector leads to renewed inflammation, reduced gene expression, and demyelination. *J Neurosci*, 16(9):3045–55, 1996.
- [18] A. P. Byrnes, M. J. Wood, and H. M. Charlton. Role of T cells in inflammation caused by adenovirus vectors in the brain. *Gene Ther*, 3(7):644–51, 1996.
- [19] K. L. Molnar-Kimber, D. H. Serman, M. Chang, E. H. Kang, M. ElBash, M. Lanuti, A. Elshami, K. Gelfand, J. M. Wilson, L. R. Kaiser, and S. M. Albelda. Impact of preexisting and induced humoral and cellular immune responses in an adenovirus-based gene therapy phase I clinical trial for localized mesothelioma. *Hum Gene Ther*, 9(14):2121–33, 1998.
- [20] Y. Yang, Q. Su, and J. M. Wilson. Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. *J Virol*, 70(10):7209–12, 1996.

- [21] D. E. Brough, A. Lizonova, C. Hsu, V. A. Kulesa, and I. Kovesdi. A gene transfer vector-cell line system for complete functional complementation of adenovirus early regions E1 and E4. *J Virol*, 70(9):6497–501, 1996.
- [22] S. Kochanek. High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther*, 10(15):2451–9, 1999.
- [23] K. Mitani, F. L. Graham, C. T. Caskey, and S. Kochanek. Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9):3854–8, 1995.
- [24] P. Yeh and M. Perricaudet. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *Faseb J*, 11(8):615–23, 1997.
- [25] R. J. Parks and F. L. Graham. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J Virol*, 71(4):3293–8, 1997.
- [26] R. J. Parks, L. Chen, M. Anton, U. Sankar, M. A. Rudnicki, and F. L. Graham. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):13565–70, 1996.
- [27] M. A. Morsy, M. Gu, S. Motzel, J. Zhao, J. Lin, Q. Su, H. Allen, L. Franlin, R. J. Parks, F. L. Graham, S. Kochanek, A. J. Bett, and C. T. Caskey. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14):7866–71, 1998.
- [28] D. Maione, M. Wiznerowicz, P. Delmastro, R. Cortese, G. Ciliberto, N. La Monica, and R. Savino. Prolonged expression and effective readministration of erythropoietin delivered with a fully deleted adenoviral vector. *Hum Gene Ther*, 11(6):859–68, 2000.
- [29] S. Kochanek, P. R. Clemens, K. Mitani, H. H. Chen, S. Chan, and C. T. Caskey. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12):5731–6, 1996.
- [30] R. Kumar-Singh and J. S. Chamberlain. Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells. *Hum Mol Genet*, 5(7):913–21, 1996.
- [31] S. E. Haecker, H. H. Stedman, R. J. Balice-Gordon, D. B. Smith, J. P. Greelish, M. A. Mitchell, A. Wells, H. L. Sweeney, and J. M. Wilson. In vivo expression

- of full-length human dystrophin from adenoviral vectors deleted of all viral genes. *Hum Gene Ther*, 7(15):1907–14, 1996.
- [32] C. E. Thomas, G. Schiedner, S. Kochanek, M. G. Castro, and P. R. Lowenstein. Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13):7482–7, 2000.
- [33] M. M. Burcin, G. Schiedner, S. Kochanek, S. Y. Tsai, and B. W. O'Malley. Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(2):355–60, 1999.
- [34] N. Morral, W. O'Neal, K. Rice, M. Leland, J. Kaplan, P. A. Piedra, H. Zhou, R. J. Parks, R. Velji, E. Aguilar-Cordova, S. Wadsworth, F. L. Graham, S. Kochanek, K. D. Carey, and A. L. Beaudet. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22):12816–21, 1999.
- [35] J. A. Bristol, P. Shirley, N. Idamakanti, M. Kaleko, and S. Connelly. In vivo dose threshold effect of adenovirus-mediated factor VIII gene therapy in hemophiliac mice. *Mol Ther*, 2(3):223–32, 2000.
- [36] N. Tao, G. P. Gao, M. Parr, J. Johnston, T. Baradet, J. M. Wilson, J. Barsoum, and S. E. Fawell. Sequestration of adenoviral vector by kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol Ther*, 3(1):28–35, 2001.
- [37] F. L. Graham and L. Prevec. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991.
- [38] H. H. Chen, L. M. Mack, S. Y. Choi, M. Ontell, S. Kochanek, and P. R. Clemens. DNA from both high-capacity and first-generation adenoviral vectors remains intact in skeletal muscle. *Hum Gene Ther*, 10(3):365–73, 1999.
- [39] H. S. Liu, M. S. Jan, C. K. Chou, P. H. Chen, and N. J. Ke. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun*, 260(3):712–7, 1999.
- [40] A. Martinez-Serrano, A. Villa, B. Navarro, F. J. Rubio, and C. Bueno. Human neural progenitor cells: better blue than green? *Nat Med*, 6(5):483–4, 2000.
- [41] L. Aurisicchio, P. Delmastro, V. Salucci, O. G. Paz, P. Rovere, G. Ciliberto, N. La Monica, and F. Palombo. Liver-specific alpha 2 interferon gene expression results in protection from induced hepatitis. *J Virol*, 74(10):4816–23, 2000.

- [42] Jr. Maizel, J. V., D. O. White, and M. D. Scharff. The polypeptides of adenovirus. I. evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7a, and 12. *Virology*, 36(1):115–25, 1968.
- [43] N. Mittereder, K. L. March, and B. C. Trapnell. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol*, 70(11):7498–509, 1996.
- [44] D. Bok. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*, 17:189–95, 1993.
- [45] S. M. Gu, D. A. Thompson, C. R. Srikumari, B. Lorenz, U. Finckh, A. Nicoletti, K. R. Murthy, M. Rathmann, G. Kumaramanickavel, M. J. Denton, and A. Gal. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet*, 17(2):194–7, 1997.
- [46] H. Morimura, G. A. Fishman, S. A. Grover, A. B. Fulton, E. L. Berson, and T. P. Dryja. Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6):3088–93, 1998.
- [47] M. A. Maw, B. Kennedy, A. Knight, R. Bridges, K. E. Roth, E. J. Mani, J. K. Mukkadan, D. Nancarrow, J. W. Crabb, and M. J. Denton. Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 17(2):198–200, 1997.
- [48] K. Petrukhin, M. J. Koisti, B. Bakall, W. Li, G. Xie, T. Marknell, O. Sandgren, K. Forsman, G. Holmgren, S. Andreasson, M. Vujic, A. A. Bergen, V. McGarty-Dugan, D. Figueroa, C. P. Austin, M. L. Metzker, C. T. Caskey, and C. Wadelius. Identification of the gene responsible for best macular dystrophy. *Nat Genet*, 19(3):241–7, 1998.
- [49] J. Evans and R. Wormald. Is the incidence of registrable age-related macular degeneration increasing? *Br J Ophthalmol*, 80(1):9–14, 1996.
- [50] K. A. Rezai, A. Lappas, L. Farrokh-siar, L. Kohen, P. Wiedemann, and K. Heilmann. Iris pigment epithelial cells of long evans rats demonstrate phagocytic activity. *Exp Eye Res*, 65(1):23–9, 1997.
- [51] U. Schraermeyer, V. Enzmann, L. Kohen, K. Addicks, P. Wiedemann, and K. Heilmann. Porcine iris pigment epithelial cells can take up retinal outer segments. *Exp Eye Res*, 65(2):277–87, 1997.

- [52] N. Kociok, H. Heppekausen, U. Schraermeyer, P. Esser, G. Thumann, S. Grisanti, and K. Heimann. The mRNA expression of cytokines and their receptors in cultured iris pigment epithelial cells: a comparison with retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, 67(2):237–50, 1998.
- [53] D. W. Dawson, O. V. Volpert, P. Gillis, S. E. Crawford, H. Xu, W. Benedict, and N. P. Bouck. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 285(5425):245–8, 1999.
- [54] V. Stellmach, S. E. Crawford, W. Zhou, and N. Bouck. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5):2593–7, 2001.
- [55] W. Cao, J. Tombran-Tink, W. Chen, D. Mrazek, R. Elias, and J. F. McGinnis. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res*, 57(6):789–800, 1999.
- [56] P. E. Rakoczy, C. M. Lai, W. Y. Shen, N. Daw, and I. J. Constable. Recombinant adenovirus-mediated gene delivery into the rat retinal pigment epithelium in vivo. *Aust N Z J Ophthalmol*, 26 Suppl 1:S56–8, 1998.
- [57] K. Spilsbury, K. L. Garrett, W. Y. Shen, I. J. Constable, and P. E. Rakoczy. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am J Pathol*, 157(1):135–44, 2000.
- [58] M. P. Calos. Stability without a centromere. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8):4084–5, 1998.
- [59] K. Mitani and S. Kubo. Adenovirus as an integrating vector. *Curr Gene Ther*, 2(2):135–44, 2002.
- [60] R. C. Mulligan. The basic science of gene therapy. *Science*, 260(5110):926–32, 1993.
- [61] A. D. Miller. Human gene therapy comes of age. *Nature*, 357(6378):455–60, 1992.
- [62] M. Cavazzana-Calvo, S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bouso, F. L. Deist, and A. Fischer. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288(5466):669–72, 2000.
- [63] E. Marshall. Clinical research. gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science*, 298(5591):34–5, 2002.

- [64] S. Tonegawa. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302(5909):575–81, 1983.
- [65] L. Hood, M. Kronenberg, and T. Hunkapiller. T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell*, 40(2):225–9, 1985.
- [66] F. W. Alt, T. K. Blackwell, R. A. DePinho, M. G. Reth, and G. D. Yancopoulos. Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunol Rev*, 89:5–30, 1986.
- [67] D. G. Schatz, M. A. Oettinger, and D. Baltimore. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, 59(6):1035–48, 1989.
- [68] M. A. Oettinger, D. G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Cell*, 248(4962):1517–23, 1990.
- [69] C. U. Kirchgessner, C. K. Patil, J. W. Evans, C. A. Cuomo, L. M. Fried, T. Carter, M. A. Oettinger, and J. M. Brown. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science*, 267(5201):1178–83, 1995.
- [70] T. Blunt, N. J. Finnie, G. E. Taccioli, G. C. Smith, J. Demengeot, T. M. Gottlieb, R. Mizuta, A. J. Varghese, F. W. Alt, P. A. Jeggo, and et al. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine SCID mutation. *Cell*, 80(5):813–23, 1995.
- [71] M. Yaneva, T. Kowalewski, and M. R. Lieber. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *Embo J*, 16(16):5098–112, 1997.
- [72] A. Nussenzweig, C. Chen, V. da Costa Soares, M. Sanchez, K. Sokol, M. C. Nussenzweig, and G. C. Li. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature*, 382(6591):551–5, 1996.
- [73] S. Gilfillan, A. Dierich, M. Lemeur, C. Benoist, and D. Mathis. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science*, 261(5125):1175–8, 1993.
- [74] M. R. Lieber. Site-specific recombination in the immune system. *Faseb J*, 5(14):2934–44, 1991.
- [75] S. Fujimoto and H. Yamagishi. Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements. *Nature*, 327(6119):242–3, 1987.
- [76] K. Okazaki and H. Sakano. Thymocyte circular DNA excised from T cell receptor alpha-delta gene complex. *Embo J*, 7(6):1669–74, 1988.

- [77] S. Takeshita, M. Toda, and H. Yamagishi. Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *Embo J*, 8(11):3261–70, 1989.
- [78] J. E. Hesse, M. R. Lieber, M. Gellert, and K. Mizuuchi. Extrachromosomal DNA substrates in pre-b cells undergo inversion or deletion at immunoglobulin V-(D)-J joining signals. *Cell*, 49(6):775–83, 1987.
- [79] P. Cortes, F. Weis-Garcia, Z. Misulovin, A. Nussenzweig, J. S. Lai, G. Li, M. C. Nussenzweig, and D. Baltimore. In vitro V(D)J recombination: signal joint formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):14008–13, 1996.
- [80] T. M. Leu, Q. M. Eastman, and D. G. Schatz. Coding joint formation in a cell-free V(D)J recombination system. *Immunity*, 7(2):303–14, 1997.
- [81] D. A. Ramsden, T. T. Paull, and M. Gellert. Cell-free V(D)J recombination. *Nature*, 388(6641):488–91, 1997.
- [82] M. S. Schlissel and D. Baltimore. Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell*, 58(5):1001–7, 1989.
- [83] W. C. Lin and S. Desiderio. Regulation of V(D)J recombination activator protein RAG-2 by phosphorylation. *Science*, 260(5110):953–9, 1993.
- [84] U. Grawunder, D. G. Schatz, T. M. Leu, A. Rolink, and F. Melchers. The half-life of RAG-1 protein in precursor B cells is increased in the absence of RAG-2 expression. *J Exp Med*, 183(4):1731–7, 1996.
- [85] J. R. Broach and J. B. Hicks. Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle. *Cell*, 21(2):501–8, 1980.
- [86] J. R. Broach, V. R. Guarascio, and M. Jayaram. Recombination within the yeast plasmid 2mu circle is site-specific. *Cell*, 29(1):227–34, 1982.
- [87] J. F. Senecoff, R. C. Bruckner, and M. M. Cox. The FLP recombinase of the yeast 2-micron plasmid: characterization of its recombination site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(21):7270–4, 1985.
- [88] C. I. Rodriguez, F. Buchholz, J. Galloway, R. Sequerra, J. Kasper, R. Ayala, A. F. Stewart, and S. M. Dymecki. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to cre-loxP. *Nat Genet*, 25(2):139–40, 2000.
- [89] F. Buchholz, P. O. Angrand, and A. F. Stewart. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol*, 16(7):657–62, 1998.

- [90] P. J. Dyson and P. J. Farrell. Chromatin structure of epstein-barr virus. *J Gen Virol*, 66 (Pt 9):1931–40, 1985.
- [91] A. Adams. Replication of latent epstein-barr virus genomes in Raji cells. *J Virol*, 61(5):1743–6, 1987.
- [92] A. Harris, B. D. Young, and B. E. Griffin. Random association of Epstein-Barr virus genomes with host cell metaphase chromosomes in Burkitt’s lymphoma-derived cell lines. *J Virol*, 56(1):328–32, 1985.
- [93] J. L. Yates, N. Warren, and B. Sugden. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, 313(6005):812–5, 1985.
- [94] J. L. Yates and N. Guan. Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol*, 65(1):483–8, 1991.
- [95] D. Reisman, J. Yates, and B. Sugden. A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol Cell Biol*, 5(8):1822–32, 1985.
- [96] T. A. Gahn and C. L. Schildkraut. The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell*, 58(3):527–35, 1989.
- [97] D. Reisman and B. Sugden. Trans-activation of an epstein-barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol Cell Biol*, 6(11):3838–46, 1986.
- [98] Z. Deng, L. Lezina, C. J. Chen, S. Shtivelband, W. So, and P. M. Lieberman. Telomeric proteins regulate episomal maintenance of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication. *Mol Cell*, 9(3):493–503, 2002.
- [99] G. Klein. Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. *Cell*, 77(6):791–3, 1994.
- [100] S. Banerjee, E. Livanos, and J. M. Vos. Therapeutic gene delivery in human B-lymphoblastoid cells by engineered non-transforming infectious Epstein-Barr virus. *Nat Med*, 1(12):1303–8, 1995.
- [101] V. Todorovic, A. Falaschi, and M. Giacca. Replication origins of mammalian chromosomes: the happy few. *Front Biosci*, 4:D859–68, 1999.
- [102] S. B. Haase and M. P. Calos. Replication control of autonomously replicating human sequences. *Nucleic Acids Res*, 19(18):5053–8, 1991.

- [103] P. J. Krysan, S. B. Haase, and M. P. Calos. Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells. *Mol Cell Biol*, 9(3):1026–33, 1989.
- [104] S. S. Heinzl, P. J. Krysan, C. T. Tran, and M. P. Calos. Autonomous DNA replication in human cells is affected by the size and the source of the DNA. *Mol Cell Biol*, 11(4):2263–72, 1991.
- [105] P. J. Krysan and M. P. Calos. Epstein-Barr virus-based vectors that replicate in rodent cells. *Gene*, 136(1-2):137–43, 1993.
- [106] G. Abdurashidova, M. Deganuto, R. Klima, S. Riva, G. Biamonti, M. Giacca, and A. Falaschi. Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin. *Science*, 287(5460):2023–6, 2000.
- [107] G. Abdurashidova, S. Riva, G. Biamonti, M. Giacca, and A. Falaschi. Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin. *Embo J*, 17(10):2961–9, 1998.
- [108] S. Kumar, M. Giacca, P. Norio, G. Biamonti, S. Riva, and A. Falaschi. Utilization of the same DNA replication origin by human cells of different derivation. *Nucleic Acids Res*, 24(17):3289–94, 1996.
- [109] E. M. Southern. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98(3):503–17, 1975.
- [110] P. Chomczynski. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem*, 201(1):134–9, 1992.
- [111] G. M. Wahl, M. Stern, and G. R. Stark. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(8):3683–7, 1979.
- [112] Joseph Sambrook, Tom Maniatis, and E. F. Fritsch. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2nd edition, 1989.
- [113] B. T. Tan, L. Wu, and A. J. Berk. An Adenovirus-Epstein-Barr virus hybrid vector that stably transforms cultured cells with high efficiency. *J Virol*, 73(9):7582–9, 1999.
- [114] V. Biermann, C. Volpers, S. Hussmann, A. Stock, H. Kewes, G. Schiedner, A. Herrmann, and S. Kochanek. Targeting of high-capacity adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 12(14):1757–69, 2001.
- [115] U. F. Greber, M. Willetts, P. Webster, and A. Helenius. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 75(3):477–86, 1993.

- [116] http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3768b1_01.pdf.
- [117] Jr. Maizel, J. V., D. O. White, and M. D. Scharff. The polypeptides of adenovirus. II. soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion. *Virology*, 36(1):126–36, 1968.
- [118] P. Ng, C. Beauchamp, C. Eveleigh, R. Parks, and F. L. Graham. Development of a FLP/Frt system for generating helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther*, 3(5 Pt 1):809–15, 2001.
- [119] J. P. Metcalf, M. M. Monick, M. F. Stinski, and G. W. Hunninghake. Adenovirus E1a 13s gene product up-regulates the cytomegalovirus major immediate early promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10(4):448–52, 1994.
- [120] L. Ma, H. A. Bluysen, M. De Raeymaeker, V. Laurysens, N. van der Beek, H. Pavliska, A. J. van Zonneveld, P. Tomme, and H. H. van Es. Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR. *J Virol Methods*, 93(1-2):181–8, 2001.
- [121] Z. L. Jiang, D. Reay, F. Kreppel, A. Gambotto, E. Feingold, S. Kochanek, S. A. McCarthy, and P. R. Clemens. Local high-capacity adenovirus-mediated mCTL4iG and mCD40iG expression prolongs recombinant gene expression in skeletal muscle. *Mol Ther*, 3(6):892–900, 2001.
- [122] J. Bennett, J. Wilson, D. Sun, B. Forbes, and A. Maguire. Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer into adult murine retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(5):2535–42, 1994.
- [123] M. B. Reichel, R. R. Ali, A. J. Thrasher, D. M. Hunt, S. S. Bhattacharya, and D. Baker. Immune responses limit adenovirally mediated gene expression in the adult mouse eye. *Gene Ther*, 5(8):1038–46, 1998.
- [124] I. Semkova, F. Kreppel, G. Welsandt, T. Luther, J. Kozlowski, H. Janicki, S. Kochanek, and U. Schraermeyer. Autologous transplantation of genetically modified iris pigment epithelial cells: a promising concept for the treatment of age-related macular degeneration and other disorders of the eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20):13090–5, 2002.
- [125] J. L. Yates and N. Guan. Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol*, 65(1):483–8, 1991.
- [126] E. R. Leight, B. Sugden, and E. R. Light. The cis-acting family of repeats can inhibit as well as stimulate establishment of an oriP replicon. *J Virol*, 75(22):10709–20, 2001.

- [127] Y. Wang, J. E. Finan, J. M. Middeldorp, and S. D. Hayward. P32/tap, a cellular protein that interacts with EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *Virology*, 236(1):18–29, 1997.
- [128] S. Van Scoy, I. Watakabe, A. R. Krainer, and J. Hearing. Human p32: a coactivator for Epstein-Barr virus nuclear antigen-1-mediated transcriptional activation and possible role in viral latent cycle DNA replication. *Virology*, 275(1):145–57, 2000.
- [129] J. Black and J. M. Vos. Establishment of an oriP/EBNA1-based episomal vector transcribing human genomic beta-globin in cultured murine fibroblasts. *Gene Ther*, 9(21):1447–54, 2002.
- [130] E. R. Leight and B. Sugden. Establishment of an oriP replicon is dependent upon an infrequent, epigenetic event. *Mol Cell Biol*, 21(13):4149–61, 2001.
- [131] D. Reisman and B. Sugden. An EBNA-negative, EBV-genome-positive human lymphoblast cell line in which superinfecting EBV DNA is not maintained. *Virology*, 137(1):113–26, 1984.
- [132] L. Yang, S. Maruo, and K. Takada. CD21-mediated entry and stable infection by Epstein-Barr virus in canine and rat cells. *J Virol*, 74(22):10745–51, 2000.
- [133] S. Imai, J. Nishikawa, and K. Takada. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol*, 72(5):4371–8, 1998.
- [134] B. P. Brylawski, S. M. Cohen, M. Cordeiro-Stone, M. J. Schell, and D. G. Kaufman. On the relationship of matrix association and DNA replication. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 10(1):91–9, 2000.
- [135] M. Ruben, S. Bacchetti, and F. Graham. Covalently closed circles of Adenovirus 5 DNA. *Nature*, 301(5896):172–4, 1983.
- [136] A. J. Robinson, H. B. Youngusband, and A. J. Bellett. A circular DNA-protein complex from adenoviruses. *Virology*, 56(1):54–69, 1973.

Erklärung

„Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie -abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen- noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von PD Dr. Stefan Kochanek betreut worden.“

Teilpublikationen

F.Kreppel, V.Biermann, S.Kochanek, G.Schiedner. A DNA-based method to assay total and infectious particle contents and helper virus contamination in high-capacity adenoviral vector preparations. *Hum Gene Ther*, 13(10):1151-6, 2002.

F.Kreppel, T.T. Luther, I.Semkova, U.Schraermeyer, S.Kochanek. Long-term transgene expression in the RPE after gene transfer with a high-capacity adenoviral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(6):1965-70, 2002.

Lebenslauf

Florian Kreppel
Türnicher Straße 20
50969 Köln

Staatsangehörigkeit: deutsch

19.05.1972 : geboren in München

1978-1982 : Besuch der städtischen Gemeinschaftsgrundschule Erkrath/Unterfeldhaus

1982-1991 : Besuch des Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasiums, Hilden

Juni 1991 : Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife, Note: 1,0

1991-1992 : Wehrdienst bei 2./FmBtl1, Hannover

1992-1998 : Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1993-1998 : Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

Oktober 1993 : Diplom-Vorprüfung Teil I

April 1995 : Diplom-Vorprüfung Teil II

1996-1997 : Praktisches Studienjahr am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Juli 1998 : Erwerb des Diploms in Biochemie an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Note: 1,5
Diplomarbeit: „Entwicklung eines langzeitexprimierenden adenoviralen
Vektors zur Inhibition apoptotischer Prozesse im ZNS“ bei
Prof.Dr. Mathias Bähr, Neurologische Universitätsklinik, Tübingen, Note: 1,0

1998-2002 : Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
bei PD Dr. Stefan Kochanek am

Zentrum Molekulare Medizin Köln (ZMMK), Universität zu Köln

1999-2001 : Stipendiat des Boehringer-Ingelheim-Fonds