INAUGURAL - DISSERTATION

Rekombinante Parvoviren in der Gentherapie von Krebs: Vektorcharakterisierung und Analyse der Wirksamkeit

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg

vorgelegt von

Apothekerin Susanne Lang aus Ochsenfurt

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg

vorgelegt von

Apothekerin Susanne Lang aus Ochsenfurt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2003

Rekombinante Parvoviren in der Gentherapie von Krebs: Vektorcharakterisierung und Analyse der Wirksamkeit

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Zawatzky Prof. Dr. Gert Fricker Diese Dissertation wurde am Institut für Angewandte Tumorvirologie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in der Abteilung von Prof. Dr. Jean Rommelaere in Heidelberg mit Unterstützung der französischen Forschungsgemeinschaft INSERM (*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*), Unité 375 (Virologie Appliquée à l'Oncologie), angefertigt.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet, noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. An keiner anderen Stelle ist ein Prüfungsverfahren beantragt.

Heidelberg, den 27.01.2003

Susanne Lang

A Inhaltsverzeichnis

Α	Inhaltsverzeichnis	i
В	Abbildungsverzeichnis	vi
С	Tabellenverzeichnis	ix
D	Abkürzungsverzeichnis	х
Е	Zusammenfassung	xiv

I Einleitung

1 Traditionelle Krebstherapien und ihre Probleme	1
2 Gentherapie von Krebs	2
2.1 Methoden des Gentransfers	2
2.1.1 Nicht viraler Gentransfer	4
2.1.2 Viraler Gentransfer	5
2.2 Gentherapeutische Ansätze zur Krebsbekämpfung	7
2.2.1 Korrektur genetischer Defekte in Tumorzellen	7
2.2.2 Neue Strategien für eine medikamentöse Therapie	8
3 Immuntherapie von Krebs	9
3.1 Unspezifische Aktivierung des Immunsystems	11
3.1.1 Immunmodulation	13
3.1.2 Zytokin-orientierte Gentherapie	13
3.2 Steigerung der Tumorimmunogenität	13
3.3 Tumorvakzinierung	14
4 Autonome Parvoviren als gentherapeutische Vektoren bei Krebs	16
4.1 Taxonomie der Parvoviren	16
4.2 Aufbau der Viruspartikel	17
4.3 Parvoviraler Lebenszyklus	19
4.4 Parvovirale DNA-Replikation	20
4.5 Parvovirale Proteine	22
4.6 Herstellung rekombinanter Parvoviren	23
4.7 Therapieverstärkende Transgene	24
5 Zielsetzung der Arbeit	26

II Ergebnisse

1 Effizienzvergleich von rekombinanten und Wildtyp Parvoviren	29
1.1 Einflüsse auf die Qualität rekombinanter Virusproduktionen	30
1.2 Geringere Infektiösität rekombinanter im Vergleich zu Wildtyp Viren	32
1.3. Lineare Absorption der Viren an die meisten Zelllinien	34
1.4 Unterschiede in der Amplifikation rekombinanter und Wildtyp Viren	35
1.5. Gleich hohe Expression viraler Proteine	39
1.6. Wildtyp Parvoviren sind zytotoxischer als Rekombinante Parvoviren	40
2 Das murine Tumormodell Mastozytom P815	. 43
2.1 Effiziente Infektion von P815 Zellen mit MVMp Wildtyp	43
2.2 Keine Transgenexpression von rekombinanten Viren in P815 Zellen	45
2.3 Tumorsuppressive Wirkung des MVMp Wildtyp Virus in vivo	47
3 Das renale Adenokarzinom RENCA als murines Tumormodell	. 50
3.1 RENCA ist MHC-Klasse I positiv	51
3.2 Charakterisierung der parvoviralen Infektion In vitro	52
3.2.1 MVMp Wildtyp Virusproduktion	52
3.2.2 ZYTOTOXIZITAT 3.2.3 Transgeneypression	55 55
2.2. Antitumoralo Effekto rekombinantor Parvoviron im syngonon	"
Tumormodell RENCA – Balb/c Maus	58
3.3.1 Antitumorale Effekte von MVMp/IL-2 und MVMp/MDC Viren	58
3.3.2 Nachweis der IL-2 - Aktivität im Tumor in vivo	61
3.3.3 Antitumorale Effekte von MVMp/IL-2 und MVMp/IP-10 Viren	63
4 Immunogenität des MVMp Wildtyp Virus in C57Bl/6 Mäusen	.64
4.1 Zelluläre Immunantwort auf eine Infektion mit MVMp Wildtyp Virus	65
4.1.1 Etablierung einer Positivkontrolle mit Vacciniavirus	65
4.1.2 Untersuchung der CTL-Aktivität MVMp-infizierter Mause	66
4.2 Humorale Immunantwort auf eine Infektion mit MVMp 4.2.1 Bildung von IgG2a und IgG3 Antikörpern als Zeichen	/1
einer Ini-Antwort 1.2.2. Pildung von Antikörnern gegen NS1 und des virele Kansid	77
4.2.2 bildung von Antikorpern gegen NST und das virale Rapsia 4.2.3 Virus neutralisierende Aktivität der antiviralen Antikörner	74
4.2.4 Einfluss des Infektionsweges auf die Antikörperbildung	78
4.2.5 Persistenz der antiviralen Antikörper	79
4.3 Modell für eine readministrative Therapie	80
4.3.1 Inhibierung der viralen Genexpression nach wiederholter	
Virusgabe	80
4.3.2 Keine Kreuzreaktivität von anti-MVMp-Antikörpern mit H1 Viren 4.3.3 Umgehung der neutralisierenden Immunantwort bei viraler	82
Zweitapplikation durch Pseudotypisierung	83

III Diskussion

1 C	harakterisierung parvoviraler Vektoren	85
1.1	Geringe Infektiösität rekombinanter Viren	85
1.2	Unterschiede in Amplifikation bei gleicher Proteinexpression	87
1.3	Geringe Zytotoxizität rekombinanter Viren	88
2 W	/irksamkeit gentherapeutischer Versuche mit Parvoviren	90
2.1	Die anti-parvovirale Immunantwort	91
	2.1.1 Entwicklung einer Virus-neutralisierenden humoralen	
	Immunantwort	91
	2.1.2 Induktion einer Tumortherapie förderlichen Th1-Immunantwort	93
2.2	Das Gelingen der parvoviralen Gentherapie im Tumormodell	97
2.3	Kein synergistischer Effekt der IL-2 / Chemokin Kombinationstherapien	98
2.4	Möglichkeiten der Vakzinierung mit Parvoviren	99

IV Material und Methoden

1 Material	. 103
1.1 Plasmide	103
1.2 Zelllinien	103
1.3 Zellkulturmedien	103
1.4 Chemikalien	104
1.5 Puffer und Lösungen	104
2 Molekularbiologische Methoden	. 106
2.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien	106
2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus E. Coli	106
2.2.1 Minipräparation zur Isolierung von Plasmid-DNA	106
2.2.2 Maxipräparation zur Isolierung von Plasmid-DNA	106
2.3 Isolierung von Nukleinsäuren aus Gewebe	106
2.3.1 Extraktion von DNA	106
2.3.2 Extraktion von RNA	106
2.4 Analyse von Nukleinsäuren	107
2.4.1 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit	107
2.4.2 Restriktionshydrolyse	107
2.4.3 Agarosegelelektrophorese	108
2.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	108
2.4.5 Abschätzung der DNA-Konzentration durch Gelelektrophorese	108
2.5 Nachweis von Nukleinsäuren	108
2.5.1 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA Sonden	108
2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	109
2.5.3 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	110

3 Biochemische Methoden	111
3.1 Isolierung von Proteinen aus Säugetierzellen	111
3.2 Proteinanalyse	111
3.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	111
3.2.2 Western Blot Analyse	112
3.2.3 Coomassie Färbung	112
3.2.4 Proteinbestimmung (IL-2 und MDC) mittels ELISA	112
3.2.5 EGFP Messung mittels Durchflusszytometrie (FACS)	113
4 Immunologische Methoden	113
4.1 Nachweis exprimierter Oberflächenantigene mittels FACS-Analyse	113
4.2 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von T-Lymphozyten	113
4.2.1 Immunisierung von Mäusen	113
4.2.2 Anlegen von Milzzellkulturen	114
4.2.3 In vitro Stimulierung von Milzzellkulturen mit Antigen	114
4.2.4 Präparierung der Effektorzellen	116
4.2.5 Praparierung der Zielzellen	116
4.3 Antikörpernachweis in Maus-Sera	117
4.3.1 Gewinnung von Blut-Serum	117
4.3.2 Bestimmung unspezifischer Serum-Immunglobuline	117
4.3.3 Nachweis antiviraler Antikörper verschiedener isolypen 4.3.4 Nachweis antiviraler Antikörper mittels Immunfluoreszenz	110
4.3.4 Nachweis antivitater Antikorper Inittets initialijtatieszenz 4.3.5 Restimmung der neutralisierenden Aktivität antiviraler Antikörner	120
	120
5 Zellbiologische Methoden	121
5.1 Kultivierung von Zellen	121
5.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	122
5.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen druch Trypanblaufärbung	122
5.4 Methoden zur Bestimmung zytopathischer Effekte	122
5.4.1 Färbung mit Alamar-Blue	123
5.4.2 Färbung mit MTT	123
5.4.3 Messung der LDH Aktivität	123
5.4.4 Färbung mit Neutralrot	123
5.4.5 Farbung mit Kristallviolett nach McCoy	123
5.4.6 Klondildungstest 5.4.7 Soft Agar Klondildungstest	124
5.4.7 Soft-Agui-Rionbildungstest	124
5.5 Intektion von Zellen	124
6 Virologische Methoden	125
6.1 Produktion von Wildtyp Viren durch Infektion	125
6.2 Produktion rekombinanter Viren durch Transfektion	125
6.3 Produktion von Wildtyp Viren durch Transfektion (MVMp/Tr)	126
6.4 Aufreinigung und Konzentrierung von Viren nach ihrer Produktion	126
6.4.1 CsCl-Dichtegradient	126
6.4.2 Iodixanol-Dichtegradient	126
6.4.3 Viruskonzentrierung durch Filtration	127
6.5 Hämagglutinationstest	127

6.6 Titration von Viren	127
6.6.1 Bestimmung des Replikationstiters mittels Filter- Hybridisierungstest	127
6.6.2 Bestimmung des Lysetiters mittels Plaque-Test	128
6.6.3 Bestimmung des Genomtiters mittels Dot-Blot	128
6.7 Zellulärer Dot-Blot	129
6.8 Infektion mit rekombinanten Vacciniaviren	129
7 Tierexperimentelle Methoden	130
7.1 Versuchstiere	130
7.2 Tumor- und Organentnahme	130
7.3 Immunisierung von Mäusen	130
7.4 Injektion in vitro infizierter Tumorzellen (ex vivo Versuch	e) 130
7.5 Injektion etablierter Tumore (<i>in vivo</i> Versuche)	131
7.6 Bestimmung des Tumorvolumens	131
	(
v Literaturverzeichnis	

B Abbildungsverzeichnis

Kapitel I

Abb.	1	Einsatzbereiche zur Zeit laufender klinischer Gentherapiestudien (Phase I - III)	2
Abb.	2	Barrieren beim Gentransfer	4
Abb.	3	Überlebensstrategien von Tumorzellen	10
Abb.	4	Immuntherapeutische Strategien und ihre Angriffspunkte	15
Abb.	5	Struktur des MVMp Parvovirus mit fiktivem Kapsid	18
Abb.	6	Schematische Darstellung der Genomorganisation autonomer Nagerparvoviren	18
Abb.	7	Der lytische Infektionszyklus autonomer Parvoviren	20
Abb.	8	Vereinfachte Darstellung der parvoviralen Replikation nach dem rollenden Haarnadelmechanismus	21
Abb.	9	Schematische Darstellung rekombinanter MVMp Vektoren	24
Abb.	10	Theoretisches Modell der antitumoralen Kombinationstherapie von MVMp/IL-2 mit MVMp/MDC oder MVMp/IP-10	27
<u>Kapi</u>	tel 1	I	
Abb.	11	Wichtige Faktoren für eine effiziente parvovirale Infektion	29
Abb.	12	Moi-abhänigige virale Absorption an verschiedene Zellen	35
Abb.	13	Amplifikation von MVMp und MVMp/IL-2 in NBK Zellen	36
Abb.	14	Vergleich der Amplifikation von MVMp und MVMp/IL-2 in verschiedenen Zellen	37
Abb.	15	Vergleich der Amplifikation von H1 und hH1/IL-2 Virus in verschiedenen Zellen	37
Abb.	16	Geringe Amplifikation in H5V Zellen	38
Abb.	17	Geringe Amplifikation rekombinanter Viren in RENCA Zellen	38
Abb.	18	Gleiche NS1 Expression nach Infektion	39
Abb.	19	Zytotoxizität von MVMp und MVMp/IL-2 Viren in A9 Zellen	40
Abb.	20	Einfluß von Neuraminidase und neutralisierenden Antikörpern auf die Zytotoxizität des Wildtyp Virus	42
Abb.	21	Einfluß von MVMp und MVMi auf die Proliferation von P815 Zellen	44
Abb.	22	Reduzierte Klonbildung MVMp-infizierter P815 Zellen	44
Abb.	23	Soft-Agar-Klonbildungstest MVMp/MDC und MVMp infizierter P815 Zellen	45
Abb.	24	IL-2 Produktion in MVMp/IL-2 infizierten RENCA und P815 Zellen	46
Abb.	25	NS1 Expression nach Infektion mit MVMp und MVMp/MDC Virus	46

Abb. 26	Antitumoraler Effekt des MVMp Virus auf etablierte P815 Tumore <i>in vivo</i>	49
Abb. 27	IL-2 Produktion verschiedener Zelllinien nach Infektion mit MVMp/IL-2 Viren	51
Abb. 28	Nachweis von MHC–Klasse I Molekülen in RENCA und P815 Zellen	51
Abb. 29	MVMp Wildtyp Virusproduktion in RENCA und A9 Zellen	52
Abb. 30	Zytotoxizität des MVMp Wildtyp Virus in RENCA Zellen	54
Abb. 31	Zytotoxizität des MVMp Wildtyp und rekombinanten MVMp/IL-2 Virus im Vergleich	55
Abb. 32	Transgenexpression MVMp/IL-2 und MVMp/MDC infizierter RENCA Zellen	56
Abb. 33	Antitumorale Effekte rekombinanter MVMp/IL-2 und MVMp/MDC Viren im Tumormodell RENCA– Balb/c Maus	59
Abb. 34	Verzögerte Tumorbildung durch MVMp/IL-2 Viren	60
Abb. 35	Verzögertes Tumorwachstum durch MVMp/MDC Viren	60
Abb. 36	RT-PCR von ex vivo infizierten RENCA Tumoren in Balb/c Mäusen	62
Abb. 37	Antitumorale Effekte rekombinanter MVMp/IL-2 und MVMp/IP-10 Viren im Tumormodell RENCA– Balb/c Maus	64
Abb. 38	Zytotoxische Aktivität von Milzzellen einer Vacciniavirus immunisierten Maus	66
Abb. 39	Expression parvoviraler Proteine in MC57G Zellen	67
Abb. 40	Zytotoxizität allogen und Vacciniavirus stimulierter T-Zellen	68
Abb. 41	NS1–spezifische Zytotoxizität MVMp/EGFP stimulierter T-Zellen	69
Abb. 42	IFN-γ Produktion MVMp und Vakzinia Virus stimulierter Milzzellkulturen	70
Abb. 43	RT-PCR der Lymphknoten MVMp-infizierter Mäuse	71
Abb. 44	Unterschiede im Gesamtkörper Ig Profil der Mäuse durch Infektion mit MVMp Viren	72
Abb. 45	Anti-MVMp Kapsid Antikörper verschiedener Ig Isotypen	74
Abb. 46	Anti-MVMp Kapsid Antikörper verschiedener Ig Isotypen in IFNAR-/- Mäusen	75
Abb. 47	Immunfluoreszenz zur Detektion antiviraler Antikörper	76
Abb. 48	Bestimmung der Virus neutralisierenden Aktivität antiviraler Antikörper	77
Abb. 49	Inhibierung der Transgenexpression (EGFP) durch neutralisierende Antikörper	77
Abb. 50	Einfluß des Infektionsweges auf die antiviralen IgG Antikörpertiter	78
Abb. 51	Virus neutralisierende Aktivität antiviraler Antikörper nach unterschiedlichen Infektionswegen	79

Abb. 52	Persistenz antiviraler IgG Antikörpertiter nach unterschiedlichen	
	Infektionswegen	80
Abb. 53	RT-PCR Analyse der Lymphknoten im readministrativen Modell	81
Abb. 54	Keine Kreuzreaktivität des H1 Virus mit anti-MVMp Antikörpern	82
Abb. 55	RT-PCR Analyse des Tumorgewebes bei Zweitapplikation	
	eines Pseudotyps	83
Abb. 56	Modell für eine Therapie mit wiederholter Virusgabe	84
<u>Kapitel</u>	IV	
Abb. 57	Darstellung der als Sonde genutzten viralen Fragmente	109
Abb. 58	Beispiel für die Definierung eines arbiträren Standards	119
Abb. 59	Produktionsschema rekombinanter Viren	125

C Tabellenverzeichnis

Kapitel I

Tab. 1	Vor- und Nachteile viraler und nicht viraler Vektoren	3
Tab. 2	Anteil viraler und nicht viraler Vektoren aktueller klinischer Studien	5
Tab. 3	Charakterisierung viraler Vektoren	6
Tab. 4	Aktuelle gentherapeutische Ansätze zur Krebsbekämpfung und deren Anwendung in klinischen Studien	7
Tab. 5	Freisetzende Zellen und Funktionen krebsrelevanter Zytokine	11
<u>Kapitel</u>	II	
Tab. 6	Einfluß des Iodixanol- und CsCl-Gradienten auf die Infektiösität	30
Tab. 7	Vergleich der infektiösen Titer nach einem Jahr Lagerung bei 4°C	31
Tab. 8	Vergleich der infektiösen Titer nach einem Jahr unterschiedlicher Lagerung	32
Tab. 9	Infektiöser Titer und Genomtiter verschiedener Virusproduktionen im Vergleich	33
Tab. 10	Antitumorale Effekte von MVMp Wildtyp Viren in P815 Tumorzellen <i>ex vivo</i>	48
Tab. 11	EGFP Expression in MVMp/EGFP-infizierten RENCA und A9 Zellen	57
Kapitel	IV	
Tab. 12	Plasmidüberprüfende Restriktionshydrolysen	107
Tab. 13	Verwendete Primer unter Angabe der Annealing-Temperatur und der Länge des PCR-Produkts	110
Tab. 14	Auflistung der für Serum-Immunglobulin-ELISAs verwendeten Antikörper	118
TAb. 15	Verwendungszweck und Komplettmedien muriner Zelllinien	121
Tab. 16	Verwendungszweck und Komplettmedien humaner Zelllinien	122

D Abkürzungsverzeichnis

α	anti
α -MEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification
Α	Absorption
AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
ABTS	(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhvdrogencarbonat-Lösung
ADV	Aleutian Mink Disease Virus (Aleutian mink disease Parvovirus)
AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrome
allo	allogen
Ak	Antikörper
APCs	Antigen-presenting cells (Antigen-präsentierende Zellen)
ß-ME	ß-Mercaptoethanol
В	B-Zelle
 B19	B19 Parvovirus
BPV	Bovine Parvovirus (Kuh-Parvovirus)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca	circa
cm	Zentimeter
cox-2	Cycloxygenase-2
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
CPV	Canine Parvovirus (Hunde-Parvovirus)
CsCl	Cäsiumchlorid
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes (zytotoxische T Lymphozyten)
Da	Dalton
DC	Dendritic cells (Dendritische Zellen)
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Sandwich Enzym-Immunassay)
et al.	und andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FasL	Fas Ligand
FCS	foetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FPV	Feline Parvovirus (KatzenParvovirus)
g	Genome, Genomanzahl

GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
	(Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor)
GT	Genomtiter
h	Stunde
H1	H1 Virus
H₂O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpipeazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
HPV	Humanes Papillomvirus
	horseradish perovidase (Meerrettich-Perovidase)
	Hitzoschockprotoino
	Horpes Simpley Thymidinkingso
	Interferen
	Tra LIN Desentes de Geiente Mässer
IFNAR-/-	Typ 1 IFN Rezeptor defiziente mause
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IT	Infektiöser Titer
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobase
kDa	kilo Dalton
Konz.	Konzentration
konz.	konzentriert
KRV	Kilham Ratten-Parvovirus
ku	kilo <i>units</i>
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
LB	Liquid-Broth Medium
LDH	Lactat-Dehvdrogenase
LT	Lysetiter
	ein Parvovirus unbekannter Herkunft
M	Molar
м МФ	Makronhagen
m⊈ m∆	Milliamporo
may	Maximal
	Maxillal
MCP-3	Monocyte chemolactic protein 5
MDC	Macrophage derived chemokine
MEM	Minimum Essential Meaium Eagle
mg	
MHC	major histocompatibility complex (großer Histokompatibilitätskomplex)
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mΜ	Millimolar
moi	<i>multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion) = ru/Zelle, bezogen auf den infektiösen Titer

MPV	Maus-Parvovirus
mRF	monomere Replikationsform
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MTT	3-(4 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2 5-diphenyltetrazoliumbromid
AA\/AA	Minute virus of mice, on Maus-Parvovirus
////////	Immuneupprossiver Typ des MVM Pervovirus
	Distature das MVAA Demonstrue
wwwp	Prototyp des mym Parvovirus
MW	Mittelwert
NC	Nitrocellulose
NDW	Newcastle Disease Virus
Neur.	Neuraminidase
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NS1/2	parvovirales Nichtstrukturprotein-1/2
nt	Nukleotide
OAc	Acetat
PAGE	Polvacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-genufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
nfu	nlague-forming unit (Plague-bildende Finbeit)
	Phospholipase Λ_2
	Porcine Parvovirus (Schweine-Parvovirus)
nPR	Retinoblastom Protein
pro	recombinent (rekombinent)
ret	recombinant (recombinant)
rek	rekompinant manlika tina Fama
RF	replikative Form
RNA	Ribonukleinsaure
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RI	Raumtemperatur oder Replikationstiter
RT-PCR	Reversed transcriptase PCR
ru	replication unit (Replikationseinheit), Einheit des Virustiters
RV	Ratten-Parvovirus
s.c.	subcutaneous (subkutan)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts = S $/\sqrt{n}$)
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A ₂
SSC	sodium chloride / sodium citrate (Natriumchlorid / Natriumcitrat)
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSRNA	einzelsträngige RNA
STARW	Standardabweichung S
Т	
Τλλς	Tumorassozijerte Antigene
Tab	
	Tris Acotat / EDTA
	Tric / EDTA
	Therefore an anti-the factor & (Niteranan Weshetum falter &)
10[-1) Th	T Uniformalia
	I-FICHERZEURE
	I-Helterzelle des Typ 1/2
	Iumor-infiltrierende Lymphozyten
IМ	melting-Temperatur

TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
μCi	Mikro-Curie
μι	Mikroliter
μg	Mikrogramm
u	unit (Einheit)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor (endothelialer Gefäßwachstums-
	faktor)
vgl.	Vergleiche
VLPs	virus like particles (Virus-analoge Partikel)
VP1/2	Strukturprotein 1/2 des Parvovirus
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VTE	Virus-TE
VV	Vaccinia Virus
wt	<i>wild-type</i> (Wildtyp)
Х	mal, -fach
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
%	Prozent
Δ	delta, Deletion

E Zusammenfassung

Die autonomen Nagerparvoviren MVMp und H1 stellen aufgrund ihrer onkosuppressiven Eigenschaften bei gleichzeitig geringer Pathogenität im adulten Tier attraktive Vektoren für den Einsatz in der Tumor-Gentherapie dar. Um die oft unzureichende antitumorale Aktivität der Wildtyp Viren zu verstärken, wurden rekombinante parvovirale Vektoren entwickelt, in denen zum einen alle bisher bekannten Elemente für die virale DNA-Replikation, Genexpression und Zytotoxizität erhalten und zum anderen der Einbau eines therapieverstärkenden Transgens durch eine Deletion in den Kapsidproteingenen ermöglicht wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst geprüft, inwieweit sich die generierten rekombinanten Viren von den Wildtyp Viren unterscheiden. Es wurde festgestellt, dass rekombinante Viren bei gleicher Viruspartikelzahl deutlich weniger infektiös sind als Wildtyp Viren. Die Beeinflussung der Kapsidstruktur durch veränderte rekombinante Virus DNA kann dafür eine Erklärung sein. Der gezeigte Unterschied in der Amplifikation rekombinanter und Wildtyp Viren bei gleichem infektiösen Titer ist wahrscheinlich auf die Eigenschaft der Wildtyp Viren zurückzuführen, eine große Menge an verpackter, einzelsträngiger Virus DNA zu produzieren. Bei rekombinanten Viren wird dagegen die Synthese neuer einzelsträngiger DNA aufgrund der fehlenden Kapsidproteine nicht stimuliert. Daher war es nicht unerwartet, dass rekombinante und Wildtyp Parvoviren eine gleiche Fähigkeit zur viralen Proteinexpression zeigen. Somit ist die wichtigste Voraussetzung für einen effizienten gentherapeutischen Transfer erfüllt. Allerdings weisen rekombinante Parvoviren trotz gleicher viraler NS1 Proteinexpression überraschend eine geringere Zytotoxizität gegenüber entsprechenden Wildtypformen auf. Neben dem viralen, multifunktionellen Nichtstrukturprotein NS1 müssen deshalb weitere Faktoren, wie zum Beispiel die Kapsidproteine, für die Zytotoxizität von Bedeutung sein.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Bewertung der Effizienz gentherapeutischer Versuche mit Parvoviren *in vivo*. Dazu wurden zum einen die Immunantwort auf MVMp Wildtyp Virus infizierter C57Bl/6 Mäuse analysiert und zum anderen antitumorale Effekte rekombinanter Viren, die immunstimulierende Zytokin/Chemokin-Gene tragen, in einem murinen Nierenkarzinom Modell untersucht.

MVMp-infizierte Mäuse entwickelten eine starke humorale, aber unerwartet geringe zelluläre Immunantwort. Um eine Neutralisierung des Virus durch Antikörper bei wiederholter Virusgabe innerhalb eines kurzen Zeitraums zu umgehen, bietet sich die Pseudotypisierung des viralen Genoms in ein verwandtes virales Kapsid als Lösung an. Die Induktion von IgG2a und IgG3 Antikörpern in Mäusen durch Infektion mit MVMp könnte ein Zeichen für eine Th1 Immunantwort darstellen, die bei einer antitumoralen Therapie förderlich sein sollte.

Im Blickpunkt der Untersuchung antitumoraler Effekte rekombinanter Parvoviren stand die Kombinationstherapie des MVMp/IL-2 Virus mit den Chemokintransduzierenden Parvoviren MVMp/MDC oder MVMp/IP-10. Dabei sollten die Chemokine durch Anlockung immunologischer Effektorzellen, insbesondere Dendritischer Zellen durch das Chemokin MDC, und IL-2 die antitumorale Immunantwort gegenseitig stimulieren. Trotz deutlicher antitumoraler Einzeleffekte der rekombinanten Parvoviren, die einen parvoviralen Gentransfer mit therapeutischer Wirksamkeit *in vivo* bestätigen, konnte entgegen der Vorstellung jedoch keine synergistische Wirkung bei einer Kombinationstherapie in diesem Modell beobachtet werden.

Die Ergebnisse lassen zusammen mit Beobachtungen anderer auf eine starke Abhängigkeit des therapeutischen Erfolgs vom verwendeten Tumormodell schließen. So konnte im Gegensatz zu Nierenkarzinomzellen die Infektion von Mastozytomzellen mit MVMp Wildtyp Viren eine antitumorale Immunität in Mäusen induzieren. Es zeigen sich damit deutliche Perspektiven für den Einsatz zytotoxischer, immunmodulierender rekombinanter Parvoviren zur Tumorzellvakzinierung.

I Einleitung

1 Traditionelle Krebstherapien und ihre Probleme

Krebs ist nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Becker et al., 2001). Die Therapie erfolgt zur Zeit überwiegend mit traditionellen Methoden, zu denen die operative Tumorentfernung, die Chemotherapie und die Strahlentherapie zählen. Es können jedoch nur bestimmte Tumorarten bisher vollständig geheilt werden, so zum Beispiel der Hodenkrebs. Die höchste Mortalitätsrate weisen Prostata-, Brust-, Darm- und Lungenkrebs auf und sind damit besonders schwer therapierbar (Abbott, 2002; Becker et al., 2001). Die relative Fünfjahres-Überlebensrate in Deutschland beträgt für alle Krebsarten im Mittel etwa 40 %, somit sind die Therapieerfolge insgesamt gesehen immer noch sehr gering (Becker et al., 2001). Die Chemo- und Strahlentherapie führen außerdem zu starken zytotoxischen Nebenwirkungen in gesunden Körperzellen, was die Lebensqualität der Patienten erheblich beeinträchtigt. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite ist eine Wirkungsverstärkung durch eine höhere Dosierung des Arzneistoffs nur begrenzt möglich. Werden aber die Tumorzellen bei einer Therapie nicht effizient abgetötet, kann eine weitere Behandlung (i) durch Resistenzentwicklung gegenüber den verabreichten Chemotherapeutika, (ii) durch Metastasenbildung oder (iii) durch Auftreten von Rezidiven erschwert werden.

Es wird daher nach neuen Therapiemethoden gesucht, die eine für Tumorzellen selektive und hohe antitumorale Wirkung aufweisen, aber andere Körperzellen, die nicht entartet sind, nicht beeinträchtigen. Gute Möglichkeiten bieten gen- und immuntherapeutische Ansätze (Kap. 2 und 3). Vielversprechende Methoden, die ebenso unterstützend eingesetzt werden können, sind auch die Hemmung der Gefäßneubildung (Antiangiogenese), die Inhibierung des Abbaus extrazellulärer Matrix durch Metalloproteinaseblocker, die Hyperthermie (lokal induzierte Übererwärmung) und die Lasertherapie.

2 Gentherapie von Krebs

Gentherapie ist definiert als das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieses Gens einen therapeutischen Nutzen zu erzielen (Hallek et al., 2001). Durch eine gezielte Anreicherung eines Arzneistoffs am Wirkort können die sonst bei systemischer Gabe induzierten Nebenwirkungen reduziert werden. Die für gentherapeutische Methoden Erfolge konnten im Jahr 2000 erstmals für prognostizierten monogene Erbkrankheiten klinisch bestätigt werden (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Kay, 2000). Mittlerweile wird versucht, die Methode der Gentherapie auch bei anderen Erkrankungen einzusetzen. In Abb. 1 sind die zur Zeit laufenden klinischen Gentherapiestudien bezüglich der zu therapierenden Krankheiten dargestellt. Die meisten Studien erfolgen im Bereich der Krebsforschung (64 %). Einen geringeren Anteil stellen die monogenetischen (12 %), kardiovaskulären (8 %) und infektiösen Erkrankungen (6 %, zum Beispiel AIDS, Hepatitis B) dar, sowie weitere Krankheiten (2 %), zu denen unter anderem die rheumatoide Arthritis und neurodegenerative Leiden (Alzheimer, Morbus Parkinson) zählen.





2.1 Methoden des Gentransfers

Es bestehen zwei Möglichkeiten eines Gentransfers: (i) das direkte Einbringen des Gens in den Körper (*in vivo*) oder (ii) *ex vivo*, indem das Gen außerhalb des Körpers in leicht isolierbare Körperzellen (hämatopoetische Zellen und Leberzellen) transferiert wird und die manipulierten Zellen anschließend wieder reimplantiert werden. Für das Einschleusen genetischen Materials in Zellen *in vivo* wird ein Vehikel benötigt, das als Vektor bezeichnet wird. Der Vektor ist damit für das Erreichen der Zielzellen (*Targeting*) verantwortlich und beeinflusst somit die Effizienz der Gentherapie. An einen idealen Vektor stellen sich folgenden Anforderungen: (i) ein hoch selektiver Transfer in die Zielzellen, (ii) eine hohe Effizienz des Gentransfers, (iii) eine stabile und regulierbare Genexpression, (iv) eine ausreichende Aufnahmekapazität von Genen, (v) eine geringe Pathogenität und Immunogenität, (vi) eine einfache, kosteneffiziente und reproduzierbare Herstellung und (vii) eine hohe Stabilität. Es gibt eine Reihe von physikalischen, chemischen und biologischen Methoden, die sich mit dem Problem des Gentransfers auseinandersetzen. Allgemein wird zwischen viralen und nicht viralen Vektoren unterschieden. Keines der zur Zeit verfügbaren Vektorsysteme kann jedoch allen Ansprüchen genügen. In Tab. 1 sind Vor- und Nachteile viraler und nicht viraler Vektoren, die in den beiden folgenden Abschnitten eingehender vorgestellt werden, zusammengestellt.

Vektor	Vorteile	Nachteile
viral	 effizienter Gentransfer z.T. selektive Virusreplikation Genomintegration stabile Genexpression 	 homologe Rekombination Gefahr der Mutagenese und Karzinogenese etablierte antivirale Immunant- wort durch eine frühere Infektion Induktion einer Immunantwort Pathogenität aufwendige Produktion geringe Titer limitierte Größe des Fremdgens geringe Selektivität
nicht viral	 kosteneffiziente Herstellung hohe Produktionsausbeuten hohe Sicherheit theroretisch keine Begren- zung der Fremdgengröße 	 ineffizienter Gentransfer in den Zellkern keine Genomintegration nur transiente Expression keine Selektivität teilweise toxische Effekte (Elektroporation, Lipoplexe)



2.1.1 Nicht viraler Gentransfer

Das Einschleusen von DNA oder RNA in Zellen durch nicht virale Träger wird als **Transfektion** bezeichnet. Die Nukleinsäuren können dabei entweder "nackt" mit physikalischen Transfektionsmethoden (Elektroporation, Mikroinjektion, Genbombardierung "gene gun"), oder assoziiert mit chemischen Molekülen (unlösliche Salze wie Calciumphosphat, kationische Liposomen, Polymere) übertragen werden. Extrachromosomal replizierende Vektoren, zum Beispiel künstliche Chromosomen, stellen eine nicht virale Alternative für eine permanente Transgenexpression dar.

Ein entscheidender Nachteil nicht viraler Vektoren ist ihre geringe Effizienz. In Abb. 2 sind die Barrieren veranschaulicht, die für einen effizienten Gentransfer überwunden werden müssen. Unabhängig von der Methode erfolgt stets eine endosomale Aufnahme der DNA in die Zelle. Sofern die Zielzelle erreicht wurde (*Targeting*), sind die am stärksten limitierenden Barrieren die Umgehung des lysosomalen Systems durch rechtzeitige Freisetzung der DNA oder des Vektors aus dem Endosom und das Eindringen der DNA in den Nukleus (Coonrod *et al.*, 1997).



Abb. 2: Barrieren beim Gentransfer

Aktuelle Strategien zur Verbesserung der Effizienz nicht viraler Vektoren zielen daher (i) auf das *Targeting* durch Kopplung des Vektors an einen Ligand eines zellspezifischen Rezeptors (zum Beispiel Transferrin oder Folat zum *Targeting* von Krebszellen), (ii) auf eine endosomale Freisetzung durch den Einbau endosomo-

lytischer Moleküle in den DNA-Komplex, oder (iii) auf den Transport in den Nukleus durch Anlagerung von Peptiden oder Sequenzen mit einer Nukleus-Lokalisierungsaktivität.

2.1.2 Viraler Gentransfer

Virale Vektoren müssen die gleichen Barrieren überwinden wie nicht virale Vektoren. Da Viren jedoch die evolutionär erworbene Fähigkeit besitzen, ihre Gene effizient in infizierte Wirtszellen einzuschleusen, weist der virale Gentransfer im Vergleich zum nicht viralen eine erheblich größere Effizienz auf. Virale Vektoren erhalten daher trotz des generell bestehenden Risikos einer viral hervorgerufenen Mutagenese meist den Vorzug vor nicht viralen Vektoren, nicht zuletzt auch aufgrund ihrer oft selektiven Replikation in bestimmten Zellen und ihrer möglichen Modifizierung zu apathogenen Vektoren. Dies spiegelt sich auch in den zur Zeit laufenden klinischen Studien wieder, in denen virale Vektoren mit über 70 % gegenüber nicht viralen Systemen den größeren Anteil ausmachen (Tab. 2).

virale Vektoren			nicht virale Vektore	n	
	Anzahl	%		Anzahl	%
Retroviren	217	34,1	Lipofektion	77	12,1
Adenoviren	171	26,9	nackte/ Plasmid DNA	70	11,0
Adeno-assoziierte Viren	15	2,4	RNA-Transfer	6	0,9
Vacciniaviren	39	6,1	Genbombardierung	5	0,8
Herpesviren	5	0,8	andere	25	3,9
andere Viren	6	0,9			28,7
		71,2			

The Journal of Gene Medicine 2002 (www.wiley.co.uk/genmed)

Tab. 2: Anteil viraler und nicht viraler Vektoren aktueller klinischer Studien

Das Einschleusen von Genen in Zellen durch virale Träger wird als **Transduktion** bezeichnet. Dabei wird zwischen Vektoren unterschieden, die sich von integrierenden (Retroviren, AAV) und nicht integrierenden Viren (Adenoviren, Vacciniaviren, Herpesviren) ableiten. In Tab. 3 sind einige Eigenschaften und Vorund Nachteile einzelner viraler Vektoren aufgelistet.

	Retro- viren	AAV	Adeno- viren	Vaccinia- viren	Herpes- viren	Autonome Parvoviren
Genom	RNA	ss DNA	ds DNA	ds DNA	ds DNA	ss DNA
Genomgröße	10 kB	4,7 kB	36 kB	187 kB	152 kB	5 kB
Fremdgen- kapazität	8 kB	4 kB	30 kB	25 kB	50 kB	0,8 - 4 kB
Titer	10 ⁷	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁸
Genom- integration	ja	ja/nein *	nein	nein	nein	nein
Transd. ruhen- der Zellen	nein **	ja (geringer)	ja	ja	ja	nein
Transd.dauer	lang	lang	kurz	kurz	kurz	kurz
Immunantwort - humoral - zellulär bestehende Immunität	gering gering kaum	stark gering ja	stark stark ja	stark stark möglich	stark stark ja	? ? nein
besondere Vorteile	stabile Genexpr.	onko- suppressiv	besonders effizient	lytisch	latent o. lytisch	onko- suppressiv
Sicherheits- risiken	Mutag., Pathog.	(Mutag.)*	Toxizität, Inflamm.	Toxizität, Inflamm.	Toxizität Inflamm.	keine bekannt

Tab. 3: Charakterisierung viraler Vektoren

* je nach Vektoraufbau; ** Lentiviren: ja;

Transd.: Transduktion; Genexpr.: Genexpression; Mutag.: Mutagenese; Pathog.: Pathogenität; Inflamm.: Inflammation. Zusammengestellt unter Verwendung von Roth *et al.* (1997), Marchisone *et al.* (2000), Kootstra & Verma (2003).

Alle in Tab. 3 besprochenen Viren eignen sich als Vektoren in der Krebstherapie. **Retroviren** (außer Lentiviren) zeigen eine selektive Replikation in proliferierenden Zellen und nach Deletion des Thymidinkinasegens auch **Vaccinia-** und **Herpesviren**. Bei E1A oder E1B deletierten **Adenoviren** (zum Beispiel ONYX-015) ist die Replikation auf Krebszellen mit defekter p53 oder pRB Signalkaskade (bei etwa 90 % aller Tumore) beschränkt (Mullen *et al.*, 2002; Hawkins *et al.*, 2002). **Adenoassoziierte-**Wildtyp-**Viren (AAV)** besitzen onkosuppressive Effekte (Bantel-Schaal, 2001).

Einige Viren besitzen bereits von Natur aus onkolytische Eigenschaften. Sie werden daher als **onkolytische Viren** bezeichnet. Der einzige Vertreter, der bereits in der ersten klinischen Phase getestet wird, ist das **Reovirus**. In präklinischer Erprobung befinden sich das **Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV)**, das **Newcastle Disease Virus** (NDV), Masernviren und Autonome Parvoviren.

2.2 Gentherapeutische Ansätze zur Krebsbekämpfung

In der Gentherapie von Krebs dominieren derzeit drei Ansätze: (i) die direkte Korrektur genetischer Defekte (zum Beispiel Mutationen) in Tumorzellen, (ii) die Verfolgung neuer Strategien für eine medikamentöse Therapie und (iii) die Verbesserung der Immuntherapie. In Tab. 4 ist ein Überblick der aktuellen gentherapeutischen Ansätze und ihre Relevanz für klinische Studien dargestellt. Die Methoden der verbesserten medikamentösen Therapie und der Immuntherapie zielen in der Regel auf eine aktive Zerstörung der Tumorzellen, während die Methode der Korrektur auf genetischer Ebene eine kausale Therapie der Ursachen darstellt.

(i)	Anteil & Ant	an klin. Studie n Cormick, 2001)
	Einschleusung von Tumor-Suppressorgenen	23 %
	 Inhibierung von Onkogenaktivitäten 	?
(ii)	Neue Strategien für eine medikamentöse Therapie	
	• Einschleusung eines Suizidgens (Suizidtherapie)	8 %
	• Einsatz eines onkolytischen Virus (Virotherapie)	?
	 Gezielte Hemmung der Tumorausbreitung durch Angiogene und Metalloproteinase-Inhibitoren (Antiangiogenese) 	se-?
	• Schutz normaler Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von Chemotherapeutika (Chemoprotektion)	8 %
(iii)	Verbesserung der Immuntherapie (Kap. I/3)	54 %
	Unspezifische Aktivierung des Immunsystems	
	 Steigerung der Tumorimmunogenität 	
	Tumorvakzinierung	

Tab. 4: Aktuelle gentherapeutische Ansätze zur Krebsbekämpfung und deren Anwendung in klinischen Studien

2.2.1 Korrektur genetischer Defekte in Tumorzellen

Tumorzellen weisen durch einen Funktionsverlust von Tumor-Suppressorgenen (zum Beispiel p53, p21) und/oder eine Überaktivität von tumorfördernden Onkogenen (zum Beispiel *ras*, *c-myc*, *bcl-2*) ein verändertes Erbgut gegenüber normalen Körperzellen auf. Das Ziel der sogenannten kausalen Therapie ist, diesen

genetischen Defekt zu beheben. Bei einer Hyperaktivität von **Onkogenen** kann die Genexpression durch Hemmung der Proteinsynthese oder entsprechender Transkriptionsfaktoren inhibiert werden. Diese Methode gilt als sehr vielversprechend, erfordert jedoch einen möglichst selektiven Gentransfer in den Tumor (Tamm *et al.*, 2001). Das Einschleusen eines **Tumor-Suppressorgens**, zum Beispiel p53, zeigte in klinischen Studien bereits starke antitumorale Effekte. Da dieses Gen in normalen Körperzellen ohnehin vorhanden ist, muss der Vektor dabei keine absolute Tumorselektivität aufweisen. Allerdings müssen für eine effiziente Therapie alle Tumorzellen getroffen werden. Dieses absolute Tumortargeting stellt nach wie vor die grundsätzliche Problematik der Gentherapie dar.

2.2.2 Neue Strategien für eine medikamentöse Therapie

Bei der **Suizidtherapie** werden Tumorzellen selektiv mit einem Suizidgen, zum Beispiel die Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-tk), transduziert und können anschließend einen systemisch verabreichten, untoxischen Prodrug-Arzneistoff, zum Beispiel Ganciclovir (Substrat) in ein toxisches Produkt metabolisieren, das die Tumorzelle zerstört. Durch das Absterben der Zellen werden Immunzellen angelockt und aktiviert, so dass auch gentherapeutisch nicht getroffene Tumorzellen abgetötet werden können (**immunologischer** *"Bystander"* Effekt). In klinischen Studien konnte bisher jedoch noch keine zufriedenstellende antitumorale Wirkung erzielt werden (McCormick, 2001).

Die Virotherapie stützt sich auf tumorselektive Viren mit onkolytischer Wirkung. Autonome Parvoviren, Reoviren, VSV, NDV und einige Masernviren sind bereits von Natur aus *in vitro* und *in vivo* für Tumorzellen selektiv, während andere Viren (Adeno-, Vaccinia- oder Herpesviren) erst dazu modifiziert werden müssen. Der optimale Kandidat für eine Virotherapie sollte eine selektive Replikation und lytische Eigenschaften in Tumorzellen aufweisen, für nicht entartete Zellen jedoch nicht pathogen sein (Hawkins *et al.*, 2002). Auch bei dieser Methode ist ein **immunologischer "Bystander" Effekt** zu erwarten.

Bei der Antiangiogenese-Therapie wird die Tumorausbreitung durch Hemmung der Gefäßneubildung oder des extrazellulären Matrixabbaus erschwert. Durch eine gentherapeutische Umsetzung, die ein selektives Tumor-*Targeting* und eine langfristige Proteinexpression gewährleistet, erhofft man sich eine angenehmere

8

Therapie mit effektiverer Wirkung als bei systemischer Gabe (Kerbel *et al.*, 2002; Egeblad *et al.*, 2002).

Bei der **Chemoprotektion** sollen die Zellen des hämatopoetischen Systems, die aufgrund ihrer stetigen Proliferation ähnliche Merkmale wie Tumorzellen aufweisen, vor den zytotoxischen Effekten einer Chemotherapie gezielt geschützt werden, indem ihnen Zytostatikaresistenzgene eingeschleust werden. Dadurch können höhere Dosen an Zytostatika ohne zusätzliche Nebenwirkungen eingesetzt werden (Wadhwa *et al.*, 2002).

Die kausale und zytotoxische Gentherapie von Krebs erfordert einen Vektor mit hoher Selektivität für die Tumorzellen. Dies stellt generell das größte Problem in der Gentherapie dar. Die meisten aktuellen gentherapeutischen Ansätze in der Krebsbehandlung zielen daher auf eine Immuntherapie, mit der auch Tumorzellen erreicht werden können, die sonst nicht getroffen werden würden.

3 Immuntherapie von Krebs

Bei Patienten mit Immunsuppression durch Infektionen oder Medikamente nach Organtransplantationen besteht ein 3 bis 4 mal höheres Risiko, an Krebs zu erkranken, als bei gesunden Menschen. Es ist sogar eine deutliche Tendenz für bestimmte Krebsarten wie zum Beispiel das Kasposi Sarkom oder Hautkrebs erkennbar (Penn, 2000). Dies deutet auf eine Korrelation von Krebs und Immundefekten. Krebszellen haben verschiedene Überlebensstrategien entwickelt, um einer zerstörenden Immunantwort zu entkommen:

Ein aktiver Schutzmechanismus ist die Blockierung wichtiger Funktionen der Immunabwehr durch die tumorale **Sekretion immunsuppressiver Zytokine** (Abb. 3, links), wie TGF-ß, IL-6, IL-10 oder VEGF, oder durch Expression des CD95 Liganden, der Lymphozyten letztlich in die Apoptose führt.

Häufig umgehen Krebszellen eine antitumorale Abwehr auch passiv, indem sie durch verschiedene Modifikationen für Immunzellen unkenntlich geworden sind oder **kein "danger" Signal** vermitteln. Durch (i) den Verlust tumoraler Antigene oder (ii) die Abnahme funktionstüchtiger MHC (*major histocompatibility complex*) Moleküle zur Antigenpräsentation können Krebszellen die direkte Erkennung durch zytotoxische T Zellen (CTLs) verhindern. Die tumorspezifische CTL-Aktivierung kann zudem (iii) durch eine verminderte Antigenprozessierung beeinträchtigt sein.

Wird bei der Antigenpräsentation kein *"danger"* Signal vermittelt, erhalten Tumorantigen-spezifische CTLs ein autoreaktives Signal und gehen in einen anergen Zustand über (Abb. 3, rechts). Die dadurch entstehende Tumortoleranz (*Crosstolerance*) wird auch dadurch begüngstigt, dass Krebszellen aus gesunden Körperzellen entstanden sind und den T-Zellen somit viele körpereigene *"self"* Antigene präsentiert werden. Die Chance der Tumorantigenerkennung vom körpereigenen Immunsystem wird durch das vom Tumor induzierte immunsuppressive Milieu zusätzlich verringert.



Abb. 3: Überlebensstrategien von Tumorzellen

Tumorzellen haben Strategien entwickelt, einer antitumoralen Immunantwort zu entkommen: Zum einen durch die Sekretion immunsupprimierender Zytokine (links) als Schutzschild (angedeutet durch die Wellenlinie), so dass bestimmte Immunantworten blockiert sind. Zum anderen nutzen sie die für eine starke Antitumorantwort benötigte *cross-presentation* von Antigenen für sich, indem sie durch Vermittlung eines dabei nicht *"danger"* Signals tumorgefährliche, für Tumorantigen (TAA) spezifische T-Zellen ausschalten und somit eine Tumortoleranz (*cross-tolerance*) induzieren. Die TAA-spezifischen T-Zellen gehen dabei in einen anergen Zustand über und bleiben für den Rest ihres Daseins blockiert.

Insgesamt wird die Toleranz gegenüber den *"self"* oder *"non-dangerous"* Tumorantigenen als Hauptgrund des Versagens der immunologischen Krebsabwehr angesehen, da bereits mehrere Tumor-assoziierten Antigene (TAAs) nachgewiesen werden konnten und eine Tumorerkennung daher grundsätzlich möglich sein sollte (Espinoza-Delgado, 2002; Perales *et al.*, 2002). Mit der Immuntherapie sollen genau diese Immundefekte bewältigt werden. Es gibt verschiedene Ansätze, die dem Immunsystem helfen sollen, Krebszellen als *"non-self"* und *"dangerous"* zu erkennen: (i) die unspezifische Aktivierung des Immunsystems, (ii) die Steigerung der Tumorimmunogenität und (iii) die Impfung mit TAAs, auch Tumorvakzinierung genannt.

3.1 Unspezifische Aktivierung des Immunsystems

Eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems kann mit Zytokinen erreicht werden. **Zytokine** sind körpereigene Peptide mit proinflammatorischen, immunregulatorischen, wachstumsregulierenden oder anderen steuernden Funktionen, die von aktivierten T-Zellen oder anderen Zellen während der natürlichen oder spezifischen Immunantwort freigesetzt werden. Während der Immunabwehr kommt ihnen große Bedeutung durch die Vermittlung der Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen zu. Eine besondere Rolle in der Krebsimmunologie spielen die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IFN- α , IFN- γ , GM-CSF und TNF- α (Chyczewska *et al.*, 1997). In Tab. 5 sind die natürliche Freisetzung und wichtige Funktionen einiger krebsrelevanter Zytokine zusammengefasst.

Zytokin	Freisetzung	Funktion
IL-2	aktivierte T	Proliferation/Aktivierung von CTL/Th/NK/(B)
IL-4	aktivierte Th	humorale Immunantwort (Th2); APC Differenzierung
IL-6	T-Zellen, M Φ	Inflammatorisches Zytokin
IL-7	Stromazellen	Proliferation von lymphoiden Stammzellen; Differenzierung von B/T-Zellen
IL-12	APC	Aktivierung von NK/LAK/CTL/Th1
IL-18	Makrophagen (M Φ)	Proliferation/Aktivierung von CTL/Th1/NK/B
IFN-α	Leukozyten	Proliferationshemmung (Tumor), Aktivierung LAK
IFN-γ	T-Zellen	Aktivierung von NK und Makrophagen
GM-CSF	T-Zellen	APC Differenzierung und Reifung
$TNF extsf{-}lpha$	MΦ	Proliferation/Aktivierung von LAK, Makrophagen Apoptose unterstützend (Hemmung von <i>bcl-</i> 2)

Tab.5: Freisetzende Zellen und Funktionen krebsrelevanter Zytokine

Antitumorale Zytokine sind in der Regel in die T- oder NK-Zellproliferation und Aktivierung (IL-2, IL-12), oder in die Stimulierung Antigenpräsentierender Zellen (APCs) involviert. Als das wirksamste antitumorale Zytokin erwies sich GM-CSF, das die Differenzierung von Dendritischen Zellen (DC) kontrolliert. Dadurch wird deutlich, dass die Antigenpräsentation durch DC an T-Zellen in der Tumorbekämpfung eine bedeutende Rolle spielt und bei Krebs wahrscheinlich unterdrückt ist (O´Donnell *et al.*, 1999).

DC erlangen deshalb in der Tumortherapie eine immer größere Bedeutung. Tumorzellen exprimieren TAAs, die den CD8+ T-Zellen direkt über MHC-I präsentiert werden könnten (direktes Priming). Allerdings konnte in vivo keine MHC-Klasse I bezogene Antigenpräsentation vom Tumor selbst nachgewiesen werden, während ein Antigentransfer auf APC erfolgreich stattgefunden hatte (Huang et al., 1994). DC nehmen unter den APC eine Sonderrolle ein, da sie befähigt sind, in der Peripherie viele Antigene aufzunehmen und nach Migration in lymphatische Organe naive T-Zellen zu aktivieren. Sie können exogene Antigene, die üblicherweise über MHC-Klasse II präsentiert werden, auch effizient über MHC-Klasse I prozessieren (cross-presentation), wenn durch Zelltod oder Apoptose (zum Beispiel durch Virusinfektion induziert), nicht jedoch bei Nekrose, ein Gefahrensignal vermittelt wird (Shedlock et al., 2000). Durch die MHC-Klasse I Antigenpräsentation können naive CD8+ T-Zellen (CTL-Vorläufer) ohne zwingende Mitwirkung von CD4+ Helfer-T-Zellen direkt stimuliert werden (cross-priming) (Wolkers et al., 2001). Chemokine, die DC anlocken können, wie zum Beispiel MDC (Macrophage-derived chemokine) gewinnen deshalb in der Krebstherapie an Attraktivität. Durch eine proinflammatorische Umgebung kann das cross-priming gefördert werden.

Um die antitumorale Wirkung zu erhöhen, können Zytokine verschiedener Wirkungsmechanismen kombiniert werden, zum Beispiel Chemokine zur Anlockung und Zytokine zur Aktivierung von Effektorzellen. Bei einigen **Zytokin-Kombinationen** (IL-2/IL-12; IL-12/TNF- α ; GM-CSF/IL-6) konnte in der Tat eine stärkere Wirkung als bei einer Einzeltherapie des jeweiligen Zytokins beobachtet werden (Addison *et al.*, 1998; Lasek *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2001).

12

3.1.1 Immunmodulation

Die immunstimulierenden Proteine können entweder direkt appliziert oder ihre Gene mit gentherapeutischen Mitteln in das Tumorgewebe eingeschleust werden. Die direkte Injektion wird **Immunmodulation** genannt und kann systemisch oder lokal erfolgen. Ein Vorteil der systemischen gegenüber der lokalen Administration ist die potentiell bessere Erreichbarkeit schwer therapierbarer Metastasen. Klinische Studien mit systemischer Applikation von IL-2 zeigen im Durchschnitt eine Ansprechrate von etwa 20 % bei einer Lanzgzeitremission von 3 %. Allerdings sind hohe Zytokindosen nötig, die teilweise schwere toxische Nebenwirkungen verursachen. Daher sollte der sytemischen eine Therapie mit lokaler Zytokinapplikation vorgezogen werden (Parmiani *et al.*, 2000; Heinzer *et al.*, 1999).

3.1.2 Zytokin-orientierte Gentherapie

Eine möglichst selektive Zytokinanreicherung im Tumor kann durch einen gentherapeutischen Transfer bewerkstelligt werden. Dadurch wäre auch eine zur besseren Wirksamkeit höhere lokale Zytokindosis ohne größere Nebenwirkungen gut verträglich. Als Vektoren eignen sich besonders tumorselektive Systeme, zum Beispiel onkotrope Viren. Haben diese Viren zudem die Eigenschaft, Zellen zu lysieren, wie zum Beispiel Parvoviren, wird das Immunsystem durch einen "Bystander" Effekt zusätzlich aktiviert: inflammatorische Botenstoffe werden freigesetzt und DC phagozytieren apoptotische Tumorfragmente, wobei das crosspriming gefördert wird.

Bei der **adoptiven Immuntherapie** werden Immunzellen mit spezifischer Anti-Tumoraktivität *in vitro* expandiert und rücktransferiert. IL-2 stimulierte Lymphozyten des Blutes, sogenannte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) gehen hauptsächlich aus NK-Zellen hervor und zeichnen sich daher durch ein unspezifisches Abtöten von Zellen aus. Im Gegensatz dazu weisen IL-2 stimulierte tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) des Tumorstromas eine gezielte Anreicherung im Tumorgewebe und erhöhte tumorzytotoxische Effekte auf (Heiss *et al.*, 2001).

3.2 Steigerung der Tumorimmunogenität

Der entgegengesetzte Ansatz zur Aktivierung des Immunsystems ist die Steigerung der Immunogenität des Tumors, die auch zu einer besseren Tumorerkennung durch CTLs führen soll. **Tumorzellen** werden dabei forciert, Zytokine oder Hitzeschockproteine (HSP) zu sezernieren, die eine lokale Inflammation hervorrufen. Transduzierte co-stimulierende Moleküle (B7, MHC) für die Antigenpräsentation können die Tumorimmunogenität direkt erhöhen und ein **direktes** *priming* fördern. In klinischen Versuchen konnten mit diesem Therapieansatz effektive antitumorale Wirkungen nachgewiesen werden (Marchisone, 2000; Bodey *et al.*, 2000).

3.3 Tumorvakzinierung

Im Prinzip stellen alle bisher beschriebenen immuntherapeutischen Methoden eine Art Tumorvakzinierung dar. Unter der Tumorvakzinierung im engeren Sinn versteht man jedoch die direkte Stimulierung gegen **tumorspezifische Antigene**, den TAAs. Als Vakzine kommen bestrahlte Tumorzellen, Immunzellen, reine DNA oder Viren in Frage.

Bei der **Tumorzellvakzinierung** werden modifizierte, autologe oder allogene Tumorzellen vor ihrer Reimplantation mit einer inaktivierenden Dosis bestrahlt und eventuell mit immunstimulierenden Adjuvantien versetzt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass insbesondere bei autologen Tumorzellen alle relevanten Tumorantigene präsentiert werden können, ohne dass die Antigenstruktur bekannt sein muss. Ein Nachteil ist die Präsentation von *"self"* Antigenen, die zu verstärkter Tumortoleranz oder umgekehrt zu einer Aktivierung einer Autoimmunität führen kann (Espinoza-Delgado, 2002).

Zur Vakzinierung mit DC werden selbige oder andere APCs mit Tumorantigenen mittels Gentransfektion, Peptid-/Proteintransfer oder Fusion mit ganzen Tumorzellen beladen. Diese Antigene können den T-Zellen im Gegensatz zu phagozytierten Antigenen sowohl über MHC–Klasse I als auch MHC–Klasse II präsentiert werden (Shedlock *et al.*, 2000). DC-Vakzine sind aufgrund ihrer Fähigkeiten zur Co-Stimulierung, *cross-presentation* und *cross-priming* die vielversprechendsten Kandidaten. Bei Fusionierungen von DC mit Tumorzellen ist die beste TAA-Quelle mit einer optimalen Antigenpräsentation vereint (Espinoza-Delgado, 2002).

Bei der Vakzinierung mit DNA wird eine TAA-kodierende Plasmid DNA mit der *gene-gun* Methode in die Haut appliziert, von dort angesiedelten DC (unter

14

anderem Langerhans Zellen) phagozytiert und eine humorale und zelluläre Immunantwort ausgelöst. DC spielen damit wieder die zentrale Rolle. (Shedlock *et al.*, 2000).

Vakzinierung mit Viren: Bei Krebsarten, die mit einer viralen Infektion assoziiert sind, wie zum Beispiel das Zervixkarzinom und HPV (Humanes Papillomvirus), ist eine präventive Impfung mit stark immunogenen, leeren Viruspartikeln, sogenannten VLPs (*virus-like particles*), möglich, die im Körper eine protektive Immunantwort generieren (Gissmann, 2001). Bei bereits etablierten Tumoren eignen sich TAA-kodierende rekombinante Viren, die DC oder deren benachbarte Zellen infizieren können. Die Verwendung eines immunogenen Virus, wie zum Beispiel das Vacciniavirus, fördert die antitumorale Wirksamkeit durch Stimulierung des gesamten Immunsystems (Schutz *et al.*, 2001).

In der Abb. 4 sind die wichtigen immuntherapeutischen Strategien, die Aktivierung des Immunsystems (3.1), die Steigerung der Tumorimmunogenität (3.2) und die Tumorvakzinierung (3.3) in einem vereinfachten Wirkungsmodell dargestellt.



Aktivierung des Immunsystems

Abb. 4: Immuntherapeutische Strategien und ihre Angriffspunkte

Die Steigerung der Tumorimmunogenität (links) fördert das *direkte priming* spezifischer T-Zellen, die sofort zu aktiven Killerzellen proliferieren. Bei der Tumorvakzinierung (rechts), bei der die TAAs und die DC die wichtigste Rolle spielen, wird vor allem die *cross-presentation* und das *cross-priming* gefördert. Dafür ist ein "danger" Signal erforderlich. Die *geprimte* TAA-spezifische T-Zelle proliferiert zu zytotoxischen Killerzellen. Eine Aktivierung des Immunsystems kann vielerlei Ansätze besitzen.

4 Autonome Parvoviren als gentherapeutische Vektoren bei Krebs

Parvoviren, kleine (lat. *parvus*) einzelsträngige DNA-Viren ohne Virushülle, wurden erstmals in den 60er Jahren in Tumorgewebe entdeckt und daher zunächst als onkogen eingestuft. Sehr bald stellte sich jedoch heraus, dass Parvoviren den gegenteiligen Effekt aufweisen und in der Lage sind, Entstehung und Wachstum von Tumoren zu verhindern, was als **onkosuppressiver Effekt** bezeichnet wird (Toolan *et al.*, 1968). Ihr spezifisches Vorkommen in neoplastischen Zellen ist mit dem parvoviralen Lebenszyklus zu erklären, der von zellulären Faktoren abhängt, die insbesondere in Tumorzellen gewährleistet sind. Diese parvovirale Eigenschaft kann als **Onkotropismus** angesehen werden (Rommelaere & Cornelis, 1991).

Der onkotrope und onkosuppressive Charakter der Parvoviren macht diese für die Nutzung als gentherapeutische Vektoren bei Krebs interessant. Die bevorzugte Expression parvoviraler Gene in transformierten Zellen ermöglicht somit einen zielgerichteten Gentransfer in Krebszellen. Ein weiterer Vorteil der Parvoviren ist dabei ihre geringe Pathogenität in normalen und der ausgeprägte zytopathische Effekt in transformierten Zellen (Cornelis, *et al.*, 1988; Dupressoir, *et al.*, 1989).

4.1 Taxonomie der Autonomen Parvoviren

Autonome Parvoviren gehören den *Parvovirinae* (Parvoviren der Vertebraten) der Familie der *Parvoviridae* an. Zu den *Parvovirinae* zählen auch die Helfervirusabhängigen Dependoviren, die für ihren Infektionszyklus zum Beispiel Adeno- oder Herpesviren benötigen oder sich sonst in das Wirtszellgenom integrieren (Berns, 1996). Vertreter dieser Gruppe sind die Adeno-assoziierten Viren (AAV). Autonome Parvoviren können sich dagegen ohne Helferviren selbständig replizieren. Eine Integration autonomer Parvoviren in das Wirtszellgenom konnte bisher nicht festgestellt werden (Richards *et al.*, 1979).

Die Gattung der **Erythroviren** zeichnet sich durch einen ausgeprägten Tropismus für erythroide Vorläuferzellen aus. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist B19, das als einziger Virus der Parvoviridae als humanpathogen gilt. Bei Infektion im Menschen, vor allem bei Kindern, kann es Ringelröteln (Erythema infectiosum) oder verschiedene hämatologische Funktionsstörungen auslösen (Kishore *et al.*, 2000). Die Gattung der **Parvoviren** (PV) kann anhand ihres Wirtsspektrums und Kapsidstruktur in mehrere Untergruppen eingeteilt werden (Cotmore *et al.*, 1987). Dazu zählen unter anderem die Nagerviren MVM (*Minute Virus of Mice*), MPV (*Mouse PV*), H1, RV (beides Rattenviren), KRV (*Kilham Rat PV*) und LuIII (unbekannte Herkunft), das Hundevirus CPV (*Canine PV*), das Katzenvirus FPV (*Feline PV*), das Rindervirus BPV (*Bovine PV*), das Nerzvirus ADV (*Aleutian Mink Disease Virus*) und das Schweinevirus PPV (*Porcine* PV).

Für gentherapeutische Zwecke werden vor allem die beiden nah verwandten autonomen Parvoviren MVMp und H1 in Betracht gezogen. Da sich diese Arbeit insbesondere auf MVMp stützte, soll im weiteren näher auf dieses Virus eingegangen werden.

Das **Rattenvirus H1** kann neben Hamsterzellen auch menschliche Zellen infizieren und stellt aufgrund seiner Apathogenität im Menschen und den bereits erwähnten Vorzügen (Onkosuppression, Onkolyse) eine vielversprechende Basis für einen gentherapeutischen Vektor dar (Rommelaere *et al.*, 2001).

MVMp, der fast apathogene <u>P</u>rototyp von MVM, ist vor allem für Fibroblasten infektiös, das nah verwandte Virus **MVMi**, der <u>i</u>mmunsuppressive MVM Typ, dagegen für Zellen des hämatopoetischen Systems (Kimsey *et al.*, 1986; Segovia *et al.*, 1991). Damit zeigen beide MVM-Stämme trotz ihrer nahen Verwandtschaft (nur 175 Nukleotide sind verschieden; Sahli *et al.*, 1985) einen unterschiedlichen Tropismus. Als Ursache dafür wurde die Involvierung der parvoviralen Proteine VP2 und NS1 diskutiert (Maxwell *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 2001). MVMp ist das am besten charakterisierte Parvovirus. Es wird daher bereits in präklinischen Studien, die in der Regel im Mausmodell stattfinden, eingesetzt.

4.2 Aufbau der Viruspartikel

Die parvoviralen Viruspartikel besitzen ein aus 60 Kapsidproteinen bestehendes, hüllenloses, ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 18-26 nm (Abb. 5), das ein einzelsträngiges DNA-Genom aus etwa 5149 nt (MVMp) bzw. 5176 nt (H1)
enthält (Siegl *et al.*, 1985; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998). Das **Kapsid** setzt sich aus den Strukturproteinen VP1 (83 kDa), VP2 (64 kDa) und VP3 (61 kDa) zusammen, wobei VP2 bei einem Verhältnis von 5:1 zu VP1 den Hauptanteil des Kapsids bestimmt. Für infektiöse Viruskapside werden sowohl VP1 als auch VP2 Kapsidproteine benötigt (Tullis *et al.*, 1993). In einem späten Stadium der Infektion entsteht VP3 durch proteolytische Spaltung aus VP2 (Tattersall *et al.*, 1976; Santaren *et al.*1993). An der Außenseite der infektiösen Viruspartikel ist



Abb. 5: Struktur des MVMp Parvovirus mit fiktivem Kapsid (Agbandje-McKenna, University of Florida)

jeweils ein NS1-Molekül lokalisiert, das wahrscheinlich erst nach Infektion einer neuen Wirtszelle abgespalten wird (Cotmore *et al.*, 1989).

Das parvovirale **Genom**, einzelsträngige DNA meist negativer Polarität (d.h. komplementär zu den Transkripten), wird auf beiden Seiten von zwei Palindromen abgegrenzt. Durch die komplementäre Sequenz biegt sich das Genomende wie eine Haarnadel zurück (Abb. 6). Die Palindrome enthalten *cis*-aktive Sequenzen, die zur Replikation und Verpackung der DNA benötigt werden (Astell *et al.*, 1996).



Abb. 6: Schematische Darstellung der Genomorganisation autonomer Nagerparvoviren

Das einzelsträngige Genom wird auf beiden Seiten von palindromischen Sequenzen flankiert. Unterhalb des Genoms sind seine Translationsprodukte (mRNAs) angeführt. Der jeweilige Transkriptionsstart der beiden Promotoren P4 und P38 ist durch eine Flagge gekennzeichnet. Die NS und VP kodierenden Bereiche in den drei Leserahmen sind durch farblich markierte Rechtecke (dem jeweiligen Leserahmen entsprechend) gekennzeichnet. Die RNA Introns und Palindrome entsprechen nicht genau der Skala.

Die parvovirale Genexpression wird durch die beiden Promotoren P4 (für NS1 und NS2) und P38 (für VP1 und VP2) gesteuert. Die Aktivität des P4 Promotors, der die Expression der Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2 reguliert, ist streng S-Phase

abhängig (Deleu *et al.*, 1999). Durch Onkogene kann er zusätzlich stimuliert werden. Dadurch lassen sich die teilweise hohen Produktionen an NS1 Protein in transformierten gegenüber nicht transformierten Zellen erklären (Rommelaere *et* al., 2001). Der Promotor P38 wird durch NS1 transaktiviert (Doerig *et al.*, 1988). Bevor also Kapside produziert werden können, die für eine Virusproduktion benötigt werden, muss zunächst NS1 synthetisiert werden, was wiederum vom Zellzyklus des Wirts abhängt. Somit ist die Transkription gut kontrolliert.

4.3 Parvoviraler Lebenszyklus

Es wird angenommen, dass die Parvoviren (MVMp) an einen sialylsäurehaltigen Membran-assoziierten Rezeptor binden, der für die Nagerparvoviren noch unbekannt ist, und anschließend über einen endosomalen Transport in die Zelle aufgenommen werden (Parker et al., 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Kompartimente des späten Endosoms und das Proteasom für die Infektion des MVMp Virus benötigt werden. Möglicherweise spielt der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg eine wichtige Rolle für die Dekapsidierung eintretender Viren oder für die nukleäre Translokalisation des viralen Genoms (Ros et al., 2002). Diese Beobachtungen stehen größtenteils im Einklang mit Kenntnissen über den Infektionszyklus anderer Parvoviren. Für viele Parvoviren konnte bisher ein membranständiger Rezeptor identifiziert werden: der Transferrinrezeptor für CPV und FPV (Hund und Katze), ein Glycolipid für B19 Parvovirus, ein sialysiertes Glycoprotein an Erytrozytenmembranen für BPV, und ein Heparansulfat-Proteoglycan- oder sialylsäurehaltiger Rezeptor für AAV. Eine Kompartiment-Azidifizierung, sowie ein Mikrotubulus-abhängiger Transport sind auch bei der CPV und AAV Infektion als essentiell zu betrachten (Ros et al., 2002).

Aus dem perinukleären Bereich gelangt die virale DNA in den Nukleus, während die Kapside im Zytoplasma zurückzubleiben scheinen (Zadori *et al.*, 2001). Im Nukleus wird die einzelsträngige DNA zu einem Doppelstrang konvertiert. Dieser Schritt ist zumindest bei MVMp von dem S-Phase-spezifischen Faktor *cyclin A* (in Assoziation mit der Kinase cdk2) abhängig (Bashir *et al.*, 2000). Die Konversion stellt die Vorstufe für die virale Transkription und Genomamplifikation dar. Sie ist auch der einzige Schritt, der nur von zellulären Faktoren ohne Mithilfe des viralen Genoms oder viraler Proteine abhängt. Autonome Parvoviren sind zudem nicht in der Lage,

die dabei benötigte S-Phase zu induzieren und können daher nur proliferierende Zellen infizieren (Cotmore *et al.*, 1987). Dies stellt einen zusätzlichen Sicherheitsfaktor bei einer gentherapeutischen Anwendung der autonomen Parvoviren dar, da normale, ruhende Körperzellen unbeschädigt bleiben. In den meisten permissiven Zellen bewirkt eine parvovirale Infektion die Lyse der Zelle. Der genaue Mechanismus dabei ist nicht bekannt. Eine Schlüsselrolle spielt jedoch das virale Protein NS1 (Rayet *et al.*, 1998). In Abb. 7 ist der parvovirale Infektionszyklus schematisch dargestellt.



Abb. 7: Der lytische Infektionszyklus autonomer Parvoviren

4.4 Parvovirale DNA-Replikation

Die parvovirale DNA-Replikation (Abb. 8) erfolgt im Nukleus infizierter Zellen durch einen modifizierten rollenden Haarnadelmechanismus (*rolling hairpin mechanism*; Astell *et al.*, 1985). Dabei sind die terminalen Palindrome und internen Replikationssequenzen am 5' Ende von Bedeutung (Cotmore *et al.*, 1994; Brunstein *et al.*, 1997). Die einzelsträngige *input*-DNA muss zunächst in einem S-Phase-



Abb. 8: Vereinfachte Darstellung der parvoviralen Replikation nach dem rollenden Haarnadelmechanismus

abhängigen Schritt zu einem Doppelstrang (monomere Form) konvertiert werden (Konversion, Schritt 1). Das linke Palindrom (am 3' Ende) fungiert dabei als *Primer* für die zelleigene Polymerase. Die monomere doppelsträngige DNA dient als Matrize für die virale mRNA-Synthese, so dass die frühen viralen Gene NS1 und NS2 synthetisiert werden und für die weiteren Replikationsschritte, für die NS1 essentiell ist, zur Verfügung stehen können (Rommelaere & Cornelis, 1991).

Durch eine fortschreitende Einzelstrang-Verdrängungssynthese entsteht aus der monomeren Form eine dimere Form. Das rechte Palindrom am 5' Ende wird dabei zunächst aufgerollt (Schritt 2) und als Matrize für die Neustrangsynthese verwendet. Unter Mitwirkung von NS1 wird es schließlich wieder zur ursprünglichen Form rearrangiert (**Rekonfiguration**, Schritt 3). Die neugebildete Haarnadel dient nun wieder als Matrize zur Strangsynthese bis eine **dimere Form** entsteht (Schritt 4). Durch kontinuierliche Replikation kann sich diese auch zu tetrameren oder höheren Formen fortsetzen (Cotmore *et al.*, 1995).

Die Palindrome, die die Dimerbrücke bilden, können über eine kreuzförmige Struktur wieder in ihre palindromische Form rekonfiguriert werden. Durch eine NS1-abhängige, strang- und sequenzspezifische Spaltung kommt es zur Auflösung der Brückenbildung und Teilung des Komplexes in zwei Moleküle (**Resolution**, Schritt 5; Cotmore *et al.*, 1994). Das eine Genom wird im Zyklus wieder verwendet, das andere dient als Matrize zur Verpackung einzelsträngiger DNA in leere Kapside. Das Kapsid bindet an das 3'-Palindrom und durch fortlaufende Replikation wird die einzelsträngige DNA in Form einer Verdrängungssynthese in die Kapsel geschoben (**Verpackung**, Schritt 6; Willwand et *al.*, 1991; Hardt *et al.*, 1983).

Nach parvoviraler Infektion kann ein längerer Verbleib der Zelle in der S-Phase bei gleichzeitig stark beeinträchtigter zellulärer DNA-Synthese beobachtet werden (Hardt *et al.*, 1983). Beide Effekte begünstigen die parvovirale DNA Replikation und die Bildung von Nachkommenviren.

4.5 Parvovirale Proteine

NS1 ist ein multifunktionelles Phosphoprotein (83 kDa) mit einer Kernlokalisationssequenz (Cotmore & Tattersall, 1986; Nüesch & Tattersall, 1993). Verschiedene Funktionen des NS1 sind essentiell für die virale Replikation und Transkription. Es besitzt Aktivitäten als Helikase, ATPase und sequenzspezifische Endonuklease und kann sich spezifisch an Sequenzen im viralen Genom binden (Wilson *et al.*, 1991; Nüesch *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1997). NS1 fungiert als Transaktivator des P38 Promotors und stimuliert somit die Synthese der Kapsidproteine (Rhode *et al.*, 1985). Zusätzlich können auch zelluläre Promotoren aktiviert werden (Vanacker *et al.*, 1996). NS1 spielt außerdem eine bedeutende Rolle bei der Virus-vermittelten Zytotoxizität (Rayet *et al.*, 1999; Legendre *et al.*, 1992; Li & Rhode, 1990).

NS2 liegt aufgrund unterschiedlichen *Splicings* in drei verschiedenen phosphorylierten oder nicht phosphorylierten Isoformen vor, die alle hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert sind und sich in ihrer Funktion nicht erkennbar unterscheiden (Cotmore & Tattersall, 1990). Die Funktionen des 25 kDa großen NS2 sind weniger gut untersucht. Bekannt sind eine Beteiligung des Proteins bei der DNA-Replikation, Proteinexpression, dem Aufbau neuer Kapside und der Freisetzung von neu produzierten Viren (Naeger *et al.*, 1993; Cotmore *et al.*, 1997; Eichwald *et al.*, 2002). Somit ist NS2 essentiell für eine produktive Infektion.

Die **Strukturproteine VP1** und **VP2** besitzen eine Kernlokalisationssequenz und werden im Nukleus zum Viruskapsid assoziiert. VP2 ist für die Kapsidierung neu synthetisierter Virus DNA verantwortlich, VP1 wird allerdings für die Infektiösität benötigt (Tullis *et al.*, 1993). Erst während der Infektion, nach dem Zelleintritt, werden in permissiven Zellen VP1-spezifische Epitope nach außen präsentiert und initiieren somit den Transfer des viralen Genoms in den Zellkern (Cotmore *et al.*, 1999; Lombardo *et al.*, 2002). Der Zelltropismus wird eher durch VP2 bestimmt (Maxwell *et al.*, 1995; Lombardo *et al.*, 2002).

4.6 Herstellung rekombinanter Parvoviren

Allein die Tatsache, dass Parvoviren aus Tumorgewebe isoliert wurden, zeigt, dass die natürlichen Viren dem Anspruch einer effektiven Krebsbekämpfung nicht genügen. Durch die Konstruktion rekombinanter Derivate kann jedoch, unter Beibehaltung des Onkotropismus und der onkosuppressiven Eigenschaften der Wildtyp Viren, eine stärkere antitumorale Aktivität erzielt werden.

Da die Vektorproduktion bei einer Verlängerung des Genoms um mehr als 5 % ineffizient wird, muss das Transgen im Austausch gegen einen Teil des viralen Genoms integriert werden (Kestler *et al.*, 1999). Durch eine Deletion im VP-kodierenden Bereich ist es möglich, alle für die Regulation von DNA-Replikation und Genexpression benötigten Sequenzen zu bewahren. Dadurch bleiben diesen Vektoren auch der Onkotropsimus, der hauptsächlich durch den Onkogen- und Zellzyklus-abhängigen P4 Promotor determiniert wird, und die NS1-induzierte Onkolyse erhalten (Kestler *et al.*, 1999). Akzeptable Virustiter und eine hohe und für Tumorzellen präferenzielle Transgenexpression und Vektoramplifikation konnten bereits bestätigt werden (Dupont *et al.*, 2000; Haag *et al.*, 2000; Kestler *et al.*, 1999). In Abb. 9 ist der Vektoraufbau der rekombinanten Parvoviren am Beispiel des MVMp Virus schematisch dargestellt.



Abb. 9: Schematische Darstellung rekombinanter MVMp Vektoren

In der VP-kodierenden Sequenz wurde durch eine Deletion von 800 nt (für MVMp die Nukleotide 2788 bis 3636) Platz für ein Transgen geschaffen. Eine multiple Klonierungsstelle am VP2-Translationsinitiationskodon (nicht eingezeichnet) erleichtert die Klonierung des Transgens in den "leeren" Vektor. Die replizierenden und P38-transaktivierenden Aktivitäten des NS1 Proteins sind durch Pfeile markiert.

Durch die Deletion der VP-kodierenden Gene sind die rekombinanten Viren nicht mehr zur Neuproduktion von Nachkommenviren befähigt. Es ist daher nur eine transiente Transgenexpression zu erwarten. Zur Virusproduktion muss neben dem viralen Plasmid ein VP-kodierendes Helferplasmid zugefügt werden, um die Verpackung der rekombinanten Viren zu gewährleisten. Durch Rekombination zwischen homologen Genom- und VP- Sequenzen können daher replikationsfähige Revertanten entstehen, die bei einer gentherapeutischen Anwendung ein potentielles Risiko darstellen. Durch Senkung der Homologie konnte die Wildtypkontamination jedoch stark reduziert werden (Wrzesinski *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2000).

4.7 Therapieverstärkende Transgene

In die entwickelten parvoviralen Vektoren können Gene der verschiedensten krebstherapeutischen Ansätze (siehe Kap. 2.2) als Transgene eingebaut werden, sofern sie die Vektorkapazität nicht überschreiten. In dieser Arbeit wurden die Gene des Zytokins IL-2 (*Interleukin 2*) und der Chemokine MDC (*Macrophage-derived chemokine*) und IP-10 (*IFN-\gamma-inducible protein 10*) zur Aktivierung des Immunsystems verwendet.

IL-2. Das Zytokin IL-2 fördert die klonale Expansion aktivierter T-Zellen und stimuliert in selbigen die Synthese anderer Zytokine, darunter IFN- γ und IL-4. Ferner unterstützt es die Proliferation von B- und NK-Zellen, die Antikörpersekretion und die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen. Es wurde auch eine verstärkende

Wirkung auf das Wachstum und die Zytotoxizität von Monozyten beschrieben. Bei hohen systemischen IL-2 Spiegeln können toxische Effekte beobachtet werden, unter anderem Hypotension und hepatische Dysfunktion (Gaffen *et al.*, 1998). IL-2 besitzt ausgeprägte antitumorale Effekte (Parmiani *et al.*, 1997).

MDC. Das erst kürzlich identifizierte CC-Chemokin MDC ist ein Chemoattraktant für unreife DCs, Typ II-polarisierte T-Zellen, Monozyten und aktivierte NK-Zellen. Da eine sehr ausgeprägte Anlockung der DCs nachgewiesen werden konnte, wird eine Anwendung dieses Chemokins in der Tumortherapie diskutiert (Mantovani *et al.*, 2000). Vor kurzem wurde zum ersten Mal ein antitumoraler Effekt des MDC beschrieben (Guo *et al.*, 2002).

IP-10. Das CXC-Chemokin IP-10 wird durch IFN- γ stark induziert und bewirkt die Chemotaxis aktivierter T-Zellen. Es wird auch eine Verstärkung der Migration und Zytotoxizität von NK-Zellen diskutiert (Neville *et al.*, 1997). Zusätzlich besitzt es antiangiogenetische Eigenschaften und ist daher für die Krebstherapie von besonderem Interesse. In präklinischen Versuchen konnte bereits eine antitumorale Aktivität des IP-10 nachgewiesen werden (Luster *et al.*, 1993), unter anderem auch durch einen parvoviralen Gentransfer (Giese *et al.*, 2002). IP-10 scheint ferner eine essentielle Rolle bei der Generierung einer protektiven Tumorimmunität zu spielen (Pertl *et al.*, 2001).

5 Zielsetzung der Arbeit

Rekombinante autonome Parvoviren sind eine vielversprechende Alternative zu verschiedenen anderen viralen Vektoren in der Tumor-Gentherapie. Die genaue Analyse dieser Vektoren stellt eine herausfordernde Aufgabe dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die funktionelle **Charakterisierung rekombinanter parvoviraler Vektoren** *in vitro* im Hinblick auf einen Einsatz in der Gentherapie. Dazu sollte die Übereinstimmung rekombinanter und Wildtyp Viren bezüglich ihrer Stabilität und einiger Schritte des viralen Lebenszyklus, im einzelnen die Virusabsorption, Replikation, Genexpression und Zytotoxizität, untersucht werden.

Ein zweites Ziel lag in der **Bewertung der Effizienz gentherapeutischer Versuche mit Parvoviren** *in vivo*. Dafür wurden sowohl die durch Parvoviren induzierte Immunantwort, als auch antitumorale Effekte rekombinanter Parvoviren analysiert.

Zur Analyse der Immunantwort wurden als erste Orientierung Wildtyp Viren eingesetzt, da diese aufgrund ihrer Replikationsfähigkeiten eine stärkere und damit besser zu untersuchende Immunreaktion als rekombinante Viren auslösen. Als Modell wurden dazu die gut charakterisierten C57Bl/6 Mäuse verwendet. Bei der humoralen Immunantwort sollte zum einen untersucht werden, welches Antikörperprofil durch die Viren induziert wurde, und zum anderen, ob entwickelte antivirale Antikörper eine Virus neutralisierende Aktivität aufweisen und ob dies eine Konsequenz für eine in der Gentherapie benötigte wiederholte Virusgabe hätte. Für die zelluläre Immunantwort war von Bedeutung, welche viralen Proteine immunogen wirken und ob diese eine spezifische CTL Antwort hervorrufen.

Zur **Untersuchung antitumoraler Effekte** wurden drei verschiedene rekombinante Parvoviren verwendet, die in Zielzellen ein immunologisch wirksames Zytokingen zur Expression bringen können: MVMp/IL-2, MVMp/MDC und MVMp/IP-10. Das gut studierte Transgen IL-2 sollte dabei als positive Kontrolle dienen, während das Hauptinteresse auf der antitumoralen Aktivität des relativ unbekannten Chemokins MDC und dessen Kombination mit transduziertem IL-2 lag. Als weitere Kombinationsgruppe sollten IL-2 und IP-10 transduzierende rekombinante Viren getestet werden. Die Idee dabei war, die Lyse nicht infizierter Tumorzellen durch die Anlockung von Effektorzellen durch die Chemokine MDC und IP-10 und die Stimulierung dieser durch IL-2 zu erzielen (veranschaulicht in Abb. 10). MDC schien insbesondere durch seine Fähigkeit zur Anlockung unreifer DC für die Etablierung einer protektiven Anti-Tumorimmunität interessant.



Abb. 10: Theoretisches Modell der antitumoralen Kombinationstherapie von MVMp/IL-2 mit MVMp/MDC oder MVMp/IP-10

Als Modell dienten die wenig immunogenen, MHC–Klasse I positiven Nierenkarzinomzellen RENCA oder die stärker immunogenen, MHC–Klasse I positiven Mastozytomellen P815. Für eine erste Beurteilung der Wirkung sollten *ex-vivo* **Versuche**, bei denen die Tumorzellen vor Injektion in die Versuchstiere *in vitro* mit Parvoviren infiziert wurden, durchgeführt werden.

Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, rekombinante Parvoviren detailierter zu charakterisieren und ihre Wirksamkeit im gentherapeutischen Einsatz zu überprüfen, um dadurch Ansätze für eine Optimierung des Vektorsystems erkennen zu können.

II Ergebnisse

1 Effizienzvergleich von rekombinanten und Wildtyp Parvoviren

Rekombinante Parvoviren werden für eine Anwendung in der Gentherapie von Krebs entwickelt. Da bei ihrer Konstruktion alle wichtigen Elemente für die DNA Amplifikation und Proteinexpression bewahrt wurden (Kap. I/4.6), sollten Wildtyp und rekombinante Viren gleiche Eigenschaften aufweisen. Dies wurde im Detail überprüft, um die rekombinanten Viren besser charakterisieren zu können. Im Hinblick darauf wurden rekombinante Viren mit dem entsprechenden Wildtyp Virus in verschiedenen Stufen des viralen Infektionszyklusses verglichen. Näher untersucht wurden dabei Virusaufnahme, Replikationsverhalten, Proteinexpression und die virale Zytotoxizität. Verschiedene Virusproduktionen wurden auch in Bezug auf Stabilität und Infektiösität überprüft. In Abb. 11 sind wichtige Faktoren für eine effiziente parvovirale Infektion veranschaulicht.



Abb. 11: Wichtige Faktoren für eine effiziente parvovirale Infektion

1.1 Einflüsse auf die Qualität rekombinanter Virusproduktionen

Rekombinante Viren werden durch Co-Transfektion von zwei Plasmiden, die das rekombinante virale Genom bzw. die Kapsidproteinsequenz beinhalten, hergestellt. Ein wichtiger Schritt während der Virusproduktion ist die Aufreinigung und Abtrennung leerer Kapside, die kein Genom enthalten, wozu sich Dichtegradient-Zentrifugationen eignen. Bereits länger bekannt sind CsCl-Gradienten, seit kurzer Zeit werden in unserem Labor aber auch Iodixanol-Gradienten erprobt. Um den Einfluß beider Gradienten auf die Infektiösität der dabei produzierten Viren zu bestimmen, wurden zeitgleich zwei rekombinante Virus-Stocks (MVMp/IL-2) mit genau identischen Ausgangsmaterialien produziert, aber unterschiedlich aufgereinigt: der eine Stock mit einem Iodixanol-Gradient (A), der andere mit einem CsCl-Gradient und anschließender Dialyse (B). Die Aufreinigung stellt zugleich eine Konzentrierung der Virussuspension dar. Um den Grad der Aufkonzentrierung je Gradient zu bestimmen, wurde von beiden Stocks je ein Aliguot der rohen und der aufgereinigten Suspension zeitgleich mit einer NS1 und IL-2 Sonde titriert (Tab. 6).

Gradient		Sonde	Titer des Rohextrakts (ru/ml)	Titer der konz. Suspension (ru/ml)	Konzen- trierung	Genom- titer (g/ml)
А	Iodixanol	NS1	2,8x10 ⁷	3,8x10 ⁸	13 x	8x10 ¹¹
		IL-2	3,7x10 ⁷	4,7x10 ⁸	13 x	
В	CsCl	NS1	3,2x10 ⁷	4,0x10 ⁷	1,3 x	6x10 ¹¹
		IL-2	3,8x10 ⁷	4,8x10 ⁷	1,3 x	

Tab. 6: Einfluß des lodixanol- und CsCl-Gradienten auf die Infektiösität

Von den parallel produzierten MVMp/IL-2 Virus-Stocks A und B wurde der infektiöse Titer auf A9 Zellen mit dem Filter-Hybridisierungstest und je einer NS1 und IL-2 Sonde bestimmt und in *replication units* (ru)/ml angegeben. Es wurden sowohl die Rohextrakte als auch die aufgereinigten Virussuspensionen titriert. Für den Genomtiter (g/ml) wurde die Genomanzahl jedes konzentrierten Virus-Stocks mit der Dot-Blot-Methode berechnet.

Die effektivere Methode ist eindeutig der Iodixanol-Gradient, da mit ihm im Vergleich zum CsCl-Gradient eine etwa 10-fach höhere Ausbeute und Konzentrierung erhalten wurde: unter gleichen Produktionsbedingungen konnten mit dem Iodixanol-Gradient stets Titer im 10^8 Bereich erhalten werden, während mit CsCl-Gradienten nur Titer im 10^7 Bereich möglich waren. Dies deutet auf eine Beeinträchtigung der viralen Infektiösität durch CsCl hin, da mit Hämagglutinations-Nachweisen nie eine inhomogene Verteilung des Virus im Gradienten festgestellt wurde und man daher eine schlechtere Auftrennung nach Dichte im Gegensatz zum Iodixanol-Gradienten ausschliessen kann. Eine gute Kontrolle für die Äquivalenz beider Produktionen stellen die infektiösen Titer der Rohextrakte und die Genomtiter beider Stocks A und B dar, die in beiden Fällen etwa gleich hoch sind.

Dauer und Art der Lagerung der produzierten Viren haben ebenfalls einen Einfluß auf die Infektiösität. Zusätzlich zu den bisher verwendeten Stocks A und B wurde auch noch von zwei weiteren rekombinanten Virus-Stocks C und D jeweils direkt nach der Produktion und erneut ein Jahr später nach Lagerung bei 4°C der infektiöse Titer und der Genomtiter bestimmt (Tab. 7).

In allen Fällen war die Infektiösität nach einjähriger Aufbewahrung gesunken, meist um etwa das 10-fache. Der Genomtiter dagegen blieb konstant; ein vollständiger Abbau der DNA in dieser Zeit wäre jedoch auch nicht zu erwarten.

Virus-Stock		Infektiöser ⁻	Genomtiter	
		nach Produktion	nach einem Jahr	(g/ml)
А	MVMp/IL-2 (lodixanol)	4x10 ⁸	3x10 ⁷	7x10 ¹¹
В	MVMp/IL-2 (CsCl)	4x10 ⁷	2x10 ⁶	6x10 ¹¹
С	MVMp/IL-2 (Iodixanol)	1x10 ⁸	4x10 ⁷	9x10 ¹¹
D	MVMp/MDC (Iodixanol)	3x10 ⁸	3x10 ⁷	1x10 ¹²

Tab. 7: Vergleich der infektiösen Titer nach einem Jahr Lagerung bei 4°C

Der infektiöse Titer von verschiedenen rekombinanten Virusproduktionen (A bis D) wurde auf A9 Zellen mit dem Filter-Hybridisierungstest und einer NS1 Sonde direkt nach der Produktion und ein Jahr später bestimmt und in *replication units* (ru)/ml angegeben. Für den Genomtiter wurde die Genomanzahl (g/ml) jedes Virus-Stocks mit der Dot-Blot-Methode berechnet. Sofern nicht anders angegeben, wurde der Iodixanol-Gradient zur Virusaufreinigung verwendet.

Unterschiedliche Lagerungstemperaturen von -20° C und -80° C konnten den teilweisen Verlust der Infektiösität bei einjährig gelagerten Virus-Stocks nicht verhindern. Wie in Tab. 8 ersichtlich, waren die infektiösen Titer nach tiefgefrorener Lagerung (-20° C/ -80° C) zwar leicht höher als nach üblicher Lagerung bei 4°C, aber dennoch niedriger als ein Jahr zuvor. Diese Konservierung an Infektiösität gegenüber der Lagerung bei 4°C kann aber leicht wieder durch

mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Virussuspension verloren gehen. Es ist daher ratsam, die Lagerungstemperatur den entsprechenden Verwendungszwecken anzupassen, um optimale Titer einsetzen zu können.

Virus-Stock		Infektiöser Titer (ru/ml)			
		nach Produktion	nach Lagerung bei		
			4°C	–20°C	–80°C
А	MVMp/IL-2 (lodixanol)	4x10 ⁸	3x10 ⁷	6x10 ⁷	5x10 ⁷
В	MVMp/IL-2 (CsCl)	4x10 ⁷	2x10 ⁶	5x10 ⁶	5x10 ⁶

Tab. 8: Vergleich der infektiösen Titer nach einem Jahr unterschiedlicher Lagerung

Die Virus-Stocks A und B wurden unter Verwendung gleicher Ausgangsmaterialien und gleichen Produktionsbedingungen hergestellt. Der Virus-Stock A wurde mit einem Iodixanol-Gradient aufgereinigt, der Stock B dagegen mit einem CsCl-Gradient. Beide Stocks wurden ein Jahr lang bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Ihr infektiöse Titer wurde sowohl sofort nach der Produktion, als auch nach einjähriger Lagerung auf A9 Zellen mit dem Filter-Hybridisierungstest und einer NS1 Sonde bestimmt und in *replication units* (ru)/ml angegeben.

Zusammenfassung:

Sowohl die Produktionsmethode, als auch die Lagerung der Viren können die virale Infektiösität stark beeinflussen. Iodixanol Gradienten führen zu einer höheren Ausbeute infektiöser Viren als CsCl Gradienten. Eine längere Lagerung vermindert in der Regel die Infektiösität eines Virus-Stocks. Ein rekombinanter Virus-Stock sollte daher am besten direkt und gezielt für eine bestimmte Anwendung hergestellt werden. Dadurch kann das anfänglich höhere Infektivitätspotenzial der Virusproduktionen ausgenutzt und ein Qualitätsverlust vermieden werden.

1.2 Geringere Infektiösität rekombinanter im Vergleich zu Wildtyp Viren

Wie bereits erwähnt, werden rekombinante Viren über Co-Transfektion, Wildtypviren dagegen über Infektion hergestellt. Entscheidend ist letztendlich die Infektiösität des produzierten Virus-Stocks.

Um die Effizienz der Produktion von rekombinanten und Wildtyp Parvoviren zu bestimmen, wurden verschiedene Virusproduktionen jeweils in ihrem Genomtiter und infektiösen Titer in den Standardzellen A9 verglichen (Tab. 9). Dadurch konnte der in den Virussuspensionen enthaltene Anteil an nicht zur Infektion führender Viruspartikel bestimmt werden, da mit dem Genomtiter (GT) alle viralen Genome erfasst werden. Der infektiöse Titer wurde jeweils über die Replikationsfähigkeit der Viren bestimmt (*replication units* (ru)/ml), da der für die Wildtypviren übliche Plaquetest für rekombinante Viren nicht angewendet werden kann.

Virus-Stock	Infektiöser Titer (IT) (ru/ml)	Genomtiter (GT) (g/ml)	Ant V	eil infektiöser irionen in %	
rekombinante Viren:					
MVMp/IL-2	1x10 ⁸	1x10 ¹²		0,010	
MVMp/IL-2	1×10 ⁸	9x10 ¹¹		0,011	
MVMp/IL-2	3x10 ⁸	3x10 ¹²		0,010	
MVMp/MDC	3x10 ⁸	1x10 ¹²		0,030	
MVMp/∆800	3x10 ⁷	2x10 ¹²		0,001	
Wildtyp Viren:			MW: (SEM)	0,0125 (0,0047)	
MVMp	5x10 ⁹	3x10 ¹²	, ,	0,167	
MVMp	6x10 ⁹	1x10 ¹³		0,060	
MVMp	4x10 ¹⁰	7x10 ¹²		0,571	
MVMp	4x10 ¹⁰	1x10 ¹³		0,400	
			MW: (SEM)	0,2995 (0,1151)	

Tab. 9: Infektiöser Titer und Genomtiter verschiedener Virusproduktionen im Vergleich Der infektiöse Titer (IT) von rekombinanten und Wildtyp Virusproduktionen wurde auf A9 Zellen mit dem Filter-Hybridisierungstest und einer NS1 Sonde bestimmt und in *replication units* (ru) angegeben. Für den Genomtiter (GT) wurde die Genomanzahl (g) jedes Virus-Stocks mit der Dot-Blot-Methode berechnet. Das Verhältnis beider errechnet sich aus dem Quotient von infektiösem Titer (IT) und Genomtiter (GT). Davon wurden jeweils für rekombinante und Wildtyp Viren Mittelwert (MW) und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) berechnet. Ein Teil dieses Versuches wurde in Zusammenarbeit mit Stephanie Bölz durchgeführt.

In jedem Fall war der Genomtiter (GT) höher als der infektiöse Titer (IT). Bei rekombinanten Viren (0,01 %) betrug der Anteil infektiöser Virionen jedoch deutlich weniger als bei Wildtyp Viren (0,3 %), im Schnitt etwa 30 mal. Rekombinante Virus-Stocks weisen somit eine geringere Infektiösität als Wildtyp Virus-Stocks auf. Dies ist allerdings auch von der rekombinanten Virusart abhängig, da seit mehreren Jahren beobachtet werden konnte, dass manche rekombinante Virusproduktionen trotz Anwendung des gleichen Protokolls höhere Titer ergeben als andere. Die rekombinanten Viren MVMp/IL-2 und MVMp/MDC wiesen nach Produktion zum Beispiel stets höhere infektiöse Titer auf als MVMp/EGFP oder MVMp/ Δ 800 Viren. Durch die Deletion der 800 Basenpaare in der VP-kodierenden Sequenz oder den

Einbau verschiedener Transgene kann die Infektiösität der neu entstandenen rekombinanten Viren daher unterschiedlich beeinträchtigt sein. Dies könnte auf unterschiedliche DNA-Faltungen oder Änderungen in der Virusstruktur zurückgeführt werden. Eine Rolle könnte auch eine ineffiziente Verpackung rekombinanter Genome spielen.

1.3 Lineare Absorption der Viren an die meisten Zelllinien

Für eine effiziente Infektion trägt die zu infizierende Zelle maßgeblich bei. Somit ist der Tropismus entscheidend für den therapeutischen Einsatz rekombinanter Viren. In der Tat sind Viren auf viele Funktionen der Zelle angewiesen und eine Infektion kann daher mit demselben Virus-Stock in verschiedenen Zellen unterschiedlich sein. Den ersten wichtigen Schritt stellt die Virusaufnahme in die Zelle dar. Dabei wird von einem Rezeptor-vermittelten Eintritt ausgegangen (Linser *et al.*, 1977).

Mehrere Zelllinien wurden auf ihre Fähigkeit, Viren zu binden oder aufzunehmen, getestet. Sie wurden mit MVMp Wildtyp und rekombinantem MVMp/IL-2 Virus verschiedener moi (*multiplicity of infection:* ru/Zelle) infiziert und bereits zwei Stunden später geerntet. Durch Vakuum wurden die Zellen auf NC Filter aufgebracht und nach Fixierung mit einer NS1-Sonde hybridisiert (Zellulärer Dot-Blot). Somit wurde jedes aufgenommene Virus radioaktiv markiert. Die radioaktive Ladung (cpm: *counts per minute*) wurde mit einem Szintillationszähler detektiert (Abb. 12).

In der Regel konnte sowohl mit Wildtyp als auch mit rekombinanten Viren mit zunehmender moi ein linearer Anstieg an Radioaktivität, und damit auch an zellulär assoziierten Viren, festgestellt werden. Die Standardzellen A9 und NBK, sowie die Tumormodelle RENCA, B78/H1, H5V und P815 sollten daher über ausreichend viele Rezeptoren verfügen, die die Viren zum Zelleintritt nutzen können. Dies gilt mindestens bis moi 20, für Wildtyp Viren sogar mindestens bis moi 100 ru/Zelle.

Bei gleicher moi konnte mit den rekombinanten MVMp/IL-2 Viren stets eine höhere Ladung an Radioaktivität in den Zellen festgestellt werden als mit MVMp Wildtyp Viren. Da die Versuchsmethode nicht sehr sensitiv ist, sind jedoch sehr hohe Schwankungen zu beobachten und eine genaue quantitative Aussage kann

34



Abb. 12: Moi-abhänigige virale Absorption an verschiedene Zellen Die Standardzellen A9 und NBK und die Tumormodelle RENCA, B78/H1, H5V und P815 (jeweils 2x10⁵) wurden mit rekombinantem MVMp/IL-2 (orange) und MVMp Wildtyp Virus (blau) mit unterschiedlicher moi (ru/Zelle) infiziert und bereits 2 h nach Infektion geerntet. Die fixierten Zellen wurden schliesslich mit einer NS1-Sonde hybridisiert (Zellulärer Dot-Blot) und die Radioaktivität (cpm) mit einem Szintillationszähler detektiert.

insbesondere bei niedriger moi nicht getroffen werden. Das erhaltene Ergebnis bestätigt die in Kap. 1.2 getroffene Aussage, dass rekombinante Virus-Stocks weniger infektiös sind als Wildtyp Virus-Stocks, da für die gleiche infektiöse Ladung (moi) mit rekombinanten Viren insgesamt mehr Virionen eingesetzt werden müssen als mit Wildtyp Viren. Eine weitere Schlußfolgerung ist, dass die nicht infektiösen Virionen trotzdem an die Zelle absorbieren können. Ihre Kapsidstruktur, oder zumindest die für die Rezeptorinteraktion wichtigen Strukturen, sind also intakt geblieben.

1.4 Unterschiede in der Amplifikation rekombinanter und Wildtyp Viren

Nach der Virusaufnahme erfolgen Dekapsidierung und ein wahrscheinlich endosomaler Transport der Genome zum Nukleus, während Kapsidteile wahrscheinlich nicht in den Kern eindringen (Zadori et *al.*, 2001). Von entscheidender Bedeutung ist, wieviele Genome den Kern letztendlich erreichen und sich dort replizieren. Der Grund dafür ist, dass von parvoviralen Genomen, die sich amplifizieren können, eine stärkere Transgenexpression erwartet wird als von nicht amplifizierfähigen (Hanson et *al.*, 1991).

In denselben Zelllinien, die für die Virusassoziation getestet wurden (A9, NBK, RENCA, B78, P815, H5V), wurde geprüft, wie effektiv sich Wildtyp und rekombinante Viren jeweils amplifizieren können. Dieser Versuch fand zeitgleich mit dem in Kap. 1.3 beschriebenen Versuch unter Verwendung gleicher Materialien und gleichen Versuchsbedingungen statt. Die mit verschiedener moi infizierten Zellen wurden allerdings erst 30 Stunden nach Infektion geerntet und wie in Kap. 1.3 beschrieben aufbereitet. Somit konnten die 30 h Werte mit den 2 h Werten verglichen werden (Abb. 13 bis 17).

In fast allen Zellen wurde nach 30 h mehr Radioaktivität und damit mehr virale Genome detektiert als 2 h nach Infektion. Daher hat bei beiden Viren in der Regel Amplifikation stattgefunden. Als Beispiel sei die Amplifikation in NBK Zellen angeführt (Abb. 13).





Je 2x10⁵ NBK Zellen wurden mit MVMp Wildtyp (wt) und rekombinantem MVMp/IL-2 (rec) mit verschiedener moi (ru/Zelle) infiziert und nach 2 und 30 h geerntet. Mittels eines zellulären Dot-Blots wurden sie mit einer NS1-Sonde hybridisiert und die Radioaktivität (cpm) in einem Szintillationszähler gemessen.

In allen Zellen außer H5V (Abb. 16) war nach 30 h jedoch mehr virale Wildtyp DNA detektierbar als rekombinante DNA. Dies deutete auf eine stärkere Amplifikation des Wildtyp Virus hin, die vom rekombinanten Virus auch nach 55 h Inkubationszeit nicht eingeholt werden konnte. In Abb. 14 sind die 30 h Werte in den Zellen A9, NBK, B78 und P815 zum Vergleich der Amplifikation von MVMp Wildtyp und rekombinanten MVMp/IL-2 Viren dargestellt.



Abb. 14: Vergleich der Amplifikation von MVMp und MVMp/IL-2 Virus in verschiedenen Zellen Je 2x10⁵ Zellen wurden mit MVMp Wildtyp (wt, blau) und rekombinantem MVMp/IL-2 (rec, orange) mit verschiedener moi (ru/Zelle) infiziert und nach 30 h geerntet. Mittels eines zellulären Dot-Blots wurden sie mit einer NS1-Sonde hybridisiert und die Radioaktivität (cpm) in einem Szintillationszähler gemessen.

Vergleichbare Resultate konnten auch mit H1 Viren (H1 Wildtyp und rekombinantem hH1/IL-2 Virus) und ihren entsprechenden Standardzellen NBK und 293T, sowie den Tumorzellen HeLa beobachtet werden (Abb. 15).





Je 2x10⁵ Zellen wurden mit H1 Wildtyp (wt, blau) und rekombinantem hH1/IL-2 (rec, orange) mit verschiedener moi (ru/Zelle) infiziert und nach 30 h geerntet. Mittels eines zellulären Dot-Blots wurden sie mit einer NS1-Sonde hybridisiert und die Radioaktivität (cpm) in einem Szintillationszähler gemessen.

Wie bereits erwähnt, gibt es auch Ausnahmen, zum Beispiel H5V. In diesem Fall konnte keine eindeutige Zunahme der viralen Genome von 2 zu 30 h festgestellt werden. Ebenso amplifizierten Wildtyp Viren nicht besser als rekombinante Viren (Abb. 16). Die beim rekombinanten im Vergleich zum Wildtyp Virus verstärkte Radioaktivität nach 30 h könnte auf Reste des eingebrachten Virus zurückzuführen sein, da rekombinante Virus-Stocks bei gleichem Replikationstiter mehr virale Partikel enthalten als Wildtyp-Stocks (Kap. 1.2). Insgesamt kann von einer sehr geringen parvoviralen Amplifikation in H5V Zellen ausgegangen werden.





Eine Besonderheit stellen auch die RENCA Zellen dar. Die Wildtyp-Amplifikation verhielt sich zwar genau so, wie bei den anderen Zellen, aber die rekombinante Virus-Amplifikation unterschied sich in RENCA Zellen insofern, dass nach 30 h weniger Genome detektiert wurden als nach 2 h (Abb. 17).





Je 2x10⁵ Zellen wurden mit MVMp Wildtyp (wt) und rekombinantem MVMp/IL-2 (rec) mit verschiedener moi (ru/Zelle) infiziert und nach 2 und 30 h geerntet. Mittels eines zellulären Dot-Blots wurden sie mit einer NS1-Sonde hybridisiert und die Radioaktivität (cpm) in einem Szintillationszähler gemessen. Zum einen spricht dies für eine geringe Amplifikation des rekombinanten MVMp/IL-2 Virus in RENCA Zellen. Zum anderen könnte auch ein vermehrter Abbau der rekombinanten Viren in diesen Zellen erfolgen, so dass weniger rekombinante Genome zur Amplifikation gelangen. Für den Wildtyp Virus scheint dies weniger ausgeprägt zu sein. Die Virusstruktur der rekombinanten Viren könnte daher im Vergleich zu Wildtyp Viren derart verändert sein, dass zum Beispiel abbauende Enzyme der endoplasmatischen oder lysosomalen Kompartimente das Virus leichter deaktivieren können.

1.5 Gleich hohe Expression viraler Proteine

Es stellt sich nun die Frage, ob sich der Unterschied in der Amplifikationsfähigkeit von Wildtyp und rekombinanten Viren auch in der Proteinexpression wiederspiegelt. Für H1 Viren wurde bereits gezeigt, dass H1 Wildtyp und rekombinante hH1/ Δ 800 und hH1/IL-2 Viren nach Infektion eine gleich hohe Proteinexpression aufweisen (Haag *et al.*, 2000). Dies sollte nun auch für MVMp Viren überprüft werden.

NBK, A9 und RENCA Zellen wurden mit MVMp Wildtyp und rekombinanten Viren (moi 3 ru/Zelle) infiziert und nach 48 h geerntet. Die Zellextrakte wiesen eine gleiche Menge an NS1 Protein auf (Abb. 18). Damit wurde das mit H1 Viren bereits erhaltene Ergebnis bestätigt.



Abb. 18: Gleiche NS1 Expression nach Infektion

1x10⁶ Zellen (NBK, A9 und RENCA) wurden mit einer moi von 3 ru/Zelle infiziert und nach 48 h geerntet. Jeweils gleiche Mengen an Zellextrakt wurden im Western Blot auf NS1 Proteine analysiert. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit A. Dege durchgeführt. Es scheint, dass für die Proteinexpression keine hohe Amplifikation notwendig ist. Das System kann bereits mit wenigen DNA Matrizen abgesättigt sein, so dass ein unterschiedliches Amplifikationspotenzial von rekombinanten und Wildtyp Viren für die Expression von Proteinen unerheblich ist. Dies spricht für eine Anwendung rekombinanter Viren in der Gentherapie, da die NS1 und damit auch die Transgen Expression einen ganz entscheidenden Faktor darstellen und in der Regel hohe Transgenspiegel erwünscht sind.

1.6 Wildtyp-Parvoviren sind zytotoxischer als rekombinante Parvoviren

Ein großer Vorteil der Parvoviren gegenüber anderen für die Krebstherapie entwickelten viralen Vektoren sind ihre zytotoxischen Eigenschaften in permissiven Tumorzellen.

In verschiedenen Tumorzellen wurde das zytotoxische Potenzial von Wildtyp und rekombinanten Viren miteinander verglichen, indem 3 Tage nach Infektion der Anteil vitaler Zellen mit verschiedenen Methoden (Kap. IV/5.4) bestimmt wurde. Die Standardzellen A9 und NBK, sowie 293T sind sehr empfindlich für die Virusvermittelten zytopathischen Effekte und damit für einen zytotoxischen Vergleich von Wildtyp und rekombinanten Viren geeignet.

A9 Zellen wurden somit mit MVMp Wildtyp und rekombinanten MVMp/IL-2 Viren verschiedener moi infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (mock). Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C wurde dem Zellmedium Alamar Blue®, ein Indikator für die zelluläre Atmungsaktivität, zugegeben. Vitale, atmende Zellen erzeugten einen messbaren Farbumschlag, der in % umgerechnet wurde (Abb. 19).



Abb. 19: Zytotoxizität von MVMp und MVMp/IL-2 Viren in A9 Zellen

Je $3x10^3$ A9 Zellen wurden in eine 96-Lochplatte ausgesät und mit MVMp Wildtyp und rekombinanten MVMp/IL-2 Viren in moi 1, 3 und 10 ru/Zelle infiziert. Nach 3 Tagen wurde dem Zellkulturmedium 10 µl des Reagenz Alamar Blue® zugegeben und der Farbumschlag nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C mit dualer Wellenlänge 540:620 nm gemessen. Das Überleben der Zellen wurde in % angegeben. Mit zunehmender moi nahm das Absterben der Zellen durch Virus zu. Dabei wies das MVMp Wildtyp Virus eindeutig stärkere zytopathische Effekte auf als das rekombinante MVMp/IL-2 Virus. Dies konnte auch mit NBK Zellen und anderen Nachweismethoden (MTT-Test, LDH-Test) festgestellt werden. Auch für H1 Viren traf diese Tatsache zu, wie in NBK, 293T und HeLa Zellen beobachtet werden konnte (unveröffentlichte Ergebnisse). Die größere Zytotoxizität von Wildtyp Viren war völlig unerwartet, da dem viralen Protein NS1 bisher die fast alleinige Hauptrolle bei der parvoviralen Zytotoxizität zugeschrieben wurde und beide Viruspräparationen die gleiche NS1 Expression zeigten (Kap. 1.5). Daraus wird deutlich, dass bei der viralen Zytotoxizität noch andere Faktoren eine bedeutende Rolle spielen müssen.

Ein Unterschied beider Präparationen ist zum Beispiel die Herstellungsweise von Wildtyp (Infektion) und rekombinanten Viren (Co-Transfektion). Um einen eventuellen Einfluß davon auf die Zytotoxizität bestimmen zu können, wurde ein MVMp Wildtyp Virus-Stock durch Transfektion eines infektiösen MVMp Klons in 293T Zellen in ähnlicher Weise wie rekombinante Viren produziert (MVMp/Tr, Kap. IV/6.3). Abweichend vom Protokoll wurde das Virus jedoch bereits 30 h nach Transfektion geerntet, um eine Infektion mit neu produzierten Wildtyp Viren möglichst auszuschließen. Der Titer war dementsprechend auch deutlich niedriger als sonst üblich (10⁵ anstatt 10⁷⁻⁸ ru/ml).

Die Bestimmung des Zytotoxizitätspotenzials dieses neuen Wildtyp-Stocks MVMp/Tr erfolgte auf gleiche Weise wie bereits oben geschildert in A9 Zellen und Alamar Blue® Detektion nach 3 Tagen Inkubation (Abb. 20). Als Kontrollen dienten zwei rekombinante Virus-Stocks MVMp/IL-2 und MVMp/MDC, sowie ein über Infektion hergestellter MVMp Wildtyp Virus-Stock und nicht infizierte Zellen (mock).

Ein weiterer Unterschied zwischen rekombinanten und Wildtyp Viren ist die Fähigkeit des Wildtyp Virus, Nachkommenviren zu bilden, die während der dreitägigen Inkubation erneut Zellen infizieren und lysieren können. Um letzteres zu unterbinden, wurde einem Teil MVMp infizierter Zellkulturen nach 24 h Neuraminidase (Neur.) oder neutralisierende Antikörper (Ak) im Überschuß zugegeben (Abb. 20). Neuraminidase spaltet die an vielen Zellrezeptoren gebundene Neuraminsäure ab und verhindert dadurch die virale Aufnahme, wie für

41

CPV (*Canine* (Hund) Parvovirus) bereits nachgewiesen wurde (Barbis *et al.*, 1992). Neutralisierende Antikörper binden an freigesetzte, neu gebildete Virionen und blockieren somit eine erneute Infektion.



Abb. 20: Einfluß von Neuraminidase und neutralisierenden Antikörpern auf die Zytotoxizität des Wildtyp Virus

Je $3x10^3$ A9 Zellen wurden in eine 96-Lochplatte ausgesät und mit den Wildtyp Viren MVMp und MVMp/Tr, sowie den rekombinanten Viren MVMp/IL-2 und MVMp/MDC Viren mit moi 3 und 10 ru/Zelle infiziert. Nach 24 h wurde dem Medium einiger MVMp-infizierten Zellen entweder 0,1 u/ml Neuraminidase (Neur.) oder neutralisierende Antikörper (Ak) im Überschuß zugegeben. Nach 3 Tagen wurde dem Zellkulturmedium 10 µl des Reagenz Alamar Blue® zugegeben und der Farbumschlag nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C bei der dualen Wellenlänge von 540 zu 620 nm gemessen. Das Überleben der Zellen wurde jeweils mit dem von nicht infizierten Zellen (mock) ins Verhältnis gesetzt.

Die unterschiedliche Produktionsweise von Wildtyp und rekombinanten Parvoviren scheint nicht die Ursache für deren unterschiedliches zytotoxisches Potenzial zu sein, da MVMp und MVMp/Tr Viren das Überleben von A9 Zellen gleich beeinflussten. Dagegen war durch die nachträgliche Zugabe von Neuraminidase oder neutralisierenden Antikörpern die Zytotoxizität des MVMp Wildtyp Virus stark vermindert und entsprach nun etwa der von rekombinanten Viren. Dieser geringe zytotoxische Effekt ist somit wahrscheinlich auf die Wirkung von NS1 zurückzuführen, während die Fähigkeit, Nachkommenviren bilden zu können, möglicherweise einen zusätzlichen Effekt auf die virale Zytotoxizität ausübt.

Zusammenfassung:

Anhand der Ergebnisse zeigen rekombinante Viren eine geringere Infektiösität, Amplifikation und Zytotoxizität als Wildtyp Viren. Daher scheinen sie zunächst weniger effizient als Wildtyp Viren zu sein. Für die Gentherapie ist jedoch der Transgen Transfer von entscheidender Bedeutung. Da rekombinante Viren aber eine den Wildtyp Viren äquivalente Proteinexpression aufweisen, wird ihre gentherapeutische Verwendung in der Tumortherapie gerechtfertigt. Durch weitere Forschung kann versucht werden, die bestehenden Mängel der rekombinanten Viren bezüglich der Eigenschaften der Wildtyp Viren zu kompensieren und die Vektoren weiter zu optimieren. Für spätere Anwendungen rekombinanter Viren im größeren Maßstab wären auch Verbesserungen im Produktionsverfahren günstig, zum Beispiel durch eine Verpackungs-Zelllinie oder eine chromatographische Aufreinigung, damit auf einfache und schnelle Weise hohe Ausbeuten an infektiösen Viren erhalten werden können.

2 Das Tumormodell Mastozytom P815

Neben einer gründlichen Charakterisierung der Viren *in vitro* ist auch eine Überprüfung ihrer Effektivität *in vivo* notwendig. Dafür werden geeignete Tumormodelle benötigt. Das Tumormodell sollte bereits gut charakterisiert sein, damit Vergleiche mit anderen Viren oder gentherapeutischen Vektoren möglich sind. Ein solches stellt unter anderem die Mastozytom Zelllinie P815 dar. Dieses Modell bietet zudem den weiteren Vorteil, dass einige Tumor-assoziierten Antigene (TAAs) davon bereits identifiziert wurden, was bei späteren Untersuchungen von Nutzen sein könnte, zum Beispiel bei der Analyse antitumoraler zytotoxischer T-Zellen.

2.1 Effiziente Infektion von P815 Zellen mit MVMp Wildtyp

Um die Empfindlichkeit dieser Zellen für MVMp Wildtyp zu bestimmen, wurde ein Proliferationstest durchgeführt, der indirekt die Zytotoxizität des Virus wiederspiegelt. P815 Zellen wurden mit MVMp und MVMi Wildtyp Viren (siehe Kap. I/4.1) verschiedener moi infiziert. MVMi infizierte Zellen dienten dabei neben nicht infizierten Zellen (mock) als Kontrolle, da die lytische Aktivität der MVMi Viren in P815 Zellen bereits bekannt war. Von Tag 2 bis 5 wurde täglich die Anzahl vitaler Zellen durch Färbung der Zellsuspension mit dem Farbstoff Trypanblau bestimmt, der nur tote Zellen durch die porös gewordene Membran blau markiert (Abb. 21).



Abb. 21: Einfluß von MVMp und MVMi auf die Proliferation von P815 Zellen Je 10⁴ P815 Zellen wurden in eine 6-Lochplatte ausgesät und mit MVMp und MVMi (moi 3 und 10 ru/Zelle) infiziert. Täglich wurde die Anzahl vitaler Zellen durch Färbung mit Trypanblau bestimmt.

Nicht infizierte Zellen vermehrten sich rasch, während alle MVMi infizierte Zellen abstarben. Das Wachstum MVMp infizierter Zellkulturen war gegenüber nicht infizierten Zellkulturen deutlich verlangsamt.

Da die sonst benutzten Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität (MTT-Test, LDH-Test, Alamar Blue) für P815 Zellen nicht oder nicht sehr gut anwendbar waren, wurde zur Bestätigung des oben erhaltenen Ergebnisses ein Klonbildungstest durchgeführt. P815 Zellen wurden mit MVMp (moi 3 und 10 ru/Zelle) infiziert und verschiedene Verdünnungen davon in weichem Agar-Medium aufgenommen (Soft-Agar-Klonbildungstest). Dieses Agar-Medium fixiert die in Suspension wachsenden P815 Zellen an einen Ort und verhindert somit eine Zelldiffusion, so dass aus jeder Zelle zählbare Klone entstehen können. Die Klonbildung wurde beobachtet und bei geeigneter Größe (nach etwa 1-2 Wochen) ausgezählt (Abb. 22).



Abb. 22: Reduzierte Klonbildung MVMpinfizierter P815 Zellen

Je $6x10^5$ Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 300 µl mit MVMp Wildtyp Viren (moi 3 und 10 ru/Zelle) infiziert und verschiedene Verdünnungen davon in weichem Agar-Medium ausgesät (Soft-Agar-Klonbildungstest). Nach 1 bis 2 Wochen, wenn genügend Zellklone gewachsen waren, wurden diese mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Die Zellklonbildung ist in % angegeben. Die Klonbildung MVMp infizierter Zellen war gegenüber nicht infizierten Zellen deutlich reduziert. Dies lässt auf zytotoxische Effekte des Virus schließen, der das Wachstum permissiver Zellen verhinderte. Eine höhere moi von 10 ru/Zelle brachte gegenüber der moi von 3 ru/Zelle keine weitere Steigerung des Effektes, so dass bereits mit geringerer moi die maximale Zellzahl mit Virus infiziert wurde. Das bedeutet, dass etwa 30 % der Zellen gegenüber einer zytotoxischen Infektion mit MVMp resistent sind. Dies würde auch das retardierte Zellwachstum als maximalen Effekt in Abb. 21 erklären, da die 30 % resistenten Zellen für die stetige Zunahme der Zellanzahl verantwortlich sind. Trotz dieses kleinen Verlustanteiles von 30 % stellen P815 Zellen jedoch eine sehr empfindliche Zelllinie bezüglich einer Infektion mit MVMp oder MVMi Viren dar.

2.2 Keine Transgenexpression von rekombinanten Viren in P815 Zellen

Um die zytotoxischen Effekte rekombinanter Viren im Vergleich zu Wildtyp Viren in P815 Zellen zu bestimmen, wurde ein Klonbildungstest in gleicher Weise wie oben beschrieben mit rekombinantem MVMp/MDC und MVMp Wildtyp Virus (moi 10 ru/Zelle) durchgeführt (Abb. 23).





Je $6x10^5$ Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 300 µl mit MVMp/MDC und MVMp Wildtyp Viren (moi 10 ru/Zelle) infiziert und verschiedene Verdünnungen davon in weichem Agar-Medium ausgesät. Nach 1 bis 2 Wochen, wenn genügend Zellklone gewachsen waren, wurden diese mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Die Zellklonbildung ist in % angegeben. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit A. Dege durchgeführt.

MVMp infizierte P815 Zellen ergaben das gleiche Resultat wie in dem Versuch zuvor (Abb. 22). Zellen, die mit rekombinantem MVMp/MDC Virus infiziert worden waren, unterschieden sich dagegen nicht von nicht infizierten Zellen der mock Gruppe.

Rekombinante Viren sind daher nicht zytotoxisch in P815 Zellen. Da in mehreren Zellen das zytotoxische Potenzial rekombinanter Viren wesentlich geringer war als das von Wildtyp Viren (Kap. 1.6), konnte dies zunächst nachvollzogen werden.

Eine Überraschung stellte die Infektion von P815 Zellen mit rekombinantem MVMp/EGFP Virus dar, da sogar bei einer moi von 10 ru/Zelle nach 3 Tagen fast keine grün fluoreszierenden Zellen detektiert werden konnten. Dieses Ergebnis konnte auch in einem IL-2 ELISA von MVMp/IL-2 infizierten P815 Zellkulturen reproduziert werden. In Abb. 24 ist die IL-2 Produktion MVMp/IL-2 infizierter P815 Zellen nach 3 Tagen im Vergleich zu RENCA Zellen dargestellt.



Abb. 24: IL-2 Produktion in MVMp/IL-2 infizierten RENCA und P815 Zellen

Je 10³ RENCA und P815 Zellen wurden in eine 96-Lochplatte ausgesät, mit rekombinanten MVMp/IL-2 Viren in moi 1 und 10 ru/Zelle infiziert. Die IL-2 Konzentration im Überstand wurde 3 Tage nach Infektion mit einem IL-2-ELISA bestimmt. Die IL-2 Konzentration ist in µg angegeben und auf 10⁶ Zellen berechnet.

Eine weitere Bestätigung, dass rekombinante Viren in P815 Zellen eine äußerst geringe Transgenexpression aufweisen, lieferte die NS1 Bestimmung mittels einer Western Blot Analyse. Analog zu dem in Kap. 1.5 beschriebenen Versuch wurden P815 Zellen mit MVMp Wildtyp und rekombinantem MVMp/MDC Virus mit einer moi von 3 ru/Zelle infiziert und nach 48 h analysiert (Abb. 25).



Western Blot: NS1

Abb. 25: NS1 Expression nach Infektion mit MVMp Wildtyp und rekombinantem MVMp/ MDC Virus

1x10⁶ P815 Zellen wurden mit einer moi von 3 ru/Zelle infiziert und nach 48 h geerntet. Jeweils gleiche Mengen an Zellextrakten wurden im Western Blot auf NS1 Proteine analysiert. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit A. Dege durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Zelllinien NBK, A9 und RENCA, bei denen eine gleich hohe NS1 Expression von Wildtyp und rekombinanten Viren vorlag (Kap. 1.5), war die NS1-

Expression von MVMp/MDC infizierten P815 Zellen deutlich geringer als bei Infektion mit Wildtyp Viren.

Die Versuche zeigen, dass die virale Proteinexpression nach Infektion von P815 Zellen mit drei verschiedenen rekombinanten Viren äußerst gering ist, und bestätigen sich gegenseitig. Dadurch erklärt sich auch die nicht vorhandene Zytotoxizität der rekombinanten Viren in diesem Modell. Aufgrund dieser Ergebnisse können P815 Zellen nicht für Effizienzbestimmungen rekombinanter Viren *in vivo* verwendet werden.

2.3 Tumorsuppressive Wirkung des MVMp Wildtyp Virus in vivo

Da MVMp Wildtyp starke tumorsuppressive Effekte *in vitro* zeigte, war es interessant, inwieweit diese Effekte auch *in vivo* erhalten werden können. Zur Orientierung wurde zunächst mit *ex vivo* Versuchen begonnen, in denen P815 Zellen bereits *in vitro*, noch vor der Injektion in die Mäuse, mit Virus infiziert wurden.

In einem ersten Versuch wurden P815 Zellen mit MVMp Wildtyp und rekombinanten Viren (MVMp/IL-2, MVMp/MDC und beide in Kombination) mit einer Gesamt-moi von 10 ru/Zelle infiziert und in Mäuse subkutan implantiert. Jede Gruppe umfasste 5 Tiere.

Die Gruppen der mit rekombinanten Viren vorbehandelten Tumore unterschieden sich nicht von der nicht infizierten Kontrollgruppe (mock). Anhand der *in vitro* Ergebnisse (Kap. 2.2) war dies auch zu erwarten. Beide Gruppen werden daher im folgenden als zusammengehörig behandelt (mock/rekombinante Gruppe).

Erfolgreich war dagegen die mit MVMp behandelte Gruppe, bei der sich entweder Tumore erst gar nicht gebildet hatten oder kleine Tumore nach spätestens 14 Tagen wieder regressierten. Die Vorbehandlung der Zellen mit MVMp Virus war damit sehr effektiv (Tab. 10/ Versuch 1). Allerdings waren auch in der mock/rekombinanten Gruppe am Ende 20 % der Tiere tumorfrei geblieben (Tab. 10/ Versuch 1). Dies ist wahrscheinlich dadurch zu begründen, dass P815 Zellen immunogen sind und vom Immunsystems des Wirts abgestoßen werden können. Die

	Anteil tumorfreier Mäuse in % Versuch 1 Versuch 2		Resistenz gegen Challenge in %	
mock / rek. Viren	20	0	100	
MVMp Wildtyp	100	80	100	

vollständige Tumoreliminierung im Versuch wurde wahrscheinlich auch durch die geringe Inokulationsmenge von 2x10⁵ Tumorzellen begünstigt.

Tab. 10: Antitumorale Effekte von MVMp Wildtyp Viren in P815 Tumorzellen ex vivo

Versuch 1: P815 Zellen wurden mit MVMp Wildtyp und rekombinanten Viren (MVMp/IL-2, MVMp/ MDC, jeweils mit moi 10 ru/Zelle; sowie mit beiden Viren in Kombination jeweils mit moi 5 ru/Zelle) oder mock infiziert und pro DBA/2 Maus 2x10⁵ Zellen subkutan implantiert. Das Tumorwachstum wurde beobachtet und die Anzahl der tumorfreien Mäuse in % angegeben. Letztere bekamen nach 2 und 6 Monaten ein *Challenge* mit naiven P815 Zellen (9x10⁵ bzw. 1x10⁶). **Versuch 2:** P815 Zellen wurden mit MVMp Wildtyp Viren (moi 1 und 10 ru/Zelle) oder mock infiziert und pro DBA/2 Maus 1x10⁶ Zellen subkutan implantiert. Die Auswertung erfolgte analog zu Versuch 1. In beiden Versuchen betrug der Gruppenumfang jeweils 5 Tiere.

Alle tumorfreien Mäuse erhielten nach 2 Monaten ein sogenanntes Challenge, d.h. eine zweite Injektion mit einer größeren Menge (9x10⁵) an naiven P815 Tumorzellen. In allen Fällen konnten die naiven Tumorzellen vom Immunsystem der eliminiert werden. Es muss sich daher ein Mäuse tumorspezifisches immunologisches Gedächtnis nach der ersten Injektion infizierter Tumorzellen gebildet haben. Erneut 6 Monate später erfolgte ein zweites Challenge mit naiven P815 Zellen (1x10⁶) und wiederum blieben alle Mäuse tumorfrei, so dass von einem längerfristigen immunologischen Gedächtnis ausgegangen werden kann.

Der Versuch wurde mit einer 5 x größeren Menge an P815 Zellen als im Versuch 1 wiederholt. Aufgrund ihrer Wirkungslosigkeit wurden rekombinante Viren in diesem Modell nicht weiter verwendet. Vor der Implantation in Mäuse wurden die Zellen daher nur noch mit MVMp Wildtyp Viren (moi 1 und 10) oder mock infiziert. Jede Gruppe umfasste wiederum 5 Mäuse.

Alle Tiere der mock Gruppe entwickelten Tumore, so dass die Tumorzelldosis diesmal tumorigen war. Dagegen bekam nur je eine Maus der moi 1 und moi 10 MVMp Gruppe einen Tumor. Es blieben somit 80 % der Mäuse tumorfrei, unabhängig von der jeweils eingesetzten moi (Tab. 10/ Versuch 2). Wiederum war dabei ein immunologisches Gedächtnis gebildet worden, da ein *Challenge* mit der gleichen Menge an naiven P815 Zellen nicht zu einem Tumorwachstum führte.

Da das MVMp Wildtyp Virus in den *ex vivo* Versuchen einen ausgeprägten antitumoralen Effekt zeigte, sollte seine Wirkung auch *in vivo* getestet werden. Jede Maus erhielt daher eine tumorigene Menge an naiven P815 Zellen. Nachdem die Tumore etabliert waren, wurden jeder Maus insgesamt 2x10⁸ pfu MVMp Wildtyp Viren, auf drei Tage verteilt, direkt in den Tumor oder in dessen direkte Umgebung injiziert (Abb. 26).



Abb. 26 Antitumoraler Effekt des MVMp Virus auf etablierte P815 Tumore *in vivo*

Je 6x10⁵ naive P815 Zellen wurden subkutan in DBA/2 Mäuse injiziert. Jede Maus erhielt insgesamt 2x10⁸ pfu MVMp Wildtyp Viren, die auf drei Tage verteilt (Tag 3,7 und 9) direkt in den etablierten Tumor oder in dessen direkte Umgebung injiziert wurden. Das Tumorvolumen wurde regelmäßig gemessen.

Der starke antitumorale Effekt des MVMp Wildtyp Virus in den *ex vivo* Versuchen konnte im *in vivo* Versuch nicht erzielt werden. Zwar war tendenziell ein geringeres Tumorvolumen bei den mit MVMp behandelten Tumoren zu beobachten, vor allem gegen Ende des Versuches, aber der Unterschied war nicht signifikant. War im *ex vivo* Versuch bereits eine geringe Menge an Virus (moi 1) ausreichend für eine Eliminierung der Tumorzellen, so konnte beim *in vivo* Versuch ein Vielfaches an Virus das Tumorwachstum nur gering reduzieren.

Diese Pilotversuche zeigen, dass eine Therapie *in vivo* sehr viel schwieriger und problemreicher ist als eine *ex vivo* Infektion unter Standardbedingungen und hohen Ausbeuten. Sogar bei einem sehr empfindlichen Modell wie den P815 Zellen wird *in vivo* sehr viel mehr Virus benötigt als für einen ex vivo Versuch. Dafür gibt es verschiedene Gründe. Zum einen werden durch die lokale Virusinjektion weniger Tumorzellen infiziert. Das Tumorgewebe ist meist heterogen und kann viele schlecht infizierbare nicht-Tumorzellen (zum Beispiel Bindegewebszellen) enthalten, in denen das Virus wahrscheinlich abgefangen wird und wirkungslos bleibt. Zum anderen könnte das Virus durch körperliche Abwehrmechanismen inaktiviert oder über die Blutbahn abtransportiert werden. Eine weitere Möglichkeit

ist, dass das Virus die Tumorzelle durch eine erschwerte Diffusion im dichten Zellgewebe nicht erreicht.

Für *in vivo* Versuche müssen diese vorliegenden Bedingungen daher von Beginn an berücksichtigt werden. Von Vorteil wäre, das Targeting der Viren zu verbessern, zum Beispiel über chemotaktische Signale oder Liganden auf der Virushülle, die das Virus zur Tumorzelle leiten oder den Kontakt dazu erleichtern.

Trotz des geringen Effektes *in vivo* bleibt das Mastozytom Modell P815 für eine Therapie mit MVMp Wildtyp Viren interessant. Es könnte für Tumorvakzinierungsversuche verwendet werden. Durch die virale Lyse der Zellen durch MVMp Wildtyp Viren können Tumorantigene freigesetzt und *in vitro* von Dendritischen Zellen aufgenommen werden, im Sinne einer adoptiven Therapie, so dass die *crosspresentation* und Aktivierung tumorspezifischer T-Killerzellen gefördert wäre.

3 Das renale Adenokarzinom RENCA als murines Tumormodell

Da P815 Zellen nicht für rekombinante, auf MVMp-basierende Viren empfänglich waren, musste ein anderes oft angewandtes Modell gefunden werden, das tumorigen, möglichst wenig immunogen, trotzdem aber MHC–Klasse I positiv, und natürlich mit den gewünschten Parvoviren infizierbar ist.

Einige verfügbare Zelllinien (RENCA, B78/H1, TS/A und H5V) wurden auf ihre Infizierbarkeit mit rekombinantem MVMp/IL-2 Virus getestet und mit der Standard-Zelllinie A9 verglichen. Produziertes IL-2 wurde nach 3 Tagen aus dem Zellkulturüberstand mit einem IL-2 ELISA detektiert (Abb. 27).

Alle tumorigenen Zelllinien produzierten deutlich weniger Transgen (IL-2) als die Standardzellen A9. A9 Zellen wurden bisher noch nicht als Tumormodell charakterisiert. Von den anderen etablierten Tumormodellen stellten die RENCA und B78/H1 Zellen die besseren Produzenten dar. Da B78/H1 MHC–Klasse I negativ ist, fiel die Wahl auf die verfügbaren RENCA Zellen, die einem renalen Adenokarzinom einer Maus entstammen.

50



Abb. 27: IL-2 Produktion verschiedener Zelllinien nach Infektion mit MVMp/IL-2 Viren Je 5x10³ A9, RENCA, B78/H1, TS/A und H5V Zellen wurden in eine 96-Lochplatte ausgesät und mit rekombinanten MVMp/ IL-2 Viren (moi 10 ru/Zelle) infiziert. 3 Tage nach Infektion wurde die IL-2 Konzentration des Zellkulturmediums mit einem IL-2 ELISA bestimmt und auf 10⁶ Zellen berechnet.

3.1 RENCA ist MHC-Klasse I positiv

Da für die Tierversuche neben den Chemokin-Transgenen MDC und IP-10 das T-Zellaktivierende Cytokin IL-2 als Transgen verwendet werden sollte, war besonders wichtig, dass die Zelllinie tatsächlich MHC-Klasse I positiv ist.

Unbehandelte RENCA Zellen wurden mit den spezifischen anti-MHC–Klasse I Antikörpern anti-H2-K^d und anti-H2-L^d inkubiert, die wiederum mit FITC-markierten anti-Maus Antikörpern detektiert wurden. Als Kontrolle dienten P815 Zellen, die den gleichen Hintergrund (H2^d) haben. Eine FACS-Analyse bestätigte, dass beide Zelllinien MHC–Klasse I positiv sind, da sich die spezifischen Fluoreszenzen jeweils deutlich vom Hintergrund (mock) abhoben (Abb. 28).





Je $5x10^5$ unbehandelte RENCA oder P815 Zellen wurden mit 50 µl anti-MHC–Klasse I Antikörpern (anti-H2-L^d oder anti-H2-K^d) 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen des Zellsediments wurde es mit 50µl eines *goat-anti-mouse*-FITC Antikörpers erneut für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 500µl FACS-Medium aufgenommen und die Fluoreszenz des FITC in einem Durchflußzytometer (FACS) detektiert. Die Kontrolle (mock) besteht aus Zellen, die nur mit dem zweiten Antikörper (*goat-anti-mouse*-FITC) inkubiert wurden und somit die Hintergrundfluoreszenz anzeigen.

3.2 Charakterisierung der parvoviralen Infektion in RENCA in vitro

Für eine genaue Charakterisierung der parvoviralen Infektion in RENCA Zellen wurden *in vitro* die Wildtyp Virusproduktion, Transgenexpression und zytotoxische Eigenschaften von Parvoviren in diesen Zellen näher untersucht.

3.2.1 MVMp Wildtyp Virusproduktion

Die Fähigkeit einer Zelle, nach Infektion neue Nachkommenviren zu produzieren, ist unter anderem ein Indiz für eine gute Genamplifikation bzw. Genexpression. Viele Zellen mit hoher Genexpression sind auch gute Virus-Produzenten, zum Beispiel A9, NBK und 293T Zellen. Es gibt jedoch auch Ausnahmen. In diesen Fällen weisen Zellen trotz ihres Unvermögens, Nachkommenviren zu bilden, eine gute Transgenexpression oder Zell-Lyse auf, wie zum Beispiel HeLa und Glioma 261 Zellen. Die Fähigkeit einer Zelle, Wildtypviren neu zu produzieren, ist also letztendlich nicht für ihre Infizierbarkeit entscheidend, aber dennoch ein wichtiges Indiz.

Daher wurde die MVMp Wildtyp Virusproduktion in RENCA Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten A9 Zellen, die als gute Produzenten bekannt sind. Die Zellen wurden mit MVMp infiziert, pro Tag jeweils eine Gruppe eingefroren und die gewonnenen Virussuspensionen auf A9 Zellen mittels Plaque-Assay titriert (Abb. 29).





Je 2x10⁵ RENCA und A9 Zellen wurden in 6 cm Schalen ausgesät und mit moi 0,1, 1 und 10 pfu/Zelle infiziert. Nach 2 h und dann täglich wurden die Zellen jeweils geerntet und eingefroren. Nach drei Frier-Tau-Zyklen wurden die fragmentierten Zellreste durch Zentrifugation abgetrennt und die gewonnenen Virussuspensionen mittels Plaque-Assay auf A9 Zellen titriert.

Mit dieser Methode werden nur infektiöse Viren erfasst, allerdings kann nicht zwischen *Input* und neu produzierten Viren unterschieden werden. Nach 2 h konnte

in allen Fällen ein Abfall an infektiösen Viren in der Zelle festgestellt werden, wenn man vom theoretischen *Input* (Tag 0) ausgeht. Das liegt an der beginnenden Dekapsidierung der Viren nach ihrem Eintritt in die Zelle, da nackte virale DNA allein nicht infektiös ist. Nach einem Tag waren dann die ersten neugebildeten Viren detektierbar.

Die Wildtyp Produktion in A9 Zellen (200 Viren pro Zelle) entsprach den Erwartungen, während RENCA Zellen im Vergleich dazu etwa 1000 mal weniger Nachkommenviren produzierten (0,2 Viren pro Zelle). Bei beiden Zellen konnte eine gleiche Kinetik beobachtet werden. Das Ausmaß war bei RENCA Zellen jedoch deutlich geringer, bei keiner moi wurde hier das anfängliche Virus-Inokulum (Tag 0) überschritten. All dies deutet darauf hin, dass in RENCA Zellen keine erneute Infektion von benachbarten Zellen erfolgte, da wahrscheinlich nur wenige Nachkommenviren gebildet wurden, die entweder in der Zelle blieben oder eine Reinfektion auf andere Weise verhindert war. Die Abnahme an infektiösen Wildtyp Viren ab dem Tag 2 wäre dadurch zu erklären, dass in der Zelle verbleibende Viren abgebaut werden.

3.2.2 Zytotoxizität

Wie bereits erwähnt sind die zytotoxischen Eigenschaften der Parvoviren von großer Bedeutung für eine Krebstherapie. Viruspermissive Tumorzellen wären daher optimal für sogenannte präklinische Versuche in immunkompetenten Mäusen. Es wurden verschiedene Methoden angewandt, um das zytotoxische Potenzial von Parvoviren in RENCA Zellen zu definieren.

Zunächst wurde mit MVMp Wildtyp Virus die in diesen Zellen maximal mögliche Virus-vermittelte Zytotoxizität bestimmt. RENCA Zellen wurden mit MVMp verschiedener moi infiziert und ihr Wachstum täglich mit nicht infizierten Zellen verglichen (Proliferationstest, Abb. 30/A). In einem Parallelversuch wurde die Klonbildungsfähigkeit der gleichen Zellen nach Infektion untersucht (Klonbildungstest, Abb. 30/B).



Abb. 30: Zytotoxizität des MVMp Wildtyp Virus in RENCA Zellen

A) Proliferationstest: Je 4x10⁵ Zellen wurden mit moi 1, 10 und 20 pfu/Zelle infiziert und das Wachstum mit nicht infizierten Zellen (mock) verglichen. Täglich wurde die Anzahl vitaler Zellen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt.

B) Klonbildungstest: Je 6x10⁵ Zellen wurden mit moi 2, 5, 10 und 20 pfu/Zelle infiziert und in verschiedenen Zellverdünnungen wieder ausgesät. Die Klonbildung wurde beobachtet und die Klone bei geeigneter Größe, nach etwa 1-2 Wochen, mit Kristallviolett angefärbt, ausgezählt und mit der Negativkontrolle (mock) ins Verhältnis gesetzt. Beide Versuche erfolgten parallel unter Verwendung gleicher Zellen und Virusverdünnungen.

In beiden Versuchen war eine moi-abhängige Zytotoxizität des Wildtyp Virus zu beobachten. Bei einer niedrigen moi (1 oder 2) war der Effekt sehr gering und unterschied sich nicht signifikant von dem der mock-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied lag dagegen bei moi 10 vor. Dies wurde zwar noch von moi 20 übertroffen, allerdings kann bei höherer moi keine direkte Proportionalität zwischen Virus-*Input* und Infektions-*Output* erwartet werden. Zudem ist es grundsätzlich günstiger nur minimal benötigte Virusmengen einzusetzen. Daher wurde für alle tierexperimentellen Versuche und Vorversuche mit RENCA Zellen eine moi von 10 (ru oder pfu pro Zelle) eingesetzt. Im Vergleich zu den sensitiven A9 Zellen, die bei moi 10 vollständig absterben, bzw. keine Klone mehr bilden, ist die Zytotoxizität in den RENCA Zellen jedoch sehr gering.

Da in anderen sensitiven Zellen (A9, NBK) bereits festgestellt wurde, dass Wildtyp Viren zytotoxischer sind als rekombinante Viren (Kap. 1.6), war dies auch in den RENCA Zellen zu erwarten. Für einen Vergleich von Wildtyp und rekombinanten Viren in diesen Zellen wurde ein Zytotoxizitätstest mit einer Alamar Blue® Indikatorlösung durchgeführt (Abb. 31).

54


Abb. 31: Zytotoxizität des MVMp Wildtyp und rekombinanten MVMp/IL-2 Virus im Vergleich Je $3x10^3$ A9 und RENCA Zellen wurden in eine 96-Lochplatte ausgesät und mit MVMp und MVMp/IL-2 Viren in moi 1 und 10 ru/Zelle infiziert Nach Nach 3 Tagen wurden 10 µl des Reagenz Alamar Blue® dem Zellkulturmedium zugegeben und der Farbumschlag nach 3 Stunden Inkubation (bei 37°C) bei der der dualen Wellenlänge von 540 zu 620 nm gemessen. Das Überleben der Zellen wurde jeweils mit dem von nicht infizierten Zellen (mock) ins Verhältnis gesetzt.

Wie bereits erwartet war die Zytotoxizität nach Infektion mit rekombinantem MVMp/IL-2 Virus geringer als mit Wildtyp Virus. Da aber die RENCA Zellen sowieso schon resistenter sind als zum Beispiel A9 Zellen, konnten kaum Unterschiede zwischen den zytotoxischen Effekten von Wildtyp und rekombinanten Viren festgestellt werden. Diese Beobachtung trifft meist auch für andere Tumormodelle (zum Beispiel B78/H1, H5V) zu. Bisher sind nur wenige murine Tumormodelle bekannt, die für die Zytotoxizität rekombinanter MVMp Viren empfänglich sind, wie zum Beispiel vor kurzem bei den Glioma Gl 261 Zellen entdeckt wurde (unveröffentlichte Ergebnisse von M. Enderlin).

3.2.3 Transgenexpression

Für die Anwendung rekombinanter Parvoviren in der Krebsgentherapie ist eine gute Transgenexpression absolut erforderlich. Wie bereits in Abb. 27 zu sehen war, zeigten RENCA Zellen im Vergleich zu anderen Tumormodellen, die zur Zeit der Untersuchungen bekannt und verfügbar waren, eine gute Expression des Transgens. Eine wichtige Frage ist aber auch, wann die Produktion den Höhepunkt erreicht und ob das sezernierte Protein in dem Zellmedium stabil ist.

Da für die Tierversuche MVMp/IL-2 und MVMp/MDC die wichtigsten rekombinanten Viren darstellten, wurde eine Kinetik der Transgenexpression in RENCA Zellen für moi 10 durchgeführt. Für die Bestimmung der Proteinproduktion wurde täglich der Überstand einer Kultur abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Für die Stabilitätsprüfung und Bestimmung der akkumulierten Gesamtmenge an Protein pro Tag wurde täglich eine nach der Infektion noch unberührte Kultur analysiert (Abb. 32).





In 6-Lochplatten wurden je $5x10^4$ RENCA Zellen mit rekombinanten MVMp/IL-2 oder MVMp/MDC Viren mit moi 10 ru/Zelle infiziert. Für die Bestimmung der Proteinproduktion pro Tag wurde täglich der Überstand derselben Kultur abgenommen und durch frisches Medium ersetzt ("täglich"). Der Überstand wurde zentrifugiert und in Aliquots bei -70° C eingefroren. Für die Stabilitätsprüfung und Bestimmung der täglich akkumulierten Gesamtmenge an Protein wurde an jedem Tag der Überstand einer seit der Infektion unberührten Kultur auf gleiche Weise bearbeitet ("akkumuliert"). Nach Versuchsende wurde mit den eingefrorenen Überständen ein IL-2 bzw. MDC ELISA durchgeführt und die jeweilige Proteinkonzentration pro 10^6 Zellen berechnet.

Für beide ELISA ergab sich in etwa das gleiche Muster, das schon für andere Zellmodelle im Labor erhalten wurde: die Transgenproduktion war von Tag 2 bis 4 am stärksten und erreichte ein Maximum am Tag 3 (IL-2: 1,27 µg , MDC: 0,37 µg). Danach nahm die Produktion stetig ab und war nach einer Woche kaum noch detektierbar. Trotz Verwendung gleicher moi führten beide Viren in den gleichen Zellen zu unterschiedlichen Transgenkonzentrationen. Dies kann auf den ELISA zurückgeführt werden, da verschiedene spezifische Erstantikörper (für IL-2 und MDC) verwendet wurden und generell hohe Schwankungen bei dieser Methode zu erwarten sind, die durch Standardisierungen im gleichen System ausgeglichen werden sollen. Zudem handelte es sich bei dem IL-2 ELISA um einen kommerziell käuflichen ELISA (*Pharmingen*), während ein spezifischer MDC ELISA noch nicht zur Verfügung stand und von dem Kooperationslabor in Mailand (*Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano, Italy*), die dieses Chemokin entdeckten, durchgeführt wurde.

Das Zytokin IL-2 war im Zellkulturüberstand sehr stabil, da die akkumulierte Menge nicht abgenommen hatte.

Das Chemokin MDC ist zumindest für einige Tage im Zellkulturmedium stabil, lediglich am Tag 7 war ein Abfall der Konzentration im Überstand zu beobachten.

Für die Bestimmung der prozentualen Transgenexpression in RENCA Zellen eignet sich die Methode der Durchflusszytometrie, kurz FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) genannt, die eine quantitative Analyse (Dichte, Fluoreszenz, Größe) von Partikeln, zum Beispiel Zellen, im Flüssigkeitsstrom ermöglicht. Somit lässt sich der tatsächliche Anteil grün fluoreszierender Zellen von der mit MVMp/EGFP (Transgen EGFP: *enhanced green fluorescent protein*) infizierten Zellkultur genau bestimmen.

RENCA und als Kontrolle A9 Zellen wurden mit MVMp/EGFP Virus infiziert und nach 2 und 3 Tagen mit der FACS auf EGFP-positive Zellen analysiert (Tab. 11).

	RENCA		А9	
moi	2 Tage	3 Tage	2 Tage	3 Tage
1	2,9	2,9	19,6	45,0
5	5,8	5,3	46,7	63,4
10	6,2	8,4	52,9	76,0
20	8,4	9,7	59,9	79,2

Tab. 11: EGFP Expression in MVMp/EGFP-infizierten RENCA und A9 Zellen

Je 1x10⁵ RENCA und A9 Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und mit MVMp/EGFP Virus in moi 1, 5, 10 und 20 ru/Zelle infiziert. 2 und 3 Tage nach Infektion wurde der Anteil fluoreszierender Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen mittels FACS Analyse bestimmt und in % angegeben. Die Prozentwerte beziehen sich jeweils auf die gesamte Zellpopulation und nicht nur auf die anfangs infizierte Zellanzahl.

Mit zunehmender moi konnte jeweils ein höherer Anteil EGFP fluoreszierender Zellen in der gesamten Zellpopulation beobachtet werden. Für RENCA Zellen betrug er bei moi 10 6,2 % (2 Tage nach Infektion) bzw. 8,4 % (3 Tage nach Infektion). Bei A9 Zellen konnten dagegen bei gleicher moi etwa 10 mal mehr grün fluoreszierende Zellen nachgewiesen werden: 52,9 % (2 Tage nach Infektion) bzw. 76,0 % (3 Tage nach Infektion). Dadurch wird erneut deutlich, dass die RENCA Zellen im Vergleich zu A9 Zellen ein relativ resistentes Modell darstellen.

3.3 Antitumorale Effekte rekombinanter Parvoviren im syngenen Tumormodell RENCA – Balb/c Maus

Die Effizienz zweier rekombinanter H1 Viren im menschlichen Tumormodell HeLa/Nacktmaus wurde bereits getestet: hH1/IL-2 (Haag *et al.*, 2000) und hH1/MCP-3 (Wetzel *et al.*, 2001). Es zeigte sich, dass die Therapie der humanen Zervixkarzinomzellen mit diesen Parvoviren erfolgreich war und die antitumorale Wirkung des Wildtyp Virus H1 durch Vermittlung eines immunstimulierenden Transgens (IL-2 oder MCP-3) erheblich gesteigert werden konnte. Da Nacktmäuse nahezu T-Zell-defizient sind, sollte die Effizienz nun in einem dem Menschen besser angepassten System untersucht und auch der Einfluss der Immunantwort analysiert werden. Es wurde daher mit immunkompetenten Mäusen und einem dazu syngenen Tumormodell gearbeitet.

Aufgrund der Vorversuche (Kap. 3.2) und der zu Beginn des Kap. 3 aufgelisteten Gründe (tumorigenes, kaum immunogenes, MHC-Klasse I positives und infizierbares Modell), konnte das RENCA/Balb/c Mausmodell zu diesem Zeitpunkt als am besten dafür geeignet angesehen werden. Es kann außerdem zur Studie einer Kombinationstherapie von Zytokin- und Chemokin-transduzierenden Parvoviren verwendet werden, da es ein relativ virusresistentes Modell ist und der zytotoxische Effekt der Parvoviren in den RENCA Tumorzellen geringer ist als zum Beispiel in HeLa Zellen. Somit kommt dem Transgen beim direkten antitumoralen Effekt eine größere Bedeutung zu, während das Parvovirus selbst hauptsächlich die Vorarbeit leistet und für eine hohe Transgenexpression am Wirkungsort sorgen soll.

3.3.1 Antitumorale Effekte von MVMp/IL-2 und MVMp/MDC Viren

Um einen Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen mit hH1/IL-2 (Haag *et al.*, 2000) zu haben, wurde das dazu äquivalente Virus MVMp/IL-2 verwendet, das Mäusezellen infizieren kann. Es sollte auch getestet werden, ob eine Kombination mit MVMp/MDC Virus, dessen tumorsuppressiven Effekte noch unbekannt waren, die antitumorale Wirkung des MVMp/IL-2 Virus noch steigern kann.

Um möglichst viele der weniger gut infizierbaren RENCA Zellen mit Virus zu treffen, wurde zunächst mit *ex vivo* Versuchen begonnen, bei denen die Zellen *in vitro* mit Virus infiziert (moi 10) und erst danach in die Maus implantiert wurden. Als Kontrolle dienten nicht infizierte (mock) und MVMp-infizierte Zellen. Es wurden mehrere Tierexperimente durchgeführt, wobei ein repräsentativer Versuch in Abb. 33 dargestellt ist.



Abb. 33: Antitumorale Effekte rekombinanter MVMp/IL-2 und MVMp/MDC Viren im Tumormodell RENCA- Balb/c Maus

RENCA Zellen wurden mit MVMp/IL-2, MVMp/MDC, beide in Kombination und MVMp Wildtyp Viren in einer gesamt-moi von 20 ru/Zelle infiziert (*in vitro*) und davon jeweils $2x10^5$ Zellen pro Balb/c Maus subkutan implantiert. Um die Kombinationsgruppe (moi 10+10) zu kontrollieren, wurden bei beiden Einzelgruppen (je moi 10) jeweils MVMp/ Δ 800 Viren (moi 10) hinzugefügt, während die Wildtyp Virus Gruppe von vornherein eine moi von 20 erhielt. Jede Gruppe umfasste 8 Mäuse. Das Tumorvolumen wurde regelmäßig gemessen und in mm³ angegeben.

Beide rekombinanten Viren, MVMp/IL-2 und MVMp/MDC, zeigten antitumorale Effekte im Tumormodell RENCA– Balb/c Maus. Dieser Effekt ist hauptsächlich auf das transduzierte Transgen (IL-2 oder MDC) zurückzuführen, da sich die Wildtyp Gruppe nicht signifikant von der mock Gruppe unterschied. Die antitumorale Wirkung des MVMp/IL-2 Virus war stets stärker als die des MVMp/MDC Virus. Die Kombination beider Viren führte jedoch nicht zu einem deutlich langsameren Tumorwachstum als nur die Infektion mit MVMp/IL-2 allein. Somit konnte durch eine Kombination keine stärkere Tumorsuppression bewirkt werden.

Das **MVMp/IL-2** Virus bewirkte einen frühen antitumoralen Effekt, indem die Tumorbildung stark verzögert war (signifikant für 8 Tage, Abb. 34). Sobald allerdings Tumore gebildet worden waren, wuchsen sie in gleichem Maße wie in den Kontrollgruppen (Abb. 35).



Abb. 34: Verzögerte Tumorbildung durch MVMp/IL-2 Viren

Versuchsbeschreibung siehe Abb. 33. Im Diagramm ist der zeitliche Ablauf der Tumorentstehung dargestellt und die Anzahl der Mäuse, die einen sichtbaren Tumor unter der Haut trugen, in % angegeben. Nach 50 Tagen erhielten beide ohne Tumor gebliebenen Mäuse ein *Challenge* mit jeweils $2x10^5$ naiven RENCA Zellen.



Abb. 35: Verzögertes Tumorwachstum durch MVMp/MDC Viren

Versuchsbeschreibung siehe Abb. 33. Im Diagramm ist das Tumorwachstum dargestellt. "Tag 0" entspricht jeweils dem Tag jeder einzelnen Maus, an dem zum ersten Mal ein Tumor detektiert wurde. Dabei wurde der tatsächliche Tag der Tumorentstehung nicht berücksichtigt. Die einzelnen Werte wurden dann wieder in Gruppen zusammengefasst. Das Tumorwachstum der Mäuse kann somit direkt miteinander verglichen werden.

Das **MVMp/MDC** Virus vermittelte dagegen eine später eintretende antitumorale Wirkung, da zunächst zur gleichen Zeit sichtbare Tumore entstanden wie in den Kontrollen (Abb. 34), die dann aber verlangsamt wuchsen (signifikant für die Zeitpunkte 3 und 4, Abb. 35). In der Kombinationsgruppe waren sowohl die später eintretende Tumorbildung (durch MVMp/IL-2) als auch ein verlangsamtes Tumorwachstum (durch MVMp/MDC) zu beobachten, so dass der Versuch in sich bestätigt wurde.

Wie in Abb. 34 zu sehen ist, blieben zwei Tiere ohne Tumor, eine Maus der IL-2- und eine Maus der Kombinations-Gruppe, was bei einer Gruppengröße von 8 Tieren jeweils 12 % entspricht. An beiden Mäusen wurde nach 50 Tagen ein Challenge vorgenommen, wobei naive RENCA Zellen in gleicher Menge wie beim ersten Mal verwendet wurden. Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Die Kontrollmäuse, sowie die Maus der IL-2 Gruppe enwickelten in kurzer Zeit einen Tumor, während die Maus der Kombinationsgruppe überraschenderweise tumorfrei blieb. Diese Maus überlebte auch noch 2 weitere Challenges, die 5 und 9 Monate nach dem ersten Challenge mit jeweils derselben Anzahl an naiven RENCA Zellen durchgeführt wurden. Um feststellen zu können, ob die fast ein Jahr andauernde antitumorale Immunität auch tumorspezifisch war, wurde ein weiteres Challenge mit einer anderen Tumorart (Mammakarzinom TS/A) der gleichen Abstammung (Balb/c Maus) vorgenommen. Tatsächlich bildete sich in Kürze ein Tumor, so dass die in dieser Maus entwickelte Immunität tumorspezifisch und wahrscheinlich auf die Behandlung der Tumorzellen mit den rekombinanten Viren MVMp/IL-2 und MVMP/MDC in Kombination zurückzuführen war. Diese eine Maus ist jedoch nicht repräsentativ für die ganze Gruppe. Deshalb wurden Versuche unternommen, dieses Ergebnis mit mehreren Tieren zu erhalten, indem insgesamt höhere Dosen an Virus verabreicht wurden. Allerdings führten diese Bemühungen zu keinem Erfolg, da die Tiere stets Tumore entwickelten und die Versuche damit bereits an der ersten Hürde scheiterten.

3.3.2 Nachweis der IL-2 Aktivität im Tumor in vivo

In einem weiteren Versuch wurde die Aktivität der MVMp/IL-2 und MVMp/MDC Viren auch direkt im Tumor überprüft. 3 Tage nach Injektion einer größeren Anzahl an infizierten RENCA Zellen (jeweils moi 10 ru/Zelle) wurden die Tumorzellen isoliert und mittels RT-PCR (*Reverse Transcriptase* Polymerasekettenreaktion) auf wichtige Mediatoren der Immunabwehr analysiert (Abb. 36).



Abb. 36: RT-PCR von ex vivo infizierten RENCA Tumoren in Balb/c Mäusen

RENCA Zellen wurden *in vitro* mit MVMp/ Δ 800, MVMp/IL-2, MVMp/MDC (je moi 10 ru/Zelle), mit den beiden letzteren Viren in Kombination (je moi 5 ru/Zelle) oder mock infiziert und davon jeweils 7x10⁵ Zellen pro Balb/c Maus subkutan injiziert. Nach 3 Tagen wurde die weißlich sichtbare Tumorzellanhäufung isoliert und die RNA extrahiert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und dann in mehreren PCR Reaktionen eingesetzt. Dabei wurden Marker für (A) das *Housekeeping Gene* HPRT, (B) die in den Viren entaltenen Gene NS1, MDC und IL-2, sowie (C) T- und NK-Zellaktivität und (D) Makrophagenaktivität anzeigende Mediatoren verwendet. Die letzte Spalte (–) stellt eine ausschließlich Wasser entaltende Probe zur Kontrolle der PCR dar.

Bei keiner PCR konnte ein Signal mit der methodischen Kontrolle ("—"), die ausschließlich Wasser enthielt, detektiert werden, so dass eine Kontamination der Proben und ein falsch-positives Ergebnis ausgeschlossen werden kann. Die PCR aller Proben mit einem Marker für das in allen Zellen enthaltene *Housekeeping Gene* HPRT (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase) kontrollierte, ob von den Proben gleiche Mengen an RNA für den Versuchsansatz eingesetzt wurden (A). Da alle Banden eine ähnliche Intensität aufwiesen, kann davon ausgegangen werden. Die viralen Kontrollen, Marker für NS1, IL-2 oder MDC Gene (B), zeigten ebenfalls das erwartete Muster und bestätigten einen korrekten Versuchsablauf: bei allen mit Virus infizierten Zellen konnten NS1 Transkripte in geicher Menge nachgewiesen werden, IL-2 und MDC Transkripte dagegen nur bei MVMp/IL-2 oder MVMp/MDC infizierten Zellen.

Bei MVMp/IL-2 infizierten Tumorzellen konnte eine starke Aktivierung von T-Zellen beobachtet werden. Im Vergleich zu mock oder MVMp/ Δ 800 infizierten Zellen wurden bei IL-2 transduzierten Tumorzellen mehr Transkripte sowohl von den direkt zytotoxischen Mediatoren Granzym B und Perforin, als auch von dem vielseitig agierenden IFN- γ detektiert, was auf eine IL-2 induzierte Aktivierung der immunologischen Mediatoren schließen lässt (C; ++: starke Aktivierung, +: mäßige Aktivierung).

In MVMp/MDC infizierten Tumorzellen konnte keine spezifische Aktivierung der untersuchten Effektorzellen festgestellt werden. Bei den Transkripten für iNOS und cox-2 war kein Unterschied zwischen infizierten und unbehandelten Tumorzellen festzustellen. Man kann daher annehmen, dass keine spezifische Aktivierung von Makrophagen durch die virale Therapie stattgefunden hat.

3.3.3 Antitumorale Effekte von MVMp/IL-2 und MVMp/IP-10 Viren

Es wurde noch eine weitere Kombination von Zytokin- und Chemokintransduzierenden Viren auf ihre Effizienz hin untersucht. Das Chemokin IP-10 besitzt ebenso wie IL-2 einen starken antitumoralen Effekt, der im Hämangiosarkom Modell H5V durch Therapie mit dem rekombinanten MVMp/IP-10 Virus bestätigt werden konnte (Giese *et al.*, 2002). Somit stellte sich die Frage, ob die antitumorale Wirkung der Viren MVMp/IL-2 und MVMp/IP-10 durch eine Kombination von beiden potenziert werden kann.

Es wurde wiederum ein *ex vivo* Versuch durchgeführt, bei dem RENCA Zellen mit beiden Viren unter Verwendung einer Gesamt-moi von 10 infiziert und Mäusen implantiert wurden (Abb. 37).

Wie erwartet zeigten beide Viren antitumorale Effekte. MVMp/IL-2 Viren verzögerten die Tumorentstehung, während MVMp/IP-10 Viren, ähnlich wie MVMp/MDC Viren im zuvor beschriebenen Versuch, das Wachstum der frühzeitig gebildeten Tumore verringerten. Eine Kombination beider Viren führte aber wider Erwarten nicht zu einer Verstärkung des antitumoralen Einzeleffektes beider Viren.

Dies konnte später auch im Hämangiosarkom-Modell H5V bestätigt werden (Giese, unveröffentlichte Ergebnisse).



Abb. 37:Antitumorale Effekte rekombinanter MVMp/IL-2 und MVMp/IP-10 Viren im Tumormodell RENCA– Balb/c Maus

RENCA Zellen wurden jeweils mit MVMp/IL-2 und MVMp/IP-10 in moi 10 ru/Zelle, sowie beide in Kombination mit einer jeweiligen moi von 5 *in vitro* infiziert. Davon wurden pro Balb/c Maus $2x10^5$ Zellen subkutan implantiert. Jede Gruppe umfasste 5 Mäuse. Das Tumorvolumen wurde regelmäßig gemessen und in mm³ angegeben.

4 Die Immunogenität des MVMp Wildtyp Virus in C57Bl/6 Mäusen

Bei einem Einsatz der Parvoviren in der Gentherapie muss neben der Effizienz auch die Sicherheit der Therapie gewährleistet sein. Dabei spielen körpereigene Abwehrreaktionen gegen das Virus eine bedeutende Rolle. Zum einen kann die therapeutische Wirkung durch eine antivirale Immunantwort inhibiert werden, zum anderen kann die virale Stimulierung des Immunsystems toxische Effekte im Patienten bewirken. Daher ist eine Studie der immunologischen Reaktionen auf die Viren unerlässlich.

Meine Arbeit beschränkte sich auf die Analyse der Immunogenität des MVMp Wildtyp Virus in C57Bl/6 Mäusen, die aufgrund von vielen Tumormodellen gut charakterisiert sind und auch schon für gentherapeutische Versuche mit Parvoviren verwendet wurden (Giese *et al.*, 2001; Wetzel, 2000). Es wurden zunächst nur Wildtyp Viren verwendet, da diese im Vergleich zu rekombinanten Viren zur Zeit in größeren Mengen und dabei geringerem Aufwand produziert werden können. Ziel ist jedoch, auch die Immunantwort auf eine Infektion mit rekombinanten Parvoviren zu analysieren, wobei die Ergebnisse der Studie mit Wildtyp Viren berücksichtigt werden können.

4.1 Zelluläre Immunantwort auf eine Infektion mit MVMp Wildtyp Virus

Über die zelluläre Immunantwort auf eine parvovirale Infektion ist noch nichts bekannt, daher war deren Untersuchung von besonderem Interesse. Sie kann über die Ermittlung der für Virus spezifischen zytotoxischen T- oder NK-Zellaktivität bestimmt werden. Eine seit langem dafür etablierte Methode ist der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest, mit dem eine antigenspezifische T-Zellaktivität nachgewiesen werden kann. Um den Versuch gut kontrollieren zu können, wurde die Methode zunächst für das Vacciniavirus (VV) standardisiert, das für seine starke Immunogenität bekannt ist und bei dem eine spezifische T-Zellzytotoxizität erwartet werden kann.

4.1.1 Etablierung einer Positivkontrolle mit Vacciniavirus

Vacciniaviren sind in der Lage, ein breites Spektrum an Zellen zu infizieren. Auch die im Experiment zu verwendenden Zielzellen MC57G, sogenannte Standardzellen für den T-Zellzytotoxizitätstest, waren für eine Infektion mit Vacciniaviren empfänglich. Nach Infektion zeigten sie deutliche morphologische Veränderungen, die sich bereits nach wenigen Stunden durch ein leichtes Abrunden der Zellen abzeichneten. Nach etwa 20 h war ein verstärktes Abschwemmen und schließlich die Lyse der Zellen zu beobachten.

Für den zytotoxischen T-Zelltest wurde eine Maus mit Vacciniavirus immunisiert und ihre Milzzellen mit bestrahlten, Vacciniavirus-infizierten MC57G Zellen *in vitro* erneut stimuliert. Die dabei entwickelte antivirale T-Zellaktivität wurde in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest mit Vacciniavirus-infizierten Zielzellen (MC57G) bestimmt. Da die Infektion dieser Zellen mit Vacciniaviren aus zelltoxischen Gründen nicht länger als 20 h dauern sollte, wurden dafür zwei Infektionszeitspannen (8 und 16 h) getestet (Abb. 38).



Abb. 38: Zytotoxische Aktivität von Milzzellen einer Vacciniavirus immunisierten Maus

Eine Maus wurde mit $2x10^7$ pfu Vacciniavirus i.p. immunisiert und ihre Milzzellen nach 6 Tagen mit bestrahlten Vacciniavirus-infizierten MC57G Zellen für 6 weitere Tage *in vitro* stimuliert. Ein ⁵¹Chrom-Freisetzungstest wurde mit MC57G Targetzellen, die zuvor 8 oder 16 h mit Vacciniaviren (moi 5) infiziert wurden, durchgeführt. Die spezifische Lyse von Zielzellen (mock oder infiziert) ist in % angegeben (abzüglich spontaner ⁵¹Chrom-Freisetzung). Es wurden verschiedene Effektor- zu Zielzellzahl-Verhältnisse untersucht.

Wie erwartet konnte eine spezifische T-Zellaktivität in Vacciniavirus immunisierten Mäusen nachgewiesen werden, da die stimulierten Milzzellen mehr Vacciniavirus infizierte (spezifische Lyse) als nicht infizierte (unspezifische Lyse) Zielzellen lysierten. Dabei führte eine 16-stündige Infektion der Zielzellen mit Vacciniavirus, wahrscheinlich aufgrund einer besseren Antigenpräsentation, zu einer höheren spezifische Lyse. Vacciniavirus konnte somit als Positivkontrolle für den zytotoxischen T-Zelltest verwendet werden.

4.1.2 Untersuchung der CTL-Aktivität MVMp-infizierter Mäuse

Zur Bestimmung der zytotoxischen T-Zellantwort auf eine Infektion von C57Bl/6 Mäusen mit MVMp Parvovirus wurde nach der gleichen Methode verfahren, die für die Etablierung der Positivkontrolle verwendet wurde. Da die Präsentation der viralen Antigene für das Gelingen des Versuches sehr wichtig ist, wurden mehrere Möglichkeiten der Antigenvermittlung ausgetestet: die Infektion mit MVMp Wildtyp Virus, die Transfektion eines rekombinanten MVMp/EGFP Plasmids und die Infektion mit rekombinanten Vacciniaviren, die die Gene der parvoviralen Proteine NS1 (VV-NS1), NS2 (VV-NS2), VP1 (VV-VP1) und VP2 (VV-VP2) tragen. In einem Western Blot wurde die jeweilige Expression in MC57G Zellen unter Einhaltung der Versuchsbedingungen für den zytotoxischen T-Zelltest bestimmt (Abb. 39).



Abb. 39: Expression parvoviraler Proteine in MC57G Zellen

Je 1x10⁶ MC57G Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit MVMp Wildtyp Virus (moi 10 pfu/Zelle), den rekombinanten Vacciniaviren VV-NS1, VV-NS2, VV-VP1 und VV-VP2 (moi 5 pfu/Zelle), sowie vor der Transfektion mit MVMp/EGFP Virus ausgesät. Die Infektionsdauer und moi richtete sich nach den Versuchsbedingungen, die für die Vorbereitung der Stimulatorzellen verwendet wurden. Jeweils gleiche Mengen an Zellextrakten wurden im Western Blot auf die parvoviralen Proteine NS1, NS2, VP1 und VP2 analysiert.

Nach Infektion von MC57G Zellen (24 h) mit MVMp Wildtyp Viren (moi 10) konnte nur eine schwache NS1 Bande detektiert werden. Dies verdeutlichte, dass diese Zellen für das Virus kaum empfänglich sind, was auch durch eine FACS-Analyse von MVMp/EGFP infizierten MC57G Zellen bestätigt werden konnte (nur 2,5 % EGFP positive Zellen). Effektiver war dagegen eine Lipofektamin-Transfektion des MVMp/EGFP Plasmids, wobei 20 % der Zellen eine EGFP Fluoreszenz zeigten. In diesem Fall konnte eine stärkere NS1 Bande nachgewiesen werden. Die stärkste Proteinexpression lag jedoch nach Infektion mit den rekombinanten Vacciniaviren VV-NS1, VV-NS2, VV-VP1 und VV-VP2 vor.

Um sicherzugehen, dass die viralen Antigene den murinen Milzzellen während der *in vitro* Stimulierungsphase des zytotoxischen T-Zellversuches erfolgreich präsentiert werden, wurden die **Stimulatorzellen** auf allen eben beschriebenen und ausgetesteten Wegen mit Antigen beladen. Als **Zielzellen** agierende MC57G Zellen wurden vor ihrer radioaktiven Markierung mit ⁵¹Chrom entweder mit MVMp Wildtyp Virus, den rekombinanten Vacciniaviren VV-NS1, VV-NS2, VV-VP1/VV-VP2 oder mock infiziert und in dem zytotoxischen T-Zell-Test eingesetzt. Neben der Immunisierung mit Vacciniavirus (VV-VV) wurde das Experiment zudem durch eine allogene Stimulierung (allo) kontrolliert. Alle Milzzellen der C57Bl/6 Mäuse (immunisiert mit MVMp oder VV) wurden jeweils mit den Milzzellen einer Balb/6 Maus (anderer MHC Haplotyp als C57Bl/6 Mäuse) stimuliert und sollten spezifische CTLs aktivieren. Somit konnte geprüft werden, ob alle Milzzellkulturen allogen stimulierbar waren.

Wie erwartet zeigten alle positiven Kontrollen eine spezifische T-Zellaktivität, wobei die spezifische Lyse bei den allogen stimulierten Milzzellen mit 50 % deutlich höher lag als bei den Vacciniavirus immunisierten Effektorzellen (10-20 %; Abb. 40).





Mäuse wurden mit $2x10^7$ pfu Vacciniavirus (VV) oder 10^8 pfu MVMp s.c. immunisiert, ihre Milzzellen nach 10 Tagen mit bestrahlten Vacciniavirus-infizierten MC57G Zellen oder allogenen Milzzellen einer Balb/c Maus (Haplotyp H2^d) für 6 weitere Tage *in vitro* stimuliert und in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest analysiert. Vaccinia-immunisierte Effektorzellen wurden mit Vacciniavirus (VV–VV) und mock (VV–mock) infizierten Targetzellen, allogen-stimulierte Effektorzellen (allo) dagegen mit allogenen P815 Targetzellen für 6 h inkubiert. Die spezifische Lyse von Zielzellen (mock oder infiziert) ist in % angegeben (abzüglich spontaner ⁵¹Chrom-Freisetzung). Es wurden verschiedene Effektor- zu Zielzellzahl-Verhältnisse untersucht.

Dies konnte in mehreren Versuchen repliziert werden. Es kann zudem die Aussage getroffen werden, dass durch eine Infektion mit MVMp die allgemeine T-Zellaktivität nicht beeinträchtigt wird, da nach allogener Stimulierung von Milzzellen naiver und MVMp-infizierter Mäuse etwa gleich hohe spezifische allogene Lysen erzielt werden konnten. Im Gegensatz dazu war die allgemeine allogene Stimulierbarkeit nach Infektion mit Vacciniaviren geringfügig reduziert. Bei allen Effektor- zu Zielzellverhältnissen lag die spezifische Lyse der Effektorzellen von Vaccinia-infizierten Mäusen etwas unter der von naiven Mäusen.

Dagegen konnte überraschenderweise in keinem Fall der unterschiedlich stimulierten Milzzellen aus MVMp immunisierten Mäusen eine für Parvovirus spezifische Lyse nachgewiesen werden. In einigen wenigen Proben konnte Lyse, die sich vom Hintergrund abhob, detektiert werden. Allerdings handelte es sich dabei stets um eine unspezifische Lyse, da auch Zielzellen lysiert wurden, die nicht mit viralem Antigen beladen waren. Das höchste Signal überhaupt konnte nach Stimulierung der Effektorzellen mit MVMp/EGFP transfizierten Stimulatorzellen und Inkubation mit VV-NS1 infizierten Zielzellen erhalten werden (Abb. 41).



Abb. 41: NS1–spezifische Zytotoxizität MVMp/EGFP stimulierter T-Zellen

Mäuse wurden mit 10⁸ pfu MVMp s.c. immunisiert und Ihre Milzzellen nach 10 Tagen mit bestrahlten MVMp/EGFP-transfizierten MC57G Zellen für 6 weitere Tage *in vitro* stimuliert. In einem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest wurde die spezifische Lyse von VV–NS1 infizierten Zielzellen im Vergleich zu unbehandelten (mock) Zellen analysiert. Die spezifische Lyse von Zielzellen (mock oder infiziert) ist in % angegeben (abzüglich spontaner ⁵¹Chrom-Freisetzung). Es wurden verschiedene Effektor- zu Zielzellzahl-Verhältnisse untersucht.

Lediglich bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis von 100 konnte ein signifikanter Unterschied in der Lyse von antigenbeladenen und unbehandelten Zielzellen festgestellt werden. Da aber bei den daran angrenzenden Verdünnungen 200 und 50 die antigentragenden Zielzellen nicht spezifisch lysiert wurden, muss hierbei insgesamt von einer unspezifischen Lyse ausgegangen werden.

Die mikroskopische Analyse der Lymphozyten nach der *in vitro* Stimulierung zeigte zudem viele blastische (aktivierte) Lymphozyten in allogen- oder Vacciniavirusstimulierten Zellkulturen, aber nur vereinzelte nach Stimulierung mit MVMp.

Aktivierte T-Zellen produzieren bei Stimulierung IFN-γ. Daher wurden die IFN-γ Konzentrationen aus dem Überstand derselben *in vitro* stimulierten Zellkulturen, die für den Zytotoxizitätstest verwendet wurden, mittels spezifischem ELISA bestimmt (Abb. 42).





Mäuse wurden mit 10^8 pfu MVMp oder $2x10^7$ pfu Vacciniavirus s.c. immunisiert und Ihre Milzzellen nach 10 Tagen mit bestrahlten MVMp/EGFP transfizierten bzw. Vacciniavirus infizierten MC57G Zellen für 6 weitere Tage *in vitro* stimuliert. Als Kontrolle wurden auch Milzzellen naiver Mäuse auf selbige Weise stimuliert. In einem spezifischen ELISA wurde jeweils die INF- γ Konzentration des Zellkulturmediums bestimmt. Der ELISA wurde von N. Giese (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

Milzzellen von Vacciniavirus-immunisierten Mäusen produzierten signifikant höhere IFN-γ Spiegel nach Stimulierung mit Vacciniavirus *in vitro* als Milzellen von naiven Mäusen. Dies lässt auf eine Vacciniavirus-spezifische T-Zellaktivität schließen. Im Gegensatz dazu konnte bei MVMp-infizierten und naiven Mäusen nach Stimulierung mit MVMp *in vitro* kein Unterschied in der IFN-γ Produktion festgestellt werden. Somit konnte in MVMp immunisierten Kulturen keine spezifische T-Zellaktivierung gegen MVMp-Antigene nachgewiesen werden.

Da keine spezifische anti-parvovirale T-Zellaktivität detektiert werden konnte, stellt sich die Frage, ob die Immunisierung der Mäuse erfolgreich gewesen war. Daher wurden die Lymphknoten zweier Mäuse gleicher Herkunft und Alters wie die Mäuse, die für den zytotoxischen T-Zelltest vorgesehen waren, 3 Tage nach Infektion mit derselben Menge an MVMp auf virale Transkription (mittels der RT-PCR Methode) untersucht (Abb. 43). Nach Laborerfahrung eignen sich Lymphknoten sehr gut für einen Nachweis von Viren, vielleicht auch wegen ihrer kleinen, kompakten Größe (N. Giese, unveröffentlichte Daten).

Wie erwartet konnte in den Lymphknoten der MVMp-immunisierten Mäuse eine virale Transkription nachgewiesen werden, während dies nicht für die naive Maus zutraf.



Abb. 43: RT-PCR der Lymphknoten MVMp-infizierter Mäuse

Zwei Mäuse wurden mit je 10^8 pfu MVMp s.c. immunisiert (+) und ihre Lymphknoten 3 Tage später auf virale Transkripte mit der RT-PCR Methode analysiert. Eine naive Maus (–) diente als Kontrolle. Als *Primer* wurden Sequenzen vom *housekeeping gene* β -Aktin und NS1 verwendet.

Insgesamt gesehen konnte sowohl im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest als auch im INF- γ ELISA keine MVMp-spezifische zytotoxische T-Zellantwort nach Immunisierung von C57Bl/6 Mäusen mit MVMp Wildtyp Virus *in vivo* und nach Restimulierung *in vitro* detektiert werden. Dieses Ergebnis gewinnt an Aussagekraft durch den Nachweis viraler Transkripte *in vivo* und der zweifach nachgewiesenen Generierung Vacciniavirus-spezifischer zytotoxischer T-Zellen.

4.2 Humorale Immunantwort auf eine Infektion mit MVMp

Über die humorale Immunantwort ist bereits seit längerem bekannt, dass Antikörper gegen das parvovirale Kapsid und das Protein NS1 gebildet werden. Es wurden auch schon neutralisierende Aktivitäten der Anti-Kapsid-Antikörper beschrieben. Eine genaue Typisierung der antiviralen Antikörper, sowie der Einfluss der Infektion mit Parvoviren auf das gesamtkörperliche Immunglobulin Profil wurde dagegen noch nicht untersucht und in dieser Arbeit vorgenommen.

4.2.1 Bildung von IgG2a und IgG3 Antikörpern als Zeichen einer Th1-Antwort

Zur Bestimmung der durch MVMp Infektion veränderten Konzentrationsverhältnisse der Immunglobuline (Ig) im Blut wurde Serum von infizierten und unbehandelten Mäusen analysiert. Da die einzelnen Antikörperspiegel von Maus zu Maus stark variierten, wurde von jeder Maus jeweils das Verhältnis der Ig Titer zu einem Zeitpunkt vor und nach der Infektion (Ig _{nach}/ Ig _{vor}) gebildet. Bei einem gleichbleibendem Ig Niveau, was man bei unbehandelten Mäusen erwarten würde, ergibt sich somit ein Verhältnis von 1, während ein größeres Verhältnis (>1) eine Zunahme des Ig Spiegels nach der Infektion bedeutet. Die Seren wurden jeweils in spezifischen ELISAs auf die Ig Subtypen IgM, IgG1, IgG2a/c, IgG3 sowie Gesamt-IgG untersucht (Abb. 44).





Von naiven C57Bl/6 Mäusen wurde vor Versuchsbeginn Serum durch retrobulbäre Blutentnahme aus dem Auge gewonnen. 14 Tage nach Infektion (s.c.) mit 10^8 pfu MVMp Wildtyp Viren wurde erneut Blut durch Herzpunktion gewonnen. Mit spezifischen ELISAs wurden die Seren auf die Ig Subtypen IgM, IgG1, IgG2c, IgG3 und Gesamt-IgG untersucht. Die "nachher" und "vorher" Ig Titer jedes Serumpaars wurden jeweils miteinander ins Verhältnis gesetzt.). IgG2c ist ein Allel in C57Bl6 Mäusen, das dem IgG2a anderer Mäuse (H2^d, zum Beispiel Balb/c) entspricht.

In allen Mäusen konnte nach Infektion mit MVMp eine stärkere Zunahme aller getesteten Ig festgestellt werden als in unbehandelten Mäusen. In letzteren war

überraschenderweise auch ein Ig Anstieg nachzuweisen, der wahrscheinlich auf das Wachstum der etwa 8 Wochen alten Mäuse zurückzuzführen ist.

Die größte Vervielfältigung konnte bei den beiden Subtypen IgG2c (10x), das dem IgG2a anderer Mäuse (H2^d) entspricht, und IgG3 (5x) beobachtet werden. Beide werden mit Th1-Immunantworten in Verbindung gebracht. Bei ihrem Gegenspieler IgG1 (Th2-Immunantwort) war deshalb auch nur ein geringer Anstieg detektierbar, der im Gegensatz zu allen anderen nicht signifikant war. Daraus lässt sich vermuten, dass eine Infektion mit MVMp Parvovirus eine Verschiebung des Immunglobulin Profils zugunsten der Th1 repräsentierenden Subtypen IgG2a/c und IgG3 verursachte. In der Analyse des Gesamt-IgG spiegelt sich dies nur geringfügig wieder, da sowohl IgG2a (24 %) als auch IgG3 (2 %) nur in geringen Mengen im Serum vorliegen.

Um das erhaltene Ergebnis, dass MVMp eine allgemeine Th1-Immunantwort hervorruft, zu bestätigen, wurde der Versuch mit Typ I IFN-Rezeptor defizienten C57Bl/6 Mäusen (IFNAR-/-) wiederholt. Als Kontrolle dienten herkömmliche C57Bl/6 Mäuse, die auch schon zuvor verwendet wurden. Sie erhielten eine hohe Dosis an MVMp Virus (10^9 pfu s.c.), um zusätzlich eine Aussage über zytotoxische Effekte durch das Virus treffen zu können. Bei IFNAR-/- Mäusen ist die Wirkung von IFN- α und IFN- β , durch den fehlenden Rezeptor blockiert. Beide Interferone besitzen bedeutende antivirale Funktionen und schützen den Wirt vor Virusinfektionen. Bei einem Wirkungsverlust kann sich eine Virämie etablieren. Ein Nebeneffekt ist die Beeinträchtigung der Aktivität von IFN- γ in IFNAR-/- Mäusen, das ein Stimulator für eine Th1 Immunantwort darstellt.

In den IFNAR-/- Mäusen konnte jedoch weder eine pathologische Virämie, noch eine verminderte allgemeine Th1-Antwort festgestellt werden. Die Tiere überlebten die 14 Tage Infektion ohne auffällige Verhaltensmuster. Die Gesamt-Ig Konzentrationen im Blut waren identisch zu denen normaler Mäuse und stimmten mit den Werten des vorhergehenden Versuch überein, indem IgG2c etwa 10-fach, IgG3 6-fach und IgM 2- bis3-fach gegenüber Seren nicht infizierter Tiere erhöht war.

4.2.2 Bildung von Antikörpern gegen NS1 und das virale Kapsid

Da nach Infektion mit MVMp ein Konzentrationsanstieg aller in Kap. 4.2.1 getesteten Immunglobuline beobachtet werden konnte, war es wahrscheinlich, dass auch antivirale Antikörper derselben Ig Isotypen gebildet werden. Dies wurde in einem MVMp Kapsid ELISA überprüft (Abb. 45).

Wie erwartet konnten spezifische MVMp Kapsid Antikörper aller getesteten Ig Isotypen IgM, IgG, IgG1, IgG2a/c und IgG3 nachgewiesen werden.



Abb. 45: Anti-MVMp Kapsid Antikörper verschiedener Ig Isotypen

Es wurden auch die Seren der IFNAR-/- Mäuse (Kap. 4.2.1) auf ihre antiviralen Antikörpertiter getestet (Abb. 46).

Die IFNAR-/- Mäuse waren gegenüber den normalen Mäusen nicht in ihrer viralen Antikörperproduktion beeinträchtigt. Bei fast allen Ig Subtypen konnten keine unterschiedlichen Titer festgestellt werden. Entgegen den Erwartungen produzierten IFNAR-/- Mäuse sogar deutlich mehr MVMp spezifische IgG2c Antikörper als normale C57Bl/6 Mäuse. Der t-Test ergab für diese Werte ein Konfidenzintervall von mindestens 90 %.

C57Bl/6 Mäuse wurden mit 10⁸ pfu MVMp Wildtyp Virus infiziert und 14 Tage später Serum durch Herzpunktion nach Tötung gewonnen. Die Seren wurden in einem MVMp Kapsid ELISA auf die Produktion antiviraler Antikörper und deren Zuordnung zu verschiedenen Ig Isotypen (IgM, IgG1, IgG2c und IgG3) untersucht. Das in C57Bl6 Mäusen vorkommende Allel IgG2c entspricht dem IgG2a anderer Mäuse (H2^d, zum Beispiel Balb/c).



Abb. 46: Anti-MVMp Kapsid Antikörper verschiedener Ig Isotypen in IFNAR-/- Mäusen Je 5 C57Bl/6 und IFNAR-/- Mäuse wurden mit 10⁹ pfu MVMp Wildtyp Virus infiziert und 14 Tage später Serum durch Herzpunktion nach Tötung gewonnen. Die Seren wurden in einem MVMp Kapsid ELISA auf die Produktion antiviraler Antikörper und deren Zuordnung zu verschiedenen Ig Isotypen (IgM, IgG1, IgG2c und IgG3) untersucht.

Weiterhin wurde analysiert, ob auch Antikörper gegen bestimmte virale Proteine (NS1, NS2, VP1) gebildet wurden. Dies konnte sehr einfach in einer Immunfluoreszenz getestet werden, indem mit leeren MVMp Kapsiden oder rekombinanten Vacciniaviren (VV-NS1, VV-NS2, VV-VP1) infizierte A9 Zellen mit Serum inkubiert wurden. Die gebundenen antiviralen Serum-Antikörper wurden anschließend mit anti-Maus-FITC Antikörper markiert und in einem Fluoreszenzmikroskop detektiert (Abb. 47).

In den Seren MVMp-infizierter Mäuse konnten unabhängig vom Administrationsweg spezifische antivirale Antikörper für virale Kapside, NS1 und VP1 detektiert werden, dagegen aber keine NS2 Antikörper. Mit der Immunfluoreszenz ist die Lokalisation der jeweiligen Proteine in A9 Zellen deutlich zu erkennen: NS1 und VP1 besitzen eine Kernlokalisierungssequenz, während Kapsidteile im Zellplasma verbleiben. Anti-Kapsid Antikörper wurden stets zu 100 % entwickelt, NS1 Antikörper dagegen nicht immer. Mit einer sensitiveren NS1 ELISA Methode konnte festgestellt werden, dass 22 von 24 Serumproben, also 92 %, NS1 spezifische Anti-körper aufwiesen. Dies konnte in mehreren Versuchen bestätigt werden. VP1 Antikörper konnten in allen 12 Seren eines Versuches nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass vereinzelte Fällen, ähnlich wie bei NS1, ohne VP1 Antikörperbildung auftreten.



Abb. 47: Immunfluoreszenz zur Detektion antiviraler Antikörper

C57Bl/6 Mäuse wurden mit 10⁸ pfu MVMp Wildtyp Virus s.c., i.p., i.v. oder i.n. infiziert und 14 Tage später Serum durch Herzpunktion nach Tötung gewonnen. A9 Zellen wurden mit leeren MVMp Kapsiden oder mit den rekombinanten Vacciniaviren VV-NS1, VV-NS2 oder VV-VP1 infiziert und nach 6 h mit Serum inkubiert. Die gebundenen antiviralen Serum-Antikörper konnten nun mit anti-Maus-FITC Antikörper detektiert werden.

4.2.3 Virus neutralisierende Aktivität der antiviralen Antikörper

Eine wichtige Fragestellung im Hinblick auf eine virale Therapie ist, ob die auf eine Infektion gebildeten antiviralen Antikörper eine Virus neutralisierende Aktivität besitzen. Da Parvoviren in permissiven Zellen (zum Beispiel A9) zytotoxisch sind, konnte diese Eigenschaft für einen Neutralisationstest verwendet werden.

Virus wurde vor der Infektion von A9 Zellen mit Serum von MVMp oder mock infizierten Mäusen inkubiert und das Überleben der Zellen 3 Tage später mit dem Reagenz Alamar Blue® bestimmt. Daraus ließ sich die neutralisierende Aktivität ableiten (Abb. 48).

Tatsächlich konnte Serum von MVMp infizierten Mäusen das MVMp Virus neutralisieren, da eine Inkubation mit Virus und anschließende Infektion zu 100 % Überleben der Zellen führte. Erst bei höheren Serumverdünnungen (1:200) nahm die neutralisierende Aktivität ab und ein zunehmendes Absterben der Zellen war zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte Serum von nicht infizierten Mäusen (mock Serum) das Virus nicht neutralisieren (0 %), da die Zellen ebenso wie MVMp infizierte Zellen (ohne Serumeinwirkung) abstarben.



Abb. 48: Bestimmung der Virus neutralisierenden Aktivität antiviraler Antikörper

C57Bl/6 Mäuse wurden mit 10⁸ pfu MVMp Wildtyp Virus infiziert und 14 Tage später Serum durch Herzpunktion nach Tötung gewonnen. MVMp Wildtyp Virus wurde vor der Infektion von A9 Zellen (moi 10) mit verschiedenen Serumverdünnungen für 1 h inkubiert. Nach 3 Tagen wurde dem Zellkulturmedium jeweils 10 µl des Reagenz Alamar Blue® zugegeben und der Farbumschlag nach 3 Stunden Inkubation (bei 37°C) bei der dualen Wellenlänge von 540 zu 620 nm gemessen. Die neutralisierende Aktivität (in %) errechnet sich aus dem Verhältnis des Überlebens von infizierten zu nicht infizierten Zellen (Maximum), wobei das minimale Signal des bei MVMp Infektion überlebenden Anteils jeweils abgezogen wurde.

Das neutralisierende Potenzial der antiviralen Antikörper konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. In diesem wurde das rekombinante MVMp/EGFP Virus mit Serum inkubiert, bevor A9 Zellen infiziert wurden. Nach 3 Tagen wurde die EGFP Expression in einem Fluoreszenzmikroskop überprüft (Abb. 49). Serum MVMp infizierter Mäuse inhibierte die Transgenexpression des MVMp/EGFP Virus in A9 Zellen. Im Gegensatz dazu konnte keine Beeinflussung der EGFP Expression durch Serum von naiven Kontrolltieren beobachtet werden.



Kontrollserum



Serum MVMp infizierter Mäuse

Abb. 49: Inhibierung der Transgenexpression (EGFP) durch neutralisierende Antikörper

C57Bl/6 Mäuse wurden mit 10⁸ pfu MVMp Wildtyp Virus infiziert und 14 Tage später Serum durch Herzpunktion nach Tötung gewonnen. Rekombinantes MVMp/EGFP Virus wurde vor der Infektion von A9 Zellen (moi 10) mit der Serumverdünnung 1:100 für 1 h inkubiert. Als Kontrolle diente Serum von nicht infizierten Mäusen. Nach 3 Tagen wurde die EGFP Expression im Fluoreszenzmikroskop überprüft.

4.2.4 Einfluss des Infektionsweges auf die Antikörperbildung

Von weiterem Interesse war, welchen Einfluß unterschiedliche Applikationswege des Virus auf die antivirale Antikörperbildung ausüben. In einem weiteren Versuch wurden daher C57Bl/6 Mäuse mit MVMp Virus subkutan, intraperitoneal, intravenös oder intranasal infiziert. 15 Tage später wurden die antiviralen IgG Titer aus dem Serum in einem MVMp Kapsid und einem NS1 ELISA bestimmt und miteinander verglichen (Abb. 50).



Abb. 50: Einfluß des Infektionsweges auf die antiviralen IgG Antikörpertiter C57Bl/6 Mäuse wurden mit 10⁸ pfu MVMp Wildtyp Virus jeweils unterschiedlich infiziert: subkutan, intraperitoneal, intravenös und intranasal. Jede Gruppe umfasste 3 Tiere. Nach 15 Tagen wurde Serum durch retrobulbäre Blutentnahme aus dem Auge gewonnen. Die Seren wurden in einem MVMp Kapsid und einem NS1 ELISA auf die Produktion antiviraler IgG Antikörper untersucht

Die höchsten IgG Antikörpertiter wurden nach intravenöser Virusinjektion erhalten. Dies galt sowohl für NS1 als auch für Kapsid Antikörper. Etwa gleich hohe Titer waren dagegen nach subkutaner und intraperitonealer Virusinfektion zu beobachten. Die geringste antivirale Antikörpermenge wurde nach intranasaler Virusadministration nachgewiesen. Allerdings kann in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der applizierten Virusmenge durch eine orale Aufnahme der Maus verlorenging.

Die Seren sollten ebenfalls auf ihre Virus neutralisierende Aktivität geprüft werden. Dafür wurde analog zu Kap. 4.2.3 Serum mit Virus vor der Infektion von A9 Zellen inkubiert (Abb. 51).



Abb. 51: Virus neutralisierende Aktivität antiviraler Antikörper nach unterschiedlichen Infektionswegen

Je 3 C57Bl/6 Mäuse wurden mit 10^8 pfu MVMp Wildtyp Virus jeweils unterschiedlich infiziert (s.c., i.p., i.v., i.n.) und nach 15 Tagen Serum durch retrobulbäre Blutentnahme aus dem Auge gewonnen. MVMp Wildtyp Virus wurde vor der Infektion von A9 Zellen (moi 10) mit verschiedenen Serum-verdünnungen für 1 h inkubiert. Nach 3 Tagen wurde dem Zellkulturmedium jeweils 10 µl des Reagenz Alamar Blue® zugegeben und der Farbumschlag nach 3 Stunden Inkubation (bei 37°C) bei der dualen Wellenlänge von 540 zu 620 nm gemessen. Die neutralisierende Aktivität (in %) errechnet sich aus dem Verhältnis des Überlebens von infizierten zu nicht infizierten Zellen (Maximum), wobei das minimale Signal des bei MVMp Infektion überlebenden Anteils jeweils abgezogen wurde.

Alle Seren wirkten virusneutralisierend. Da die intranasale Infektion den geringsten Antikörpertiter erzeugte, war auch nicht überraschend, dass das neutralisierende Potenzial in diesem Fall am niedrigsten war. Bei den anderen Gruppen war kein signifikanter Unterschied nachzuweisen. Tendenziell aber konnte eine dem jeweiligen Antikörpertiter entsprechende neutralisierende Aktivität der einzelnen Gruppen beobachtet werden.

4.2.5 Persistenz der antiviralen Antikörper

Da antivirale Antikörper, vor allem wenn sie neutralisierende Aktivität besitzen, bei einer längerfristigen Therapie hinderlich sein können, wurde auch die Persistenz der antiviralen IgG Antikörper in den Mäusen bis zu einem Zeitraum von 6 Monaten überprüft (Abb. 52).

Bei subkutaner (s.c.) und intraperitonealer (i.p.) Administration konnte bereits nach 2 Monaten eine deutliche Abnahme der antiviralen Antikörper im Serum beobachtet werden. Dieser Pegel änderte sich nach insgesamt 6 Monaten nur unmerklich. Gegensätzlich dazu verhielt es sich bei intravenöser (i.v.) oder intranasaler (i.n.) Applikation. Bei i.v. Administration wurden nicht nur die höchsten Antikörpertiter erreicht, sondern auch die am längsten bzw. höchsten persistierenden. Nach 6 Monaten allerdings sind die Titer auf einen gleich hohen Wert gesunken wie nach s.c. oder i.p. Gabe. Die anfangs niedrigen antiviralen IgG Konzentrationen nach i.n. Verabreichung könnten (i) durch eine orale Virusaufnahme, (ii) durch eine längere Anlaufzeit, bis das Virus geeignete Zellen für seine Replikation findet, oder (iii) durch ein längeres Verborgenbleiben vor dem abwehrenden Immunsystem erklärt werden.



Abb. 52: Persistenz antiviraler IgG Antikörpertiter nach unterschiedlichen Infektionswegen Je 3 C57Bl/6 Mäuse wurden mit 10⁸ pfu MVMp Wildtyp Virus jeweils unterschiedlich infiziert (s.c., i.p., i.v., i.n.) und nach 15 Tagen und 65 Tagen Serum durch retrobulbäre Blutentnahme aus dem Auge, sowie nach 180 Tagen (ca 6 Monate) durch Herzpunktion nach Tötung gewonnen. Die Seren wurden in einem MVMp Kapsid ELISA auf die Produktion antiviraler Antikörper untersucht.

4.3 Modell für eine readministrative Therapie

Wie bereits erwähnt können antivirale und neutralisierende Antikörper bei einer längeren oder wiederholten Therapie ein Problem darstellen. Ob dies bei einer parvoviralen Therapie tatsächlich der Fall ist, sollte in einem entsprechenden Modell getestet werden.

4.3.1 Inhibierung der viralen Genexpression nach wiederholter Virusgabe

In einem Modell für eine readministrative parvovirale Therapie erhielten Mäuse in einem Abstand von 10 Tagen zwei Virusinjektionen derselben Menge, aber an unterschiedlichen Orten (linke und rechte Flanke). Als Kontrolle dienten Mäuse, die jeweils nur eine der beiden Virusinjektionen erhielten oder gar keine. Die Replikationsfähigkeit der Viren wurde sowohl in tumorfreien als auch in B78/H1 Melanom-tragenden Mäusen mittels RT-PCR untersucht. Dafür eignen sich nach Laborerfahrung sowohl Tumorgewebe, als auch Lymphozyten aus dem Lymphknoten (N. Giese, unveröffentlichte Daten). Eine PCR mit dem *Housekeeping Gene* ß-Aktin kontrollierte, ob die RNA-Aufbereitung erfolgreich war und ob gleiche Mengen cDNA für die PCR eingesetzt wurden. Neben viraler mRNA wurde auch die virale DNA im Gewebe analysiert. In Abb. 53 ist eine RT-PCR Anaylse aus den Lymphknoten tumortragender Mäuse dargestellt.



Abb. 53: RT-PCR Analyse der Lymphknoten im readministrativen Modell

B78/H1 Melanom-tragende C57Bl/6 Mäuse wurden zunächst mit 10⁸ pfu MVMp Wildtyp Virus intratumoral auf der rechten Flanke (blau) und 10 Tage später mit der gleichen Menge auf der linken Flanke (rot) infiziert. Als Kontrollen erhielten Tiere jeweils nur eine Virusinjektion oder gar keine (o). 3 Tage nach erster oder zweiter Infektion wurden die Tiere getötet und die ableitenden Lymphknoten jeweils mittels RT-PCR auf das *Housekeeping Gene* ß-Aktin, virale DNA und virale Transkripte (mRNA) analysiert.

Die PCR mit dem *Housekeeping Gene* ß-Aktin ließ auf den Einsatz gleicher Mengen cDNA aller Proben schließen, da die Banden gleich hohe Intensitäten aufwiesen. Die Kontrollen für die erste und zweite Injektion bestätigten einen korrekten Versuchsablauf, da sowohl Virus DNA, als auch virale Transkripte (mRNA) nachweisbar waren.

Die interessante Gruppe war natürlich die mit beiden Virusinjektionen. In diesem Fall konnte keine virale Transkription detektiert werden. Die trotzdem vorhandene Virus DNA könnte auch von der ersten Injektion herrühren. Das gleiche Ergebnis konnte auch in den Tumorgeweben und den Lymphknoten tumorfreier Mäuse erhalten weden.

4.3.2 Keine Kreuzreaktivität von anti-MVMp Antikörpern mit H1 Viren

Die eben belegte Inhibierung der Transkription nach wiederholter MVMp Applikation ist wahrscheinlich auf eine neutralisierende Aktivität antiviraler Antikörper zurückzuführen. Als Umgehung dieses Problems kann versucht werden, die für die Neutralisierung zugänglichen Strukturen der Viruskapsel geringfügig zu modifizieren (Dr. J.M. Almendral, Madrid; laufendes Projekt einer EU-Kooperation). Eine andere Möglichkeit bietet die Pseudotypisierung des viralen MVMp Genoms mit dem Kapsid des dem MVMp nahe verwandten H1 Virus.

Dieser Pseudotyp MVMp(H1) wurde in unserem Labor bereits entwickelt und auf seine Infizierbarkeit getestet (Wrzesinski *et al.*, 2003). Bevor jedoch ein *in vivo* Versuch begonnen werden konnte, musste zunächst geprüft werden, ob die in MVMp-immunisierten Mäusen gebildeten Antikörper eine H1 Virus neutralisierende Aktivität aufwiesen.

In einem Versuch wurde daher H1 Virus mit Serum inkubiert, bevor NBK Zellen damit infiziert wurden. Das Überleben der Zellen wurde nach 3 Tagen mit dem Alamar Blue® Reagenz bestimmt und die neutralisierende Aktivität berechnet (Abb. 54).





C57Bl/6 Mäuse wurden mit 10⁸ pfu MVMp Wildtyp Virus infiziert und 14 Tage später Serum durch Herzpunktion nach Tötung gewonnen. H1 Wildtyp Virus wurde vor der Infektion von NBK Zellen (moi 10) mit verschiedenen Verdünnungen von anti-MVMp und anti-H1 Serum als Positivkontrolle (Kaninchen) für 1 h inkubiert. Nach 3 Tagen wurde dem Zellkulturmedium jeweils 10 µl des Reagenz Alamar Blue® zugegeben und der Farbumschlag nach 3 Stunden Inkubation (bei 37°C) bei der dualen Wellenlänge von 540 zu 620 nm gemessen. Die neutralisierende Aktivität (in %) errechnet sich aus dem Verhältnis des Überlebens von infizierten zu nicht infizierten Zellen (Maximum), wobei das minimale Signal des bei MVMp Infektion überlebenden Anteils jeweils abgezogen wurde. Anti-MVMp Serum zeigte keine Kreuzreaktivität mit den verwandten H1 Viren, da alle Zellen aufgrund der viralen Infektion in gleichem Maße wie mit Kontrollserum starben und die neutralisierende Aktivität 0 % betrug. Im Gegensatz dazu konnte ein in Kaninchen produziertes anti-H1 Serum das Virus zu 100 % neutralisieren und diente damit als positive Kontrolle des Versuches.

4.3.3 Umgehung der neutralisierenden Immunantwort bei viraler Zweitapplikation durch Pseudotypisierung

Da, wie gerade festgestellt, die anti-MVMp Antikörper mit H1 Viren nicht kreuzreagieren können, ist bei einer notwendigen Zweitapplikation mit dem gleichen Virus zumindest theoretisch eine Umgehung der neutralisierenden Immunantwort durch eine Pseudotypisierung denkbar. In einem *in vivo* Modell, das dem in Kap. 4.3.1 beschriebenem Versuch angepasst wurde, sollte dies getestet werden.

B78/H1 Melanom-tragende Mäuse erhielten in einem Abstand von 10 Tagen zwei Virusinjektionen, zuerst MVMp Wildtyp Virus auf der rechten Flanke, später, auf der linken, entweder das normale, rekombinante MVMp/EGFP Virus oder den Pseudotyp MVMp/EGFP(H1) mit einer H1 Hülle. In einem Vorversuch wurde sichergestellt, dass B78/H1 Zellen mit dem Pseudotyp infizierbar sind. Als Kontrolle dienten wiederum Mäuse, die jeweils keine oder nur eine der beiden Virusinjektionen erhielten. Anschließend wurden wiederum Tumorgewebe und ableitende Lymphknoten auf das *Housekeeping Gene* ß-Aktin, virale DNA und Transkription (mRNA) mittels RT-PCR analysiert (Abb. 55).



Abb. 55: RT-PCR Analyse des Tumorgewebes bei Zweitapplikation eines Pseudotyps

B78/H1 Melanom-tragende C57Bl/6 Mäusen wurden zunächst mit 10^8 pfu MVMp Wildtyp Virus intratumoral auf der rechten Flanke (blau) und 10 Tage später auf der linken mit 5×10^7 ru MVMp/EGFP (violett) oder MVMp/EGFP(H1) (Pseudotyp, rot) Virus. Als Kontrollen erhielten Tiere jeweils nur eine der Virusinjektionen oder gar keine (o). 3 Tage nach erster oder zweiter Infektion wurden die Tiere getötet und die Tumorgewebe jeweils mittels RT-PCR auf das *Housekeeping Gene* β -Aktin, virale DNA und virale Transkripte (mRNA) analysiert.

ERGEBNISSE

Wie bereits im vorhergehenden Versuch (Kap. 4.3.1) konnte in allen Proben ß-Aktin und in den Kontrollen für die Virusinjektionen virale DNA und Transkripte nachgewiesen werden. Auch die fehlende mRNA Produktion nach viraler Zweitapplikation konnte bestätigt werden. Allerdings scheint in einem Fall die Infektion eines Tieres nicht funktioniert zu haben.

Von Interesse war die Gruppe, die nach der MVMp Injektion mit dem Pseudotyp MVMp/EGFP(H1) infiziert wurde. In der Tat konnte in diesem Fall wie erwartet eine virale Transkription detektiert werden. Somit scheint es, dass eine neutralisierende Immunantwort bei einer erneuten Therapie in kürzerem Zeitabstand durch Pseudotypisierung des viralen Genoms umgangen werden kann. Dies ist in Abb. 56 schematisch dargestellt.



Abb. 56: Modell für eine Therapie mit wiederholter Virusgabe

III Diskussion

1 Charakterisierung parvoviraler Vektoren

Im Hinblick auf einen erfolgreichen Einsatz in der Gentherapie wurde bei der Herstellung rekombinanter Parvoviren darauf geachtet, dass alle genomischen Sequenzen, die für die DNA-Replikation, die Genexpression oder die Zytotoxizität der Viren essentiell oder zumindest von großer Bedeutung sind, im Genom der rekombinanten Viren erhalten bleiben (Kap. I/4.6). Der Einbau eines Transgens wurde daher durch eine Deletion im Kapsidprotein-kodierenden Bereich des Wildtyp Virus ermöglicht. Die fehlende Fähigkeit rekombinanter Viren, Kapsidproteine (VP) zu synthetisieren, ist deshalb der einzige Unterschied zu den Wildtyp Viren, weshalb von beiden nahezu gleiche Merkmale erwartet werden würden. Inwieweit die Eigenschaften rekombinanter Viren mit denen des Wildtyp Virus tatsächlich übereinstimmen, soll nun diskutiert werden.

1.1 Geringe Infektiösität rekombinanter Viren

Bei gleicher viraler Partikelzahl war bei Stocks rekombinanter Viren eine geringere Infektiösität als bei Wildtyp Viren zu beobachten (Kap. II/1.2). Dies spiegelte sich auch nach Messung von intrazellulärer viraler DNA wieder, indem nach der Infektion von Zellen mit einer gleichen infektiösen Virusmenge beider Viren mehr rekombinante als Wildtyp Virus DNA nachgewiesen wurde (Kap. II/1.3). Die Infektiösität der Viren wurde dabei jeweils anhand ihrer Replikationsfähigkeit bestimmt. Demzufolge zeigen rekombinante Viren eine geringere Replikation als die gleiche Anzahl an Wildtyp Viren.

Nach Transfektion einer gleichen Menge infektiöser Wildtyp und VP-deletierter rekombinanter DNA Klone konnten jedoch gleich viel monomere und dimere Replikationsformen festgestellt werden (Kestler *et al.*, 1999). Daher ist eine gleiche Replikationsfähigkeit rekombinanter und Wildtyp Viren anzunehmen.

Es liegt deshalb nahe, dass bei rekombinanten Viren ein geringerer Anteil an Genomen zur Replikation gelangt als bei Wildtyp Viren. Eine Erklärung dafür wäre eine unvollständige Verpackung rekombinanter Viren, wodurch die virale DNA von zellulären DNasen angegriffen und abgebaut werden könnte. Dies ist jedoch auszuschließen, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass bei Inkubation von rekombinanten und Wildtyp Viren mit DNase das Genom in beiden Fällen vor einer enzymatischen Degradierung geschützt blieb (unveröffentlichte Ergebnisse, in Zusammenarbeit mit S. Bölz).

Anhand der durchgeführten Versuche kann nicht genau zugeordnet werden, welcher Schritt im viralen Lebenszyklus nach der Assoziation der Viren mit den Zellen dafür verantwortlich ist, dass weniger rekombinante Genome zur Replikation gelangen. Vorstellbar sind eine Beeinträchtigung der Virusinternalisierung in die Zelle, des intrazellulären Transports, der Dekapsidierung, der Translokalisierung zum Nukleus oder der zur Replikation benötigten Konversion zum Doppelstrang.

Eine Möglichkeit wäre, dass der Einbau eines Transgens in das parvovirale Genom geringfügige Änderungen der Virusstruktur bewirkt, die zu Störungen bei einem oder mehreren Infektionsschritten führen können. Ein Beispiel dafür liefert der unterschiedliche Tropismus der nah verwandten MVMp und MVMi Viren (Kap. I/4.1). Lediglich zwei Aminosäure-Austausche bewirken, dass die DNA des MVMp Virus bei restriktiver Infektion im Gegensatz zu MVMi Virus wahrscheinlich ineffizient dekapsidiert wird und somit nicht konvertieren und replizieren kann (Ball-Goodrich et al., 1992; Previsani et al., 1997). Oft beeinflussen bereits geringe Variationen in den Virusseguenzen die virale Rezeptorinteraktion, wie bei HIV, Polio-, Herpes- und Arenaviren festgestellt werden konnte (Smelt et al., 2001). Bei wiederholter Injektion eines rekombinanten AAV mit anderer Promotor- oder Transgen-Sequenz in ein Rattengehirn konnte im Gegensatz zur zweimaligen Gabe des gleichen Vektors keine oder nur eine geringe Neutralisierung des rekombinanten Virus beobachtet werden (Mastakov et al., 2002). Dies läßt einen Einfluß des viralen Genoms auf die äußere Viruskapsidstruktur vermuten, so dass unterschiedliche Sequenzen verschiedene epitope Strukturen mit unterschiedlichen Antikörperreaktionen erzeugen können.

Für das Hundeparvovirus CPV konnte festgestellt werden, dass eine 11 Nukleotide betragende genomische Sequenz 60 Bindungsstellen mit der Innenseite des Viruskapsids besitzt (Chapman & Rossmann, 1995). Dadurch wird eine Auswirkung der genomischen DNA Sequenz auf bestimmte virale Prozesse, zum Beispiel während der viralen Replikation oder Transkription, vermutet.

Es ist daher vorstellbar, dass bei rekombinanten Parvoviren je nach Transgen unterschiedliche Einflüsse auf die Virusstruktur und damit auch auf die virale Infektiösität vorliegen. Wir haben auch feststellen können, dass mit bestimmten rekombinanten Vektoren tendenziell höhere infektiöse Titer erreicht werden konnten als mit anderen (unveröffentlichte Laborergebnisse).

Die Beeinträchtigung der Infektiösität durch unterschiedliche Virusstrukturen, zum Beispiel von rekombinanten und Wildtyp Parvoviren, kann von Zelle zu Zelle verschieden stark ausgeprägt sein. Einen Extremfall diesbezüglich stellen die P815 Zellen dar. In ihnen konnte ein drastischer Unterschied der Infektiösität rekombinanter und Wildtyp Viren festgestellt werden, indem sie für MVMp Wildtyp Viren permissiv waren, nicht dagegen für die rekombinanten Derivate (Kap. II/2). Mit beiden Viren war jedoch eine vergleichbare moi-abhängige Assoziation mit diesen Zellen zu beobachten (Kap. II/1.3). Unklar bleibt, ob die Zellinternalisation oder der intrazelluläre Transportweg der rekombinanten Viren in P815 Zellen beeinträchtigt ist. P815 Zellen könnten daher zu einer genauen Studie des frühen parvoviralen Infektionsmechanismus dienen. Ein Grund für die geringere Infektiösität rekombinanter Viren in diesen Zellen könnte eine ungenügende Externalisierung des VP1 spezifischen Epitops darstellen, das nach viralem Zelleintritt für den Transport der Virionen zum Zellkern erforderlich ist (siehe auch 1.3).

1.2 Unterschiede in Amplifikation bei gleicher Proteinexpression

In den permissiven Zellen A9 und NBK konnte trotz gleicher NS1 Proteinexpression von rekombinanten und Wildtyp Viren ein großer Unterschied in der viralen Amplifikation beobachtet werden (Kap. II/1.4 und II/1.5). Dies erscheint zunächst widersprüchlich, da beide Vorgänge dieselbe konvertierte monomere Form als DNA Matrize benutzen. Eine weitere Fragestellung ist, warum ein Unterschied in der viralen Amplifikation nach Infektion mit rekombinanten und Wildtyp Viren nachgewiesen werden konnte, während nach Transfektion nicht (Kestler *et al.*, 1999).

Anhand der Methode, mit der die Versuche durchgeführt wurden (Zellulärer Dot-Blot), kann nicht zwischen den einzelnen Formen des Replikationszyklus unterschieden werden. Neueste Ergebnisse mit der Southern Blot Methode zeigen, dass auch nach Infektion von A9 Zellen mit rekombinanten und Wildtyp Viren gleiche Mengen an monomeren und dimeren Replikationsformen erhalten werden (unveröffentlichte Ergebnisse, in Zusammenarbeit mit S. Bölz). Dies bestätigt die Ergebnisse von Kestler *et al.* (1999), dass rekombinante und Wildtyp Viren nach Transfektion ein gleiches Replikationsverhalten aufweisen.

Der Unterschied in der Amplifikation, der mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode (Zellulärer Dot-Blot) erhalten wurde, ist daher wahrscheinlich auf die große Menge neu synthetisierter und verpackter einzelsträngiger DNA bei Wildtyp Viren zurückzuführen. Bei rekombinanten Viren ist dieser Schritt blockiert, da durch die Deletion der Kapsidproteine keine Kapside gebildet werden können, die neue Genome verpacken (Rhode *et al.*, 1976; Tullis *et al.*, 1993).

1.3 Geringe Zytotoxizität rekombinanter Viren

Das virale Protein NS1 galt bisher als der bedeutendste Mediator der parvoviralen Zytotoxizität in transformierten Zellen (Li & Rhode, 1990; Legendre *et al.*, 1992). Wichtige Einflüsse auf die Zytotoxizität wurden auch dem Protein NS2 zugeschrieben (Brandenburger *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 1993). Da in den rekombinanten Viren das NS-kodierende Gen mit seinem P4 Promotor bewahrt wurden, wurde angenommen, dass rekombinante und Wildtyp Viren aufgrund der gleichen Menge an produzierten NS1 Proteinen auch ähnlich hohe zytotoxische Effekte besitzen. Dies konnte jedoch in keinem der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche bestätigt werden. Rekombinante Viren zeigten bei gleicher Menge an NS1 Proteinen durchweg ein geringeres zytotoxisches Potenzial in permissiven Zellen als Wildtyp Viren (Kap. II/1.6). Demzufolge müssen mehrere Eigenschaften, in denen sich rekombinante von Wildtyp Viren unterscheiden, für die virale Zytotoxizität von Bedeutung sein. Die unterschiedliche Produktionsweise beider Viren (über Infektion für Wildtyp und Co-Transfektion für rekombinante Viren) stellte sich dabei als unwichtig heraus (Kap. II/1.6).

Der größte Unterschied zwischen rekombinanten und Wildtyp Viren besteht wie erwähnt in der Deletion der Kapsidproteine (VP). Diese könnten daher die virale Zytotoxizität mitbestimmen. Möglich wäre jedoch auch die Beteiligung eines weiteren in dieser Region kodierenden Proteins, dessen Funktion bisher größtenteils unbekannt ist (Zadori et *al.*, 2002). Es wird ein besonderer Einfluß dieses Proteins auf die Freisetzung von PPV Nachkommenviren diskutiert, bei der auch die Lyse der Zelle eine wichtige Rolle spielt. Zadori et *al.* (2002) vermuten eine direkte Wirkung dieses Proteins auf die zelluläre Plasmamembran.

Sehr wahrscheinlich ist das VP1 Protein, bei dem ein sekretorisches Phospholipase A₂ (sPLA₂) Motif in der VP1 spezifischen Region nachgewiesen werden konnte, in die virale Zytotoxizität involviert (Zadori *et al.*, 2001). Die katalytische Seite der sPLA₂ ist normalerweise innerhalb des Viruskapsids lokalisiert. Während des endosomalen Transport des Virus wird sie jedoch nach außen befördert und ist unter anderem beim Transport vom späten Endosom oder Lysosom zum Nukleus beteiligt (Zadori *et al.*, 2001). In permissiven Zellen werden während der Virusproduktion große Mengen an VP1 Proteinen gebildet, die zytotoxisch wirken könnten.

In mehreren Fällen konnte in der Tat ein Einfluß der PLA₂ Aktivität auf die zelluläre Zytotoxizität festgestellt werden, unter anderem bei NK Zellen (Whalen *et al.*, 1999) und Makrophagen (Shin *et al.*, 1999). Der Zusammenhang der parvoviralen PLA₂ Aktivität und des Virus-vermittelten zytotoxischen Effekts wird im Moment in unserer Forschungsgruppe analysiert. Vorläufige Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang der PLA₂ Aktivität und Zell-Lyse in A9 Zellen schließen, weil parallel zur einsetzenden Lyse verstärkt Arachidonsäuren als Umsetzungsprodukte der Phospholipasen in den Zellkulturüberstand freigesetzt werden. Die Involvierung der parvoviralen Phospholipase wird dabei vermutet, konnte jedoch experimentell noch nicht bestätigt werden. Die Arachidonsäurefreisetzung kann zudem durch zytosolische PLA Inhibitoren blockiert werden. Einen Hinweis für die Assoziation der PLA₂ Aktivität und die Zytotoxizität liefert auch das Versuchsergebnis mit einer geringer zytotoxischen MVMp Mutante, die eine reduzierte Freisetzung von Arachidonsäuren in das Zellkulturmedium aufwies (unveröffentlichte Ergebnisse, J. Peters).

Ein weiterer Unterschied rekombinanter und Wildtyp Viren besteht darin, dass Wildtyp Viren im Gegensatz zu rekombinanten Viren zur Bildung von infektiösen Nachkommenviren befähigt sind. Da die Zytotoxizität erst 2 bis 3 Tage nach Infektion deutlich wird, könnten eine Zweitinfektion durch neugebildete Nachkommenviren oder leere Kapside durchaus eine Rolle spielen. In der Tat wurde bei einer Infektion von A9 Zellen mit MVMp Wildtyp Viren und anschließender Zugabe von neutralisierenden Antikörpern bzw. Neuraminidase im Überschuß eine mit rekombinanten Viren vergleichbare geringere Zytotoxizität festgestellt (Kap. II/1.6). Dieser geringe zytotoxische Effekt ist daher wahrscheinlich auf die NS-Proteine zurückzuführen, die in rekombinanten und Wildtyp Viren in gleichen Mengen gebildet werden. Die Fähigkeit, Nachkommenviren oder Kapside zu produzieren, scheint daher bei der parvoviralen Zytotoxizität ein wichtige Rolle zu spielen.

Da die VP-kodierende Sequenz in das Genom rekombinanter Viren aus Kapazitätsgründen nicht wieder integriert werden kann, muss auf andere Weise versucht werden, die Zytotoxizität dieser Viren zu verstärken und der von Wildtyp Viren anzugleichen. Dies könnte durch den Einbau einer stärker zytotoxischen Mutante von NS1 erzielt werden (Corbau *et al.*, 2000; Daeffler *et al.*, 2002).

2. Wirksamkeit gentherapeutischer Versuche mit Parvoviren

Wie dargestellt besitzen rekombinante Viren im Vergleich zu Wildtyp Viren bei gleichem Replikationstiter zwar eine geringere Zytotoxizität, andererseits aber eine gleich hohe Amplifikation und Proteinexpression. Damit sind ihnen die Eigenschaften, die für eine gentherapeutische Anwendung am wichtigsten sind, erhalten geblieben. Durch die Fähigkeit zur autonomen Replikation wird zum einen der onkotrope Charakter dieser Vektoren gewährleistet (Dinsart *et al.*, 1996) und zum anderen die Transgenexpression begünstigt (Hanson *et al.*, 1991). Ein Problem
könnte die geringere Infektiösität rekombinanter Parvoviren darstellen. Bei gleicher infektiöser Viruszahl rekombinanter und Wildtyp Viren enthalten rekombinante Viren mehr Viruspartikel als Wildtyp Viren (siehe 1.1). Durch die höhere Partikelzahl rekombinanter Viren kann eine stärkere Immunantwort ausgelöst werden als für Wildtyp Viren.

2.1 Die anti-parvovirale Immunantwort

Nach Infektion mit MVMp Wildtyp Virus konnte eine ausgeprägte humorale Immunantwort in C57Bl/6 Mäusen nachgewiesen werden (Kap. II/4.2). Dabei wurden unabhängig vom Applikationsweg Antikörper unterschiedlicher Isotypen gegen virale Kapside und die nativen Proteine NS1 und VP1 gebildet. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem nah verwandten helferabhängigen Parvovirus AAV beschrieben: in C57Bl/6 Mäusen konnten ebenfalls unabhängig vom Applikationsweg AAVspezifische IgM, IgG1, IgG2a und IgG3 Antikörper nachgewiesen werden (Brockstedt *et al.*, 1999; Chirmule *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde nur die Immunantwort auf MVMp Wildtyp Virus getestet. Eine Fortführung der Versuche mit rekombinanten Viren ist in Planung. Da auch Antikörper gegen die viralen Proteine NS1 und VP1 detektiert werden konnten, ist eine Antikörperbildung gegen körperfremde Transgene, die von rekombinanten Viren transduziert werden, nicht auszuschließen. Bei AAV und MVMi konnten zum Beispiel Transgenspezifische anti-Ovalbumin Antikörper festgestellt werden (Brockstedt *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 2002).

2.1.1 Entwicklung einer Virus-neutralisierenden humoralen Immunantwort

Bei den gebildeten anti-parvoviralen Antikörpern konnte eine Virus-neutralisierende Aktivität festgestellt werden, weshalb die Transgenexpression inhibiert war (Kap. II/ 4.2.3). Dies stellt ein Problem für die Effizienz einer zweiten Gabe desselben Virus dar. Bei AAV konnte eine vollständige Blockierung der Transduktion nach wiederholter Virusgabe beobachtet werden, die wahrscheinlich auf neutralisierende Antikörper zurückzuführen ist (Halbert *et al.*, 2000). Auch bei den autonomen Parvoviren konnte eine Inhibierung der Genexpression nach der zweiten Virusgabe nachgewiesen werden. Durch Pseudotypisierung des MVMp Genoms in das Kapsid des H1 Virus ließ sich dieses Problem jedoch beheben (Kap. II/4.4). Theoretisch stehen noch mehr Parvoviren zur Pseudotypisierung des MVMP Genoms zur Verfügung, zum Beispiel RV, FPV und LuIII, bei denen keine gegenseitige Neutralisierung nachgewiesen werden konnte (Siegl, 1976). Die Umgehung der neutralisierenden Immunantwort durch eine vorübergehende Unterdrückung der Immunantwort, wie für AAV Viren erfolgreich festgestellt werden konnte (Halbert *et al.*, 1998), würde bei einer Tumorimmuntherapie allerdings wenig Sinn machen. Ein anderer Ansatzpunkt ist, wie bereits erwähnt, die Änderung der Virusstruktur, zum Beispiel durch Austausch des Promotors oder der Transgene, die eine Änderung der äußeren antigenen Epitope bewirkt (Mastakov *et al.*, 2002). Kürzlich wurde entdeckt, dass bereits der Austausch einer Aminosäure im Kapsid des MVMi Virus genügte, um einer neutralisierenden Immunantwort zu entgehen (López-Bueno & Almendral, 2002).

Die Persistenz der Antikörper kann auch eine Rolle für die Effizienz einer Readministration spielen. Für AAV konnte beobachtet werden, dass eine wiederholte Administration nach 2 oder 4 Wochen ins Gehirn die Transgenexpression stark reduzierte, nach 3 Monaten diese jedoch nicht mehr beeinträchtigte (Mastakov et al., 2002). Eine andere Arbeitsgruppe stellte trotz neutralisierenden Antikörpern keinen Verlust der Effizienz bei einer wiederholten Gabe von AAV nach 2 oder 4 Monaten ins Gehirn fest (Lo et al., 1999). Wahrscheinlich begünstigte in beiden Fällen der Gentransfer in das Gehirn diese Ergebnisse, da die Immunantwort aufgrund der Blut-Hirnschranke im Zentralnervensystem eingeschränkt ist. Dennoch sollte getestet werden, ob auch im Fall des MVMp Parvovirus eine wiederholte Virusgabe nach einem größeren Intervall als 2 Wochen ohne Wirkungsverlust möglich ist.

Serologische Untersuchungen ergaben, dass nur ein geringer Prozentsatz der Bevölkerung (maximal 5 %) seropositiv für Nagerparvoviren ist (Siegl *et al.*, 1984). Dies stellt einen entscheidenden Vorteil der autonomen Parvoviren gegenüber humaninfektiösen Viren, zum Beispiel AAV, Adeno- oder Herpesviren dar, gegen die einige Menschen bereits immun sind. Von 50 menschlichen Serumproben (USA) wiesen zum Beispiel 80 % AAV-spezifische Antikörper und 18 % AAV-neutralisierende Antikörper auf (Moskalenko *et al.*, 2000). Dabei können je nach Völkerpopulation

92

Schwankungen in der Verbreitung AAV-spezifischer Antikörper auftreten. Im Gegensatz zu den anderen Viren wird bei einer Gentherapie mit Nagerparvoviren die Effizienz nicht bereits zu Therapiebeginn durch eine neutralisierende Immunantwort beeinträchtigt.

2.1.2 Induktion einer Tumortherapie förderlichen Th1-Immunantwort

Bezüglich des Immunglobulinprofils insgesamt konnte nach Infektion mit MVMp Virus ein Anstieg von Gesamt IgG2c, dem IgG2a Analogon in C57Bl/6 Mäusen (Martin et al., 1998), und IgG3 Antikörpern festgestellt werden (Kap. II/4.2.1). Generell wurde bei viralen Infektionen unabhängig vom Mausstamm und der Infektionsdauer eine Prävalenz des IgG2a Isotyps unter den antiviralen Antikörpern beobachtet (Coutelier et al., 1987). Auch bei einigen Parvoviren wurde dieses Phänomen beschrieben, darunter CPV (Nicholas et al., 1987) und MVMi (Palmer et al., 2002). Diese Bevorzugung eines bestimmten Isotyps wird jedoch nicht einzelnen Eigenschaften der viralen Antigene zugeschrieben, sondern Mechanismen, die durch den Prozeß der Virusinfektion selbst gesteuert werden (Coutelier et al., 1988). Dadurch können virale Einflüsse auf das gesamte Immunglobulinprofil, also sowohl auf spezifische als auch unspezifische Antikörper, erklärt werden. Ein Vergleich der Immunisierung von Mäusen mit infektiösen und UV-inaktivierten Viren bestätigte, dass nicht die viralen Antigene, sondern der Infektionsprozeß für die unterschiedliche Gewichtung der Isotypen (überwiegend IgG2a für infektiöse bzw. IgG1 für UV-inaktivierte Viren) verantwortlich ist (Markine-Goriaynoff et al., 2000).

Obwohl die Produktion von IgG2a und IgG3 Antikörpern durch IFN- γ stimuliert wird (Snapper *et al.*, 1992), konnte in Typ I IFN Rezeptor defizienten (IFNAR-/-) Mäusen, in denen auch der IFN- γ Signalweg beeinträchtigt ist (Takaoka *et al.*, 2000), keine verringerte Konzentration dieser Subtypen im Serum festgestellt werden. Dies konnte auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden, indem nach Infektion IFN- γ defizienter Mäuse mit verschiedenen Viren zumindest partiell eine IFN- γ unabhängige IgG2a Produktion nachgewiesen wurde (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2000). Vereinzelt konnte nach viraler Infektion sogar eine erhöhte antivirale Antikörperbildung und eine gleichbleibende spezifische CTL Antwort erhalten werden (Graham *et al.*, 1993; Mo *et al.*, 1997). Daher ist es denkbar, dass die IgG2a

und IgG3 Antikörper nach parvoviraler Infektion entweder unabhängig von IFN- γ produziert oder die Effekte des IFN- γ in IFNAR-/- Mäusen durch andere Mechanismen kompensiert werden. Eine weitere Erklärung für ein gleiches Antikörperprofil in normalen und IFNAR-/- Mäusen nach MVMp Infektion bestünde darin, dass in den mutierten Mäusen die IFN- α/β Signalkaskade für die antiparvovirale IFN- γ Antwort keine Rolle spielt. Eine Bekräftigung dieser These liefert die kürzliche Beobachtung, dass das Fehlen des Typ I IFN Rezeptors in menschlichen Fibrosarkomzellen, die zuvor mit unterschiedlichen Dosen an IFN- γ inkubiert worden waren, die frühe antivirale IFN- γ Antwort gegen Enzephalomyokarditis Viren nicht signifikant beeinträchtigte (Costa-Pereira *et al.*, 2002).

Die Induktion von IgG2c und IgG3 Antikörpern nach Infektion mit MVMp deutet auf eine Immunantwort des Th1 Typs hin (Snapper & Mond, 1993; Germann et al., 1995). Im Allgemeinen wird eine Th1-Immunantwort von intrazellulären Erregern ausgelöst. Demnach kontrollieren Th1 Zellen die Abwehr vieler pathogener Viren, Mikroorganismen wie Bakterien, Protozoen und Pilze. Das Komplementsystem spielt dabei eine wichtige Rolle (Jankovic et al., 2001). Eine favorisierte Th1 Immunantwort wurde bisher bei den Parvoviren KRV (Chung et al., 2000), RV (Ball-Goodrich et al., 2002), CPV (Nicholas et al., 2002) und PPV (Lo-Man et al., 1998) beschrieben.

Unter diesem Gesichtspunkt kann ein parvoviraler Vektor in der Krebstherapie ein immunologisches Adjuvans darstellen, da Th1-begünstigende Zytokine die antitumorale Immunität verstärken (Dredge *et al.*, 2002).

Th1 Zellen unterstützen unter anderem die zelluläre Immunität. Verwunderlich ist, dass trotz der wahrscheinlichen Induktion einer Th1-Immunantwort durch MVMp, keine Virus spezifischen CTLs (zytotoxische Killerzellen) in C57Bl/6 Mäusen nachgewiesen werden konnten (Kap. II/4.1). Das heißt aber nicht, dass eine zelluläre Immunantwort grundsätzlich nicht etabliert wird, zumal bei den Parvoviren B19 (Tolfvenstam *et al.*, 2001) und KRV (Chung *et al.*, 2000) antivirale CTLs festgestellt werden konnten. Möglicherweise könnte unter anderen Bedingungen eine MVMp spezifische T-Zellantwort detektiert werden, zum Beispiel

94

durch eine intravenöse Immunisierung mit Virus, da dieser Infektionsweg die höchsten Antikörpertiter hervorrief (Kap. II/4.2.4) und man daher auch eine stärkere CTL-Antwort vermuten könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Mausmodell für eine MVMp Infektion zu restriktiv ist und die Verwendung eines anderen Mausstamms andere Ergebnisse aufweisen könnte. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Infektion von MVMi in C57Bl/6 Mäusen asymptomatisch verlief, während das gleiche Virus in zwei anderen Mausstämmen (DBA/2 und Balb/c) eine lethale Infektion verursachte (Brownstein *et al.*, 1991). Auch bei der Infektion mit dem Mäuseparvovirus MPV konnte ein Einfluß des Stammes und des Alters der Mäuse festgestellt werden (Besselsen *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel liefert eine AAV spezifische Antikörperbildung, die in C57Bl/6 Mäusen höchstens halb so hoch war wie in Balb/c Mäusen (Chirmule et *al.*, 2000).

Das Auftreten einer antiviralen zellulären Immunantwort nach Infektion mit MVMp Virus kann zwar nicht ausgeschlossen werden, aber es kann angenommen werden, dass sie sehr gering ist. Auch bei dem Schweineparvovirus PPV wurde kürzlich nur eine geringe antivirale CTL Aktivität nachgewiesen, die nach langer Infektionsdauer (80 Tage) am stärksten war und in vitro nicht weiter induziert werden konnte (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002). Als hauptsächlicher Schutzmechanismus des Wirts gegenüber einer akuten parvoviralen Infektion kann daher die Antikörperbildung angesehen werden.

Die geringe spezifische T-Zellantwort kann auch dadurch begründet werden, dass manche Parvoviren einen oder mehrere Mechanismen entwickelt haben, um einer vollständigen Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass die humorale Immunität allein zur Elimination von Rattenparvoviren nicht genügte, was die Autoren eine Involvierung der spezifischen T-Zellantwort dabei vermuten ließ. (Gaertner *et al.*, 1995; Jacoby *et al.*, 2000). Dass Parvoviren einer absoluten Beseitigung wiederstehen können, zeigt auch *"Aleutian Disease"*, eine persistierende Infektion mit ADV Parvoviren in Nerzen, die vor allem auf eine ständig aktivierte antivirale Immunabwehr zurückzuführen ist. Dabei sind hauptsächlich Antikörper und Immunkomplexe involviert (Ingram & Cho, 1984). Auch in MVMp infizierten Mäusen kann eine persistierende Virusinfektion aufgrund der langen Präsenz von antiviralen Antikörpern (mindestens 6 Monate) angenommen werden (Kap. II/4.2.5). Es könnte daher sein, dass auch in späten Infektionsstadien virale Genexpression oder Virusproduktion zu einem gewissen Maß stattfinden.

Verschiedene Mechanismen sind denkbar, die Parvoviren entwickelt haben, um im Wirt lange persistieren zu können. Es wurde festgestellt, dass Parvoviren die Synthese von Interferonen, die die erste antivirale Abwehr der Zelle darstellen, blockieren können. Dies konnte für IFN-ß und die Viren MVM, H1, und AAV nachgewiesen werden (Schlehofer *et al.*, 1992; unveröffentlichte Ergebnisse, L. Daeffler). Diese Tatsache könnte auch erklären, warum keine Unterschiede in der Agilität normaler C57Bl/6 und IFNAR-/- Mäuse nach MVMp Infektion beobachtet werden konnten. Nach MVMp Infektion kann in Mäusen lediglich eine asymptomatische Infektion beobachtet werden, weshalb MVMp in Mäusen als apathogen betrachtet wird (Kimsey *et al.*, 1986). Dabei spielen Interferone keine Rolle, da trotz fehlender Interferon Induktion in IFNAR-/- Mäusen keine Lethalität der Tiere festzustellen war (Kap. II/4.2.1).

Bei einigen Nagerparvoviren (zum Beispiel ADV, KRV, MVMp) können folglich kontroverse Virus-induzierte Reaktionen festgestellt werden. Auf der einen Seite scheinen sie das Immunsystem über eine Th1-Immunantwort zu stimulieren, auf der anderen Seite verstehen sie es jedoch auch, der Immunabwehr, und zwar hautpsächlich Virus-spezifischen CTLs, zu entgehen. Um beide Beobachtungen zu vereinen, wäre vorstellbar, dass Parvoviren das zelluläre Immunsystem aktivieren, ohne dabei die Immunantwort gegen sich selbst richten zu lassen. Dadurch ließe sich auch die im ⁵¹Cr-Freisetzungstest detektierte Antigen-unspezifische Lyse von MC57G Targetzellen durch Milzzellen MVMp infizierter Mäuse erklären (Kap. II/4.1.2).

Starke Th1 Antworten sind oft mit Autoimmunreaktionen verbunden (Druet *et al.*, 1996). Einige Autoimmunkrankheiten können tatsächlich mit Parvoviren assoziiert werden, zum Beispiel die rheumatoide Arthritis mit B19 (Takahashi *et al.*, 1998) und Typ I Diabetes mit KRV Parvovirus (1998; Chung *et al.*, 2000). Die Abstoßung

96

von Tumortransplantaten und allo- bzw. syngenen Hauttransplantaten wird durch das Parvovirus MPV gefördert (McKisic *et al.*, 1996; McKisic *et al.*, 1998). Es waren dabei auch jeweils T-Zellen, insbesondere des Th1 Typs, involviert, die nicht spezifisch gegen das Virus gerichtet waren. Dies deutet auf eine Virus-induzierte Störung des immunologischen Gleichgewichts hin. Es konnte festgestellt werden, dass die bei Autoimmunreaktionen vorliegenden Bedingungen die Regression von Tumoren begünstigen (Sioud, 2002). Daher könnte die Eigenschaft der Parvoviren, Autoimmunantworten zu unterstützen, eine wichtige Rolle bei ihrer antitumoralen Aktivität spielen.

2.2 Das Gelingen der parvoviralen Gentherapie im Tumormodell

Schon die ersten präklinischen Versuche mit IL-2 und MCP-3 transduzierenden rekombinanten H1 Viren in dem permissiven HeLa/Nacktmausmodell demonstrierten eine erfolgreiche antitumorale Gentherapie mit rekombinanten Parvoviren (Haag *et al.*, 2000; Wetzel *et al.*, 2001). Dieser Erfolg ließ sich auch in immunkompetenten Mäusen mit MVMp/IP-10 Viren im H5V Hämangiosarkom (Giese *et al.*, 2002) und mit MVMp/MCP-3 Viren im B78/H1 Melanom Tumormodell erzielen (Wetzel, 2000). Mit diesen Versuchen wurde somit bereits gezeigt, dass rekombinante parvovirale Vektoren effiziente Überträger von Zytokinen bzw. Chemokinen sind und dadurch in der Regel eine stärkere antitumorale Aktivität besitzen als ihre Wildtyp Viren.

Die Resultate dieser Arbeit (Kap. II/3.3) bestätigen ebenfalls die generelle Durchführbarkeit einer parvoviralen Tumortherapie, wenn auch die erlangten antitumoralen Effekte geringer waren als mit MVMp/MCP-3 Viren im Melanommodell, in dem unter gleichen ex vivo Versuchsbedingungen eine vollständige Tumorregression erreicht werden konnte. Dadurch wird deutlich, wie stark sowohl das Tumormodell, als auch die verwendeten Transgene das Gelingen der Therapie beeinflussen können. Ein Testversuch zeigte zum Beispiel keine antitumoralen Effekte der MVMp/MCP-3 Viren im RENCA/Balb/c Mausmodell, obwohl bei der MVMp-Infektion von RENCA und B78/H1 Zellen in vitro keine Unterschiede in der Infizierbarkeit festgestellt werden konnten (Wetzel, unveröffentlichte Ergebnisse). Vor kurzem konnte beobachtet werden, dass RENCA Zellen eine Immunsuppression induzierten, obwohl die Zellen selbst nicht direkt immunsuppressiv wirkten (Banat *et al.*, 2001). Dabei wird nicht die Sekretion immunsuppressiver Substanzen, sondern die Induktion der Anergie und der Autolyse von Lymphozyten durch RENCA Tumore als Ursache diskutiert. RENCA Zellen reduzieren somit drastisch die T-Zellaktivität. Dies konnte auch früher schon festgestellt werden (Gregorian & Battisto, 1990). Aufgrund der hervorgerufenen Immunsuppression sind RENCA Tumore wahrscheinlich schwieriger zu therapieren als Melanomtumore. Dies erklärt auch die limitierten antitumoralen Effekte in diesem Tumormodell.

Durch Verbesserung der Antigenpräsentation konnte der RENCA-vermittelten Immunsuppression dagegen vorgebeugt werden (Banat *et al.*, 2001). Dies zeigt, dass oft der erste Kontakt des Immunsystems mit dem Tumor für eine antitumorale Immunantwort ausschlaggebend ist. Die gezielte Immunstimulation stellt daher einen vielversprechenden Ansatz in der Tumortherapie dar.

2.3 Kein synergistischer Effekt der IL-2 / Chemokin Kombinationstherapien

Da die parvovirale Infektion von RENCA Zellen *in vitro* nur sehr geringe zytotoxische Effekte bewirkt, eignete sich das RENCA/Balb/c Mausmodell zur Studie der Transgene. Im Blickpunkt standen dabei die antitumoralen Effekte des neu entdeckten Chemokins MDC und die Kombinationstherapie mit dem bewährten Zytokin IL-2. MDC, das unreife DCs effektiv anzulocken vermag, könnte die Tumorantigenpräsentation unterstützen und dadurch die antitumorale Immunität erhöhen. Dies konnte auch in einer ersten Studie belegt werden, indem die Transduktion von MDC in einen 3LL Lungentumor meistens zur vollständigen Regression des Tumors führte und eine tumorprotektive Immunität induzierte (Guo *et al.*, 2002). Auch im RENCA Tumormodell war ein antitumoraler Effekt des MDC zu beobachten, der jedoch nicht zur Eliminierung des Tumors führte.

Die immunologische Wirkung des MDC unterscheidet sich wahrscheinlich von der des IL-2, daher wäre ein synergistischer antitumoraler Effekt bei der Transduktion beider Proteine MDC und IL-2 in den Tumor denkbar. MDC könnte dabei als "Immunzell-Anlocker" und IL-2 als "Aktivator" fungieren. Mit beiden Transgenen IL-2 und MDC wurden antitumorale Wirkungen nachgewiesen, die Kombinationstherapie blieb jedoch ohne zusätzlichen Effekt (Kap. II/3.3.1). Eine Erklärung könnte eine Hemmung der Wirkung eines der Modulatoren durch das andere darstellen. MDC wird mit Th2 Antworten in Verbindung gebracht, während IL-2 Th1 Antworten induziert. Es wurde ferner festgestellt, dass besonders Th1 Zellen eine bestimmte Dipeptidylpeptidase exprimieren, die das MDC Protein am Ende spalten und somit eine Interaktion dieser kürzeren Proteinfragmente mit dem bisher einzig identifizierten CCR4 Rezeptor unterbinden können (Mantovani *et al.*, 2000). Dass die durch MDC geförderte Th2 Antwort durch eine Th1 Umgebung negativ reguliert werden könnte, bestätigt auch die Inhibierung der konstitutiven MDC Produktion durch das Th1 Zytokin IFN- γ (Bonecchi *et al.*, 1998).

Ebenfalls zu keinem stärkeren Effekt als eine Einzeltherapie führte die Kombination der beiden antitumoralen und Th1 induzierenden Transgene IL-2 und IP-10. Auch in einigen anderen Fällen konnten in vielversprechenden Kombinationstherapien keine synergistische Wirkungen erzielt werden, so zum Beispiel bei gleichzeitiger Transduktion von IL-12/IL-2 oder IL-12/GM-CSF in murine TS/A Tumore (Puisieux et al., 1998). In beiden Fällen führte die Kombinationstherapie nicht zu einer Wirkungsverstärkung gegenüber den jeweiligen Einzeltherapien. Da jedoch beide Zytokinkombinationen in anderen Versuchen auch synergistische Effekte zeigten (Addison et al., 1998; Wang et al., 2001), hat das Tumormodell wahrscheinlich einen großen Einfluß auf die Wirkung einer Kombinationstherapie. Ein Beispiel dafür ist auch die unterschiedliche Wirkung derselben Kombinationstherapie (IL-2/Lymphotaktin) in zwei ähnlichen Brustkrebsmodellen, in denen je nach Modell unterschiedlich ausgeprägte antitumorale Effekte erhalten werden konnten (Emtage et al., 1999). Somit könnte auch das eher immunsuppressive RENCA/ Balb/c Maus Tumormodell die Ursache dafür sein, dass bei den Kombinationstherapien des MVMp/IL-2 mit MVMp/MDC oder MVMp/IP-10 kein synergistischer antitumoraler Effekt zu beobachten war.

2.4 Möglichkeiten der Vakzinierung mit Parvoviren

Neben der immunmodulierenden Tumortherapie durch Zytokin oder Chemokin transduzierende rekombinante Parvoviren, können Tumor-assoziierte Antigen-

exprimierende Parvoviren auch für Tumorvakzinierungsstrategien angewandt werden. Dafür sprechen verschiedene Gründe. Zum einen sind Parvoviren mit zytotoxischen Eigenschaften ausgestattet, die nicht nur das Absterben der Tumorzellen bewirken, sondern dabei auch das für die Aktivierung von tumorspezifischen CTLs wichtige *"danger signal"* vermitteln, zum Beispiel in Form von Hitzeschockproteinen (HSP) (Möhler *et al.*, 2003). HSP vermögen das Immunsystem auf vielfältige Weise zu stimulieren, unter anderem auch DC, und sind daher für die Tumortherapie von besonderem Interesse (Srivastava & Amato, 2001). Bei einer Tumorzellvakzinierung könnte daher durch Infektion der Tumorzellen mit Parvoviren die *cross presentation* aufgrund von vermittelten *"danger"* Signalen gefördert werden. Eine parvoviral induzierte Th1 Immunantwort könnte darin unterstützend wirken.

Bei einer Applikation in vivo würden entsprechende Vektoren, zum Beispiel MVMi, nicht nur Tumorzellen, sondern günstigerweise auch Zellen der lymphatischen Organe mit TAAs transduzieren. Die Vakzinierung könnte jedoch auch im Sinne einer adoptiven Therapie verlaufen, indem Tumor- oder Immunzellen ex vivo mit viralen Vektoren beladen werden. Der Vorteil dabei wäre die bei in vitro Infektionen von Zellen vorliegende größere Infektionseffizienz gegenüber in vivo Infektionen. Für die Vakzinierung könnten rekombinante Viren, die immunstimulierende oder zytotoxische Gene tragen, wie zum Beispiel Apoptin (Olijslagers et al., 2001), unterstützend eingesetzt werden.

In einigen Versuchen konnte bereits die Generierung einer protektiven Anti-Tumorimmunität durch Vakzinierung mit rekombinanten Parvoviren nachgewiesen werden. Die ex vivo Infektion muriner K1735 Melanomzellen mit MVMp/IL-2 verhinderte zum Beispiel die Bildung später implantierter, unbehandelter K1735 Zellen zu 70 % (Clément et al., 2002). Die MVMp/MCP-3 Infektion (ex vivo) anderer Melanomzellen (B78/H1) erzeugte in mindestens 50 % der Fälle eine antitumorale Immunität (Wetzel, 2000). Bei wiederholter Administration von MVMp/IP-10 Virus in vivo konnte die Metastasenbildung deutlich unterdrückt werden (Giese et al., 2002). Generell konnte beobachtet werden, dass immunstimulierende rekombinante Parvoviren eine stärkere antitumorale Protektion bewirken als Wildtyp Viren. Nur in ausgewählten Tumormodellen ist bereits die Vakzinierung mit

100

Wildtyp Viren für eine dauerhafte antitumorale Immunität ausreichend, wie zum Beispiel im P815/DBA/2 Modell (Kap. II/2.3).

Mit Parvoviren werden zur Zeit auch weitere Vakzinationsziele verfolgt. Durch den spezieller Transgene, Beispiel bakterieller oder Einbau zum viraler Oberflächenproteine, kann eine protektive Immunantwort gegen eine Infektionskrankheit erhalten werden, zum Beispiel gegen den bakteriellen Erreger der Lyme-Borreliose (Palmer et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit bietet sich mit parvoviralen virus-like particles (VLPs), die immunogene Epitope infektiöser Erreger enthalten und nach Vakzinierung vor einer lethalen Infektion, zum Beispiel durch das lymphozytäre Choriomeningitis Virus, schützen können (Casal et al., 1999).

Insgesamt zeigen diese ersten Ergebnisse der Vakzinierungsversuche eine vielversprechende Perspektive für die zukünftige Anwendung von Parvoviren in der Tumortherapie.

IV Material und Methoden

1 Material

1.1 Plasmide

Im folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide unter Angabe des laborinternen Codes, der üblichen Bezeichnung und der jeweiligen Referenz bzw. des Herstellers aufgelistet.

Code:	Bezeichnung:	Referenz:
# 245	H1/pBk-CMV-VP	Kestler <i>et al.</i> , 1999
# 325	MVMp/∆800	Kestler <i>et al.</i> , 1999
# 364	MVMp/CMV-VP	Kornfeld, Diplomarbeit 1997
# 366	MVMp/GFP	Kornfeld, Diplomarbeit 1997
# 372	MVMp (pd BMVp)	Kestler <i>et al</i> ., 1999
# 381	MVMp/IL-2	Haag, nicht veröffentlicht
# 383	MVMp/MDC	Stroh-Dege, nicht veröffentlicht
# 393	MVMp/IP-10 (crg-2)	Giese <i>et al.</i> , 2002
# 404	MVMp/EGFP	Stroh-Dege, nicht veröffentlicht

1.2 Zelllinien

293T	humane Nierenzelllinie, transformiert mit SV40 T-Antigen und Ad5
NBK (NB-324K)	humane, fötale Nierenzelllinie, transformiert mit SV40 T-Antigen
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie
A9	murine Bindegewebszelllinie, abstammend von L929
RENCA	murine Nierenadenokarzinomzelllinie
TS/A	murine Mammaadenokarzinomzelllinie
B78/H1	murine Melanomzelllinie
H5V	murine Endotheliomzelllinie
P815	murine Mastozytomzelllinie
MC57G	murine Fibrosarkomzelllinie
RMA	murine T-Lymphomzelllinie

1.3 Zellkulturmedien

Als Zellkulturmedien wurden je nach Zellart und Anwendung <u>DMEM</u> (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma), <u>MEM</u> (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma), <u> α -MEM</u> (*Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification*, Sigma) oder <u>RPMI</u> (*RPMI 1640 Medium*, Sigma) verwendet. Das Serum-reduzierte Medium <u>Opti-MEM I</u> (Modifikation von *Eagle's Minimum Essential Medium*, Invitrogen) wurde bei Transfektionen eingesetzt.

Alle **Komplettmedien** enthielten 5 oder 10 % fötales Kälberserum (FCS, Invitrogen), 2 mM-*L*-Glutamin (Invitrogen) und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen). DMEM-Komplettmedium wurde für die Zellen 293T, HeLa, RENCA, TS/A, B78/H1, H5V und P815, MEM-Komplettmedium für die Zellen NB-324K und A9, und RPMI-Komplettmedium für die Zellen RMA verwendet.

Besondere Medienzusätze wurden benötigt für:

MC57G: 1 mM-Natriumpyruvat MEM (Gibco) = MEM-Komplettmedium/plus

Milzzellen: 0,5 % β-ME-Stocklösung = α-MEM-Komplettmedium/plus (für die *in vitro* Stimulierung von Milzzellen)

> 0,5 % ß-ME-Stocklösung = RPMI-Komplettmedium/plus (für den zytotoxischen T-Zelltest)

1.4 Chemikalien

Säuren, Basen, anorganische und organische Lösungen stammen von den Firmen Amersham, Merck, Roth, Serva oder Sigma in der jeweils höchsten Reinheitsstufe.

1.5 Puffer und Lösungen

ACK-Lysepuffer 150 mM-NH₄Cl 10 mM-KHCO₃ 0,1 mM Na₂EDTA pH 7,2 - 7,4 sterilfiltrieren, Lagerung bei RT

<u>B-Mercaptoethanol (ME) Stocklösung</u> 10 µl B-ME-Lösung (Sigma) 50 ml RPMI Medium (Sigma) sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

Blocklösung 10 % Milchpulver 0,2 % Tween 20 in PBS

Coating Puffer

10x NaHCO₃: 2,93 g /100 ml H₂O 10x Na₂CO₃: 1,59 g /100 ml H₂O jeweils 1 ml ad 10 ml H₂O (pH 9,6) Lagerung bei 4°C bis zu 1 Monat

Denaturierungspuffer 1,5 M NaCl 0,5 M NaOH <u>10 x Elektrodenpuffer</u> 30 g Tris 144 g Glycin 50 ml 20 % SDS 1000 ml H₂O; pH 8,64

2x HBSS 280 mM NaCl 50 mM HEPES 12 mM D-Glucose 10 mM KCl 1,5 mM Na₂HPO₄ pH 7,6

Hybridisierungspuffer 3 x SSC 1 % SDS 5 mM EDTA 10 x Denhardt's

Ladepuffer 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 50 % Glycerin 1 mM EDTA 1x TAE ad 100 ml H₂O LB-Medium 1 % Bacto-tryptone 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl in H₂O, pH 7

MEM 2x komplett 77 % MEM 2x 17 % FCS 2 % L-Glutamin (200 mM) 2 % Antibiotika (100 mg/ml) 2 % Nystatin

<u>Neutralisierungspuffer</u> 1,5 M NaCl 0,5 M Tris/HCl (pH 7,2) 1 mM EDTA

Neutralrot-Färbelösung 0,33 % in H₂O

PBS 2x 273,8 mM NaCl 5,4 mM KCl 9,8 mM KH₂PO₄ 3,6 mM K₂HPO₄ pH 7

2x Proteinase Puffer 20 mM Tris-HCl (pH 8=) 20 mM EDTA 1 % SDS

Protein-Ladepuffer 2x 100 mM Tris/HCl (pH 6,8) 286 mM β-Mercaptoethanol 20 % Glycerin 2 % SDS 0,6 % Bromphenolblau

Sammelgel 14,2 ml H₂O 3,0 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 0,5 M-Tris 100 µl 20 % SDS 200 µl 10 % Ammoniumpersulfat 20 µl TEMED **TAE-Puffer** 40 mM Tris/Acetat 1 mM EDTA pH 8 **TE-Puffer** 10 mM Tris/HCl (pH 8) 1 mM EDTA **Transferpuffer** 6,055 g Tris 28,5 g Glycin 5 ml 20 % SDS 200 ml Methanol in 1000 ml H₂O, Lagerung bei 4°C Trenngel 15,9 ml H₂O 13,3 ml 30 % Acrylamid 10,0 ml 1,5 M-Tris (pH 8,8) 0.2 ml 20 % SDS 0,4 ml 10 % Ammoniumpersulfat 16 µl TEMED VTE (Virus-TE) 50 mM Tris/HCl (pH 8,7) 0,5 mM EDTA Waschlösung 1 3 x SSC 1 % SDS Waschlösung 2 0,3 x SSC 1 % SDS

2 Molekularbiologische Methoden

2.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien

E. coli Bakterien wurden in LB-Medium oder auf Agarplatten mit selektivem Antibiotikum-Zusatz bei 37°C kultiviert. Suspensionskulturen wurden auf einem Bakterienschüttler über Nacht bei ca 200 rpm geschüttelt. Unter diesen Bedingungen befanden sich die Bakterien am nächsten Morgen in der stationären Phase. Zur Kryokonservierung (Glycerolstock) wurden 850 µl der Bakterienkultur mit 150 µl sterilem Glycerol (100%) versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

2.2.1 Minipräparation zur Isolierung von Plasmid-DNA

5 ml LB-Medium, versetzt mit selektiven Antibiotika, wurden mit Bakterienkolonien von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht unter Schütteln kultiviert. Die Extraktion der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mit dem "Plasmid Mini Kit" von QIAGEN nach Angaben des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.2 Maxipräparation zur Isolierung von Plasmid-DNA

Eine Vorkultur von 6 ml LB-Medium, versetzt mit selektiven Antibiotika, wurde mit Bakterien aus einem Glycerolstock angeimpft und für 8 h unter Schütteln inkubiert. Je 1,5 ml davon wurden zu je 250 ml frischem LB-Medium, ebenfalls mit selektiven Antibiotika versetzt, zugegeben und über Nacht unter Schütteln kultiviert. Nach 14 bis 16 h, nachdem die stationäre Phase der Bakterien erreicht war, erfolgte die Extraktion der Plasmid-DNA, basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, mit dem "Plasmid Maxi Kit" von QIAGEN nach Angaben des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde in 1 ml TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Als Endkontrolle wurde das Plasmid einer spezifischen Restriktionshydrolyse (siehe 2.4.2) unterzogen und schliesslich bei –20°C aufbewahrt.

2.3 Isolierung von Nukleinsäuren aus Gewebe

2.3.1 Extraktion von DNA

Die Extraktion von viraler DNA aus Gewebe und Organen erfolgte mit dem QIAamp Tissue Kit (QUIAGEN) nach Angaben des Herstellers. Die über eine Säule aufgereinigte DNA wurde bei –20°C aufbewahrt.

2.3.2 Extraktion von RNA

Zur Isolierung von RNA wurde das entsprechende Gewebe mit 1 ml des Reagenz TRIzol[®] (Invitrogen), das Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält, lysiert und in Matrix-Röhrchen (Lysing Matrix D[®], Qbiogene) unter hoher Zentrifugationsgeschwindigkeit (3 x 20 sec, *speed* 5; FastPrep[®], Qbiogene) homogenisiert. Um eine Degradation der RNA zu vermeiden, wurden die Proben zwischen den Zentrifugationsschritten auf Eis abgekühlt. Zur Trennung der RNA von den übrigen

Zellbestandteilen wurde 200 µl Chloroform je ml zugegeben, gut vermischt und zur Phasentrennung 3 min stehen gelassen. Nach Zentrifugation (13 rpm, 4°C, 15 min) wurde die obere RNA-haltige wässrige Phase vorsichtig abgenommen, zur Präzipitation mit gleichem Anteil Isopropanol vermischt und 10 min inkubieren lassen. Das Pellet (13 rpm, 4°C, 10 min) wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 200 µl 1 mM-EDTA resuspendiert. Bei von der Normgröße abweichenden Pellets wurde die Lösungsmittelmenge an die Pelletgröße angepasst. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die RNA in 1 mM-EDTA 1:10 verdünnt und in einer Mikroküvette photometrisch bei 260 nm gemessen (siehe 2.4.1). Die Lagerung erfolgte bei –80°C und während der Vearbeitung immer auf Eis.

2.4 Analyse von Nukleinsäuren

2.4.1 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit

Nukleinsäuren zeigen aufgrund der in ihnen enthaltenen Basen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm im ultravioletten Bereich, Proteine dagegen absorbieren hauptsächlich bei 280 nm. Bei 260 nm entspricht eine Absorption von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm jeweils einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 33 µg/ml ssDNA und 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis zwischen den gemessenen Absorptionen bei 260 und 280 nm gibt Aufschluß über eine eventuelle Verunreinigung der DNAoder RNA-Probe mit Proteinen. Bei reinen Nukleinsäure-Lösungen liegt der Quotient beider Werte (A_{260/260}) zwischen 1,8 und 2.0.

2.4.2 Restriktionshydrolyse

DNA kann mit Restriktionsenzymen (Invitrogen, Roche, New England Biolabs) spezifisch gespalten werden. Diese Eigenschaft nützt man zur Kontrolle von Plasmiden oder zur Isolierung bestimmter DNA-Fragmente. Zu analytischen Zwecken wurde 1 μ g DNA mit 5 Enzymeinheiten unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen und einer Inkubation von mind. 1 h umgesetzt. Die gespaltenen DNA Fragmente wurden in einer Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt und sichtbar gemacht (siehe 2.4.3). In der Tab. 12 ist angegeben, mit welchem Enzym jedes Plasmid analytisch überprüft wurde und welche Fragmente die Restriktionshydrolyse jeweils ergibt.

Code	Plasmid	Enzym	Fragmente
# 325	MVMp / Δ800	Nco I	1638, 4781
# 381	MVMp / IL-2	Eco 47 III	829, 6106
# 383	MVMp / MDC	Bgl II	651, 6044
# 393	MVMp / IP-10 (crg-2)	Eco R I	575, 1714, 4874
# 366	MVMp / GFP	Spe I	3079, 4071
# 404	MVMp / EGFP	Nco I	963, 1638, 4587
# 364	MVMp / CMV-VP	Spe I	976, 1675, 4997
# 245	H1 / pBk-VP	Afl III	1031, 2924, 3032

Tab. 12: Plasmidüberprüfende Restriktionshydrolysen

2.4.3 Agarosegelelektrophorese

Die negativ geladene DNA lässt sich in einem Agarosegel (Agarose NA, Pharmacia) durch Elektrophorese nach Größe auftrennen. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, um das Einfüllen in die Geltaschen zu erleichtern und den Verlauf des Geles verfolgen zu können. In der Regel wurden die Proben in 1%-igen Agarosegelen, die 1 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) enthielten, in 1x TAE-Puffer bei einer Stromstärke von 12 mA pro cm Gel aufgetrennt. Die Auftrennung sehr kleiner Fragmente (zum Beispiel PCR-Produkte) erfolgte in 2%-igen Agarosegelen. Ethidiumbromid lagert sich in die α -Helix der DNA ein und macht sie somit unter UV-Licht sichtbar. Die Banden wurden mit einer Polaroidkamera (Image master VDS[®], Pharmacia) fotografisch festgehalten.

2.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zu präparativen Zwecken wurde ein größerer Ansatz mit Restriktionsenzymen verdaut und soviel wie möglich in eine Geltasche aufgtragen. Nach Beendigung des Gels wurde das gewünschte Fragment auf einer Leuchtplatte mit etwas weniger schädlichem längerwelligen UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell so knapp wie möglich aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA unter Abtrennung der Agarose erfolgte mit dem Qiaquick Gel Extraktionskit[®] (Quiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.4.5 Abschätzung der DNA-Konzentration durch Gelelektrophorese

Die Konzentration einer DNA-Probe kann auch im Agarosegel abgeschätzt werden. Dazu wurd ein Marker bekannter Konzentration und Fragmentgröße in verschiedenen Verdünnungen, ebenso wie die Probe, auf das Gel geladen. Am Ende wurden Banden gleicher Intensität miteinander verglichen. Der DNA-Gehalt der Probe errechnet sich aus dem Produkt der Gesamtmarkermenge (ng) und der Basenlänge der entsprechenden Bande, geteilt durch die Summe aller Markerfragmente. Die eingesetzten Verdünnungen müssen ebenfalls berücksichtigt werden.

2.5 Nachweis von Nukleinsäuren

2.5.1 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA Sonden

Virale DNA kann unter anderem durch Hybridisierung mit Virus-spezifischen Sonden nachgewiesen werden. Es wurde eine für alle Viren verwendbare NS Sonde, sowie Virus-spezifische IL-2 und GFP Transgensonden hergestellt. MDC eignete sich aufgrund seiner kleinen Größe nicht als Sonde. Für jede Sonde wurde 50 µg geeignetes Plasmid mit entsprechenden Enzymen (siehe Abb. 57) hydrolysiert, die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt und die Sonden-DNA daraus isoliert (siehe 2.4.4). Die Sondenkonzentration wurde wie in 2.4.5 beschrieben gemessen.

Die DNA-Sonden wurden mit dem *MegaprimeTM DNA labelling system* (Amersham) mit Zufallsoligomeren, Nukleotiden, radioaktivem ³²P-dCTP und Klenow-Enzym nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Pro Ansatz betrug die Strahlendosis 50 µCi. Nach 1 h Inkubation wurde das Volumen eines Ansatzes um 150 µl TE-Puffer vergrößert. Nichtinkorporierte Nukleotide wurden über eine Sephadex G 50



Abb. 57: Darstellung der als Sonde genutzten viralen Fragmente

Die virale NS-Sonde (1638 nt) liegt im NS-kodierenden Bereich zwischen den beiden Nco I Schnittstellen (nt 259 und 1897). Sie ist bei allen MVMp-Viren anwendbar. Bei den beiden Transgen-Sonden IL-2 (549 nt) und GFP handelt es sich um die gleichen Fragmente, die auch für die Klonierung in den MVMp/ Δ 800 Vektor verwendet wurden. Sie sind spezifisch für die rekombinanten Viren MVMp/IL-2 bzw. MVMp/GFP oder MVMp/EGFP.

(Pharmacia) Säule abgetrennt, indem sie aufgrund ihrer kleinen Größe gut in die Sephadex-Poren eindringen können und später als die Sonden-DNA eluiert werden. Die Inkorporationsrate radioaktiver Nukleotide in die Sonde wurde in einem Cerenkov-Counter[®] (Bioscan) bestimmt und die Sonde nach 10 minütiger Denaturierung bei 95°C für eine Hybridisierung eingesetzt.

Zum Nachweis viraler DNA wurden entweder Virus-infizierte Zellen oder blanke Virus-DNA auf Nitrocellulose Membranen (Schleicher & Schuell) oder Nylonmembranen (HybondTM-N, Amersham) durch einfaches Auflegen oder Vakuum-Sog transferiert. Nach 6 min Denaturierung im Denaturierungspuffer und 10 min Neutralisierung im Neutralisierungspuffer wurde die DNA auf den Membranen durch 2 h Backen bei 80°C fixiert. Um ein unspezifisches Hybridisieren der Sonde zu vermeiden, wurde die auf den Membranen fixierte DNA mit 0,2 ng gescherter aufgekochter Heringssperma-DNA (Roche) pro ml Hybridisierungslösung für mind. 1 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die denaturierte, radioaktiv markierte spezifische Sonde zu den Filtern in der Hybridisierungslösung gegeben und ü.N. bei 65°C inkubieren lassen. Überschüssige markierte Sonden-DNA wurde durch mehrmaliges Waschen (2x 30 min Waschlösung 1 und 1x 30 min Waschlösung 2) entfernt. Nach dem Trocknen wurden die radioaktiven Filter in Haushaltsfolie eingeschlagen und für die Exposition eines Röntgenfilms (X-Omat AR, BioMax MS, Kodak) bei –80°C verwendet. Je nach Signalstärke wurde einige Stunden bis Tage exponiert. Jeder schwarze Punkt wurde als positives Signal gewertet.

2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR= <u>Polymerase Chain Reaktion</u>) ist ein Verfahren zur selektiven Anreicherung von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Zwei ausgewählte Oligonukleotide (MWG AG Biotech), auch Primer genannt, legen die äußere Begrenzung der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz fest. Nach Hitzedenaturierung des zu analysierenden DNA-Gemisches bei 95°C hybridisieren die Primer mit der Zielsequenz bei der Annealing-Temperatur, die etwa 5°C unter der Temperatur T_M liegt. T_M ist die Temperatur, bei der 50% der Primerstränge denaturiert sind, sie ist von der Basenzusammensetzung und Länge der Primer abhängig ist und errechnet sich nach folgender Formel: T_M= (A+T)*2°C + (G+C)*4°C Für jede Reaktion wurde etwa 1 µg an Nukleinsäuren eingesetzt. Das Reaktionsgemisch (50 µl) beinhaltete neben der thermostabilen *Taq* DNA Polymerase (1 unit, Invitrogen), die den Komplementärstrang synthetisiert, PCR-Puffer (Invitrogen), MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), einzelne Nukleotide (2,5 mM; Sigma) und *Primer* (0,2 µM). Die Angaben der Hersteller wurden dabei berücksichtigt. Um unspezifische Primer Bindungen zu vermeiden, wurde eine *Hot-Start* PCR imitiert, indem die Proben direkt nach dem Pipettieren kurz auf 95°C erhitzt wurden. Es wurden jeweils 36 Zyklen durchlaufen. In Tab. 13 sind alle in der Arbeit verwendeten *Primer* unter Angabe der *Annealing*-Temperatur und Länge der Fragmentprodukte aufgelistet. Die Primersequenzen (*sense* und *anti-sense*) sind jeweils in 5'→3' Richtung angegeben.

Drimor	Annealing-	PCR-Produkt-	5' \rightarrow 3' Primersequenzen	
Primer	Temp. (°C)	länge (nt)	(sense / anti-sense)	
ß-Aktin	52	489	ATG TTT GAG ACC TTC AAC AC	
	JZ		CAC GTC ACA CTT CAT GAT GG	
HPRT	58	167	GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G	
	50		GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C	
	60	764	CTG AAT GGA AAA GAT ATC GGA TGG AAT AG	
	00		CAG CTC TTT AAG TGT AGT TTT AAT AGA AAC TTC	
NS/VP *	60	414 spliced	ACG CTC ACC ATT CAC GAC ACC GAA A	
	00	511 unspliced	ATC ATA GGC CTC GTC GTG CTC TTT G	
11 - 2	58	307	ACA GCT ACA ACT GGA GCA TT	
			TGC TGT CTC ATC AGC ATA TT	
MDC	56	267	CTA CAG ACT GCA CTC CTG GTT	
			GGC TCA GCT TAT TGA GAA TCA T	
Granzym B	58	253	ACT CAA ACA CGC TAC AAG A	
			ATC CAG GAT AAG AAA CTC G	
Perforin	58	486	GGT GGA GTG GAG GTT TTT GTA CC	
	50		CAG AAT GCA AGC AGA AGC ACA AG	
IFN-γ	60	237	AAC GCT ACA CAC TGC ATC TTG G	
			GAC TTC AAA GAG TCT GAG G	
FasL	50	924		
CTLA-4	53	438		
iNOS	60 53	828 309		
COX-2				

Tab. 13: Verwendete Primer unter Angabe der Annealing-Temperatur und der Länge des PCR-Produkts

* NS/VP *Primer* startet in NS1 Sequenz (nt 1997) und endet in VP Sequenz (nt 2508) und ist daher nur für MVMp Wildtyp Viren verwendbar. Die Fragmentsequenz beinhaltet ein Intron. Dadurch kann zwischen viraler DNA (mit Intron, *unspliced*, 511 nt) und viraler mRNA (ohne Intron, *spliced*, am häufigsten 414 nt) unterschieden werden.

2.5.3 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist ein spezielles PCR Verfahren zum Nachweis von RNA Molekülen. Die RNA wurde dabei zunächst durch ein Enzym, die Reverse Transkriptase (RT), in komplementäre cDNA umgeschrieben. Weil die RNA Probe mit DNA verunreinigt sein kann, wurde die Probe (1 µg/10 µl) vor der RT-Reaktion einem DNase-Verdau (1u DNase/µl) nach Angaben des Herstellers (Invitrogen oder Promega) unterzogen und anschließend kurz erhitzt, um entstandene RNA-Doppelstränge zu vereinzeln (5 min 70°C, 5 min 4°C, 5 min 25 °C). Das Reaktionsgemisch (10 µl) für die Konversion in cDNA (RT-Reaktion) beinhaltete 1unit RT (Promega), Reaktionspuffer (Promega), Oligonukleotide als Zufalls-*Primer* (1 µl, Invitrogen), Nukleotide (2,5 mM, Sigma) und RNasin (0,5 µl, Promega). Die Angaben der Hersteller wurden dabei berücksichtigt. Diese 10 µl wurden der inzwischen 15 µl betragenden RNA Probe zugegeben und inkubiert (60 min 37°C, 5 min 90°C, 15 min 4 °C°). Die fertige cDNA wurde mit TE nach Bedarf (1:2 bis 1:10) verdünnt und bei 4°C oder -20°C gelagert. Für PCR-Reaktionen (siehe 2.5.2) wurden in der Regel 10 µl cDNA eingesetzt.

3 Biochemische Methoden

3.1 Isolierung von Proteinen aus Säugetierzellen

Zum Nachweis parvoviraler Proteine (NS und VP) wurden in der Regel 1×10^6 Zellen je 10 cm Kulturschale mit Virus infiziert (moi 3) und nach unterschiedlichen Zeitpunkten, meistens 30 oder 48 h, lysiert. Die Zellen wurden dabei durch Trypsinierung geerntet, mit PBS gewaschen und pelletiert. Jedes Zellpellet wurde nach Abnahme des Überstands in der restlichen Flüssigkeit (1-2 Tropfen) resuspendiert und in ein Eppendorf Gefäß überführt. In das Zentrifugenröhrchen wurden 250 µl Protein-Ladepuffer 2x gegeben, um übrige Zellen darin zu lösen. Die viskos werdende Flüssigkeit wurde möglichst schnell in das Eppendorf Gefäß transferiert und kurz mit den Zellen gemischt. Die Suspension wurde stets auf Eis gekühlt und bei –20°C gelagert. Die Proteine wurden im Western Blot analysiert.

Zum Nachweis von Transgenproteinen, die in den Überstand sezerniert werden, wurden 5×10^4 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät und mit Virus (moi 10) infiziert. Der Überstand der Zellen wurde an jedem Tag (Tag 1 bis 7) abgenommen, zentrifugiert und in 1 ml Aliquots eingefroren (-80°C). Für die tägliche Transgenproduktion wurde der abgenommene Überstand jeweils durch neues Medium ersetzt. Die Proteine wurden im ELISA (3.2.4) analysiert.

3.2 Proteinanalyse

3.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde jeweils das diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gel nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970). Das Sammelgel enthielt dabei 5 %, das Trenngel 10 % Polyacrylamid. Nach dem Einspannen des Gels in eine Gelkammer und Einbettung in Elektrodenpuffer wurden die Proben in die Geltaschen geladen. Vor dem Auftragen wurden die Proben kurz auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte ü.N. bei einer Stromstärke von 10 mA pro Gel. Als Protein-Molekular-gewichtsstandard diente der RainbowTM-Marker (Amersham).

3.2.2 Western Blot Analyse

Der Transfer der auf dem SDS- Polyacrylamid Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran (HybondTM-ECLTM, Amersham) erfolgte in Transferpuffer mit einer Trans-Blot Apparatur (BioRad) nach dem Semi-Dry-Verfahren. Das Gel wurde entweder 2 h bei 400 mA / 60-70 V, oder ü.N. bei 100 mA / 60-70 V geblottet. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 30 min bei RT in Blocklösung geschwenkt. Anschließend wurde der Erstantikörper in Blocklösung verdünnt zugegeben (SP7 für NS1, 1:2000; SP4 für NS2, 1:1000; VP 1:2000) und ü.N. bei 4°C inkubieren lassen. Die Membran wurde 2 mal 30 min mit PBS/ 0,5 % Tween 20 gewaschen und der Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper (goat-anti-rabbitperoxidase) in Blocklösung 1:10000 verdünnt zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Die Membran wurde wieder gut gewaschen und eine ECL (enhanced*chemiluminescence*) Reaktion (ECL-Kit, Amersham) durchgeführt. Durch unterschiedlich lange Expositionszeiten der Membran auf einem Röntgenfilm (X-Omat AR, BioMax MS, Kodak) konnten die Proteinbanden mit verschiedener Intensität sichtbar gemacht werden.

3.2.3 Coomassie Färbung

Die direkte Detektion aller im SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennten Proteine erfolgte mit der Coomassie-Färbung. Der Farbstoff Roti®-Blue (Roth) bindet dabei sehr spezifisch an Proteine und kaum an die Polyacrylamid-Gelmatrix. Das Gel wurde 2-15 h bei RT in Färbelösung (20 % Roti®-Blue, 20 % Methanol in H₂O) geschwenkt und kurz in 25 % methanolhaltigem Wasser gewaschen. Das Gel wurde anschließend auf einem Geltrockner unter Vakuum bei 80°C getrocknet.

3.2.4 Protein-Bestimmung (IL-2 und MDC) mittels ELISA

Die Bestimmung der quantitativen Transgenproduktion (IL-2 und MDC) rekombinanter Viren erfolgte mit spezifischen Sandwich ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay), **IL-2** mit dem kommerziell erwerblichen Kit human IL-2 Set OptEIATM (Pharmingen) unter Angaben des Herstellers, und **MDC** mit einem im Labor von Prof. Dr. Mantovani (*Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milan, Italien*) eigens entwickelten MDC-ELISA. Die Proteine wurden wie in 3.1 beschrieben gewonnen. Es wurden verschiedene Probenverdünnungen und ein Standard in Duplikaten eingesetzt. Das Hintergrundsignal wurde mit reinem Probenverdünnungspuffer (Assay Diluent) bestimmt.

Für den IL-2 ELISA erfolgte die Detektion im letzten Schritt abweichend von den Angaben des Herstellers mit ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Sigma). Die bei –20°C aufbewahrte Lösung (150 mg ABTS in 500 ml 0,1 M-Citronensäure, pH 4,35) wurde vor ihrer Anwendung 1:100 mit 3 % H₂O₂ versetzt. Die ABTS-Reaktion erfolgte unter Licht-Ausschluß und wurde in 10-minütigem Abstand bei der Wellenlänge von 405 nm gemessen, bis sich beim IL-2 Standard eine Sättigung abzeichnete. Die Auswertung der Standardkurve und Probenwerte erfolgte mit der SoftMax Pro® Software (Molecular Devices). Die erhaltenen Werte wurden schließlich auf die Produktion (in µg) je 10⁶ Zellen umgerechnet.

3.2.4 EGFP-Messung mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Bestimmung der prozentualen Expression des fluoreszierenden EGFP in Zellen erfolgte mit der Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*), die eine quantitative Analyse von Partikeln (Dichte, Fluoreszenz, Größe) im Flüssigkeitsstrom ermöglicht. Für die Analyse wurden jeweils mindestens 10^5 Zellen trypsiniert, gewaschen (PBS), pelletiert (1200 rpm, 5 min) und je nach Zellanzahl in 0,5 bis 1 ml FACS-Medium (2 % FCS in filtriertem PBS) aufgenommen. Die Messungen wurden mit dem Durchflusszytometer FACSort (Becton Dickinson) durchgeführt. Als Kontrolle dienten jeweils nicht infizierte Zellen. Zur Analyse wurde das *Cell QuestTM* Programm verwendet.

4 Immunologische Methoden

4.1 Nachweis exprimierter Oberflächenantigene mittels FACS-Analyse

Zum Nachweis der MHC–Klasse I Expression auf Zellen wurde ebenfalls die FACS-Analyse (siehe auch 3.2.4) angewandt. $5x10^5$ Zellen wurden mit 50µl anti-MHC–Klasse I Antikörper (anti-H2-L^d oder anti-H2-K^d für die Zellen RENCA und P815, jeweils 1:2 verdünnt eingesetzt, erhalten von W. Osen, DKFZ) 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 5 min, 4°C) der Zellen wurden diese mit 4 ml PBS gewaschen und mit 50 µl eines zweiten Antikörpers (*goat-anti-mouse-*FITC, 1:100, Dianova) unter den gleichen Bedingungen wie zuvor inkubiert. Der FITC-konjugierte Zweitantikörper dient zur Markierung der ersten Antikörper. Die Zellen wurden nach der Inkubation erneut gewaschen und in 500µl FACS-Medium (2 % FCS in filtriertem PBS) aufgenommen. Die Fluoreszenz des FITC kann nun in einer FACS-Analyse detektiert werden. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit dem zweiten Antikörper (*goat-anti-mouse-*FITC) inkubiert wurden und somit die Hintergrundfluoreszenz anzeigen.

4.2 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von T-Lymphozyten

Zum Nachweis der zytotoxischen Aktivität von T-Lymphozyten wurde der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest verwendet. Bei diesem Test werden Milzzellen, unter denen viele T-Lymphozyten sind, von immunisierten Mäusen *in vitro* mit Antigen stimuliert, so dass Antigen-spezifische T-Lymphozyten aktiviert werden und proliferieren. Antigen-beladene Zielzellen (*Targets*) werden mit radioaktivem ⁵¹Chrom inkubiert, das von den Zellen aufgenommen wird. Die aktivierten T-Lymphozyten werden schließlich mit den radioaktiv beladenen *Targets* inkubiert. Die Antigenspezifischen T-Zellen lysieren dabei die Targetzellen spezifisch. Durch die Zell-Lyse wird radioaktives ⁵¹Chrom freigesetzt, das gemessen werden kann und die Aktivität Antigen-spezifischer, zytotoxischer T-Zellen bestimmt. Der Test muss stets gut kontrolliert werden.

4.2.1 Immunisierung von Mäusen

C57Bl/6 Mäuse wurden mit 10^8 pfu MVMp s.c. immunisiert. Als Kontrolle wurden parallel C57Bl/6 Mäuse der gleichen Herkunft und Alters mit $2x10^7$ pfu

Vacciniaviren i.p. immunisiert (Sigal *et al.*, 1998). Nach 10 Tagen wurden jeweils die Milzzellen für den ⁵¹Chrom-Freisetzungstest isoliert (siehe 4.2.2).

4.2.2 Anlegen von Milzzellkulturen

Zur Isolierung der Milzzellen immunisierter Mäuse wurde selbigen die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen und in eine sterile 6 cm Schale mit 5 ml 37°C warmem α -MEM-Komplettmedium/plus überführt. Das Milzgewebe wurde mit dem Kolben einer sterilen 10 ml-Spritze vorsichtig zerkleinert und die Zellen möglichst vereinzelt, ohne sie dabei zu zerstören. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, gut durchmischt und 2 min sedimentieren lassen. 90 % des Überstandes wurden vorsichtig in ein neues Röhrchen transferiert. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (900 rpm, 8 min, RT) zur Beseitigung roter Blutzellen in 3 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und 5 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit Medium wurden sie in 5 ml α -MEM-Komplettmedium/plus aufgenommen. 10 μ l der Zellsuspension wurden mit 45 μ l Trypanblau und 45 μ l 0,2 % Essigsäure in PBS versetzt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Essigsäure bewirkt dabei die Lyse eventuell verbliebener Erythrozyten.

4.2.3 In vitro Stimulierung von Milzzellkulturen mit Antigen

Zur Stimulierung der Milzzellen *in vitro* wurden $2x10^7$ Milzzellen (Effektorzellen) je 9 ml α -MEM-Komplettmedium/plus in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Später wurden die Stimulatorzellen (siehe unten) in 1 ml Medium zugegeben und die Effektor-Stimulator-Zell-suspension 6 Tage bei 37°C und 7,5 % CO₂ in vertikal stehenden Zellkulturflaschen inkubiert.

Vorbereitung der Antigen-präsentierenden Stimulatorzellen:

Diesem Schritt kommt große Bedeutung zu, da für eine Aktivierung von T-Zellen eine gute Antigenpräsentation während der Inkubation essentiell ist. Grundsätzlich wird zwischen einer allogenen und einer syngenen Stimulierung unterschieden. Die allogene Stimulierung, zum Beispiel von zwei MHC Haplotypen (H-2^d und H-2^b) zweier verschiedener Mausstämme (Balb/c und C57Bl/6), dient als positive Kontrolle, mit der maximale zytotoxische T-Zelleffekte erwartet werden können. Eine allogene Stimulierung könnte auch mit allogenen MHC-tragenden Tumorzellen erfolgen.

Für die <u>allogene Stimulierung</u> wurden stets Milzzellen einer nicht immunisierten Maus mit unterschiedlichem Haplotyp verwendet, in der Regel Balb/c gegen C57Bl/6 Maus und umgekehrt. Die Milzzellen wurden analog wie oben beschrieben aufbereitet und gezählt. 1x10⁷ Zellen wurden mit γ -Strahlen (3300 rad) behandelt und in 1 ml frischem α -MEM-Komplettmedium/plus aufgenommen. Durch die Bestrahlung bleiben die Zellen zur Antigenpräsentation befähigt, können sich jedoch nicht mehr weiter vermehren.

Für die <u>Stimulierung gegen bestimmte Antigene</u>, zum Beispiel virale Antigene oder TAAs, muss ein syngenes Modell verwendet werden. Oft werden als Stimulatoren Zell-linien verwendet, die stabil mit dem Antigen transfiziert sind.

Für die Präsentation viraler Antigene stand dies nicht zur Verfügung, daher wurden geeignete Stimulatorzellen kurz vor ihrer Verwendung mit Virus infiziert oder mit

DNA transfiziert. Die Stimulatorzellen müssen MHC–Klasse I positiv sein und sich zur Antigenpräsentation eignen. Es wurden dafür MC57G Zellen (H2^b) eingesetzt, die von der *American Type Culture Collection* (ATCC) Tumorzellbank bezogen wurden. Laut ATCC ist die Verwendug dieser Zellen in zytotoxischen T-Zelltests sehr weit verbreitet und gut studiert. Mit diesen Zellen konnte auch eine Vacciniavirusspezifische T-Zellantwort nachgewiesen werden (Sigal *et al.*, 1998).

Um eine gute Präsentation viraler Antigene in MC57G Zellen zu gewährleisten, wurden verschiedene Wege der Antigenbeladung gewählt:

- 1) Transfektion von MC57G Zellen mit rekombinantem MVMp/EGFP Plasmid
- 2) Transfektion von MC57G Zellen mit NS1-exprimierendem Plasmid
- 3) Infektion von MC57G Zellen mit MVMp Wildtyp Viren (*moi 10 pfu/Zelle*)
- 4) Infektion von MC57G Zellen mit rekombinanten NS-exprimierenden Vacciniaviren (*moi 2 pfu/Zelle*)
- 5) Infektion von MC57G Zellen mit rekombinanten VP-exprimierenden Vacciniaviren (*moi 2 pfu/Zelle*)
- 6) <u>Kontrolle</u>: Infektion von MC57G Zellen mit Vaccinia Wildtypviren (*moi 2 pfu/Zelle*)

Die Trypsin-empfindlichen MC57G Zellen wurden mit 1,5 mM EDTA/PBS (pH 7) trypsiniert und jeweils 1x10⁶ Zellen in 10 ml MEM-Komplettmedium/plus pro 10 cm Schale ausgesät. Die Transfektion mit DNA erfolgte etwa 36 h später, die Infektion mit Viren mit angegebener moi etwa 40 h später.

Zu 1) und 2). Die Transfektion des NS1/NS2-exprimierenden MVMp/EGFP Plasmids und des NS1-exprimierenden pP4-NS1-P4-GFP Plasmids (Corbau *et al.*, 2000) erfolgte mit Lipofektamin 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. 20 µg Plasmid und 60 µl Lipofektamin 2000 wurden in 4 ml Opti-MEM I (Invitrogen) für 20 min bei RT präinkubiert, ehe die Mischung auf die Zellen gegeben wurde. Die Inkubation mit den Zellen erfolgte 5 h bei 37°C. Anschließend wurde der Überstand durch 10 ml MEM-Komplettmedium/plus ersetzt. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion geerntet. Anhand der EGFP- bzw. GFP-Expression konnte die Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop abgeschätzt werden.

Zu 4). Hierbei wurden die Zellen sowohl mit rekombinanten VV-NS1, als auch VV-NS2 Vacciniaviren, jeweils mit einer moi von 1 pfu/Zelle, infiziert. Die Zellen wurden ebenfalls mit VV-T7 Virus (moi 5 pfu/Zelle) überinfiziert (siehe 6.8).

Zu 5). Analog zu 4) wurden die Zellen hier sowohl mit rekombinanten VV-VP1, als auch VV-VP2 Vacciniaviren, jeweils mit einer moi von 1 pfu/Zelle, infiziert. Die Zellen wurden ebenfalls mit VV-T7 Virus (moi 5 pfu/Zelle) überinfiziert.

Die behandelten Stimulatorzellen wurden 24 h nach Transfektion, bzw. 20 h nach Infektion vorsichtig mit 1,5 mM EDTA/PBS trypsiniert und gezählt. $4x10^5$ Zellen wurden jeweils mit γ -Strahlen (4000 rad für MC57G Zellen) behandelt, in 1 ml frischem α -MEM-Komplettmedium/plus aufgenommen und den ausgesäten Effektor-zellen zugegeben.

Stimulierungsvarianten:

Zur spezifischen *in vitro* Stimulierung von anti-MVMp Effektorzellen wurden jeweils Milzzellen MVMp-immunisierter Mäuse mit den bestrahlten, auf verschiedene Weise mit Virusantigenen beladenen MC57G Zellen (1-5) inkubiert. Zur spezifischen *in vitro* Stimulierung von anti-Vacciniavirus Effektorzellen als Kontrolle wurden die Milzzellen Vacciniavirus-immunisierter Mäuse mit bestrahlten, Vacciniavirusinfizierten MC57G Zellen (6) inkubiert. Als positive Kontrolle wurden beide Effektorzellarten (von MVMp- und Vacciniavirus-immunisierten Mäusen) jeweils allogen mit bestrahlten Milzzellen einer nicht infizierten Balb/c Maus stimuliert. Als negative Kontrolle wurden beide Effektorzellarten jeweils mit bestrahlten Milzzellen einer syngenen, nicht infizierten C57BI/6 Maus stimuliert.

4.2.4 Präparierung der Effektorzellen

Die für 6 Tage stimulierten Effektorzellen wurden zentrifugiert (900 rpm, 8 min, RT), in 5 ml RPMI-Komplettmedium/plus aufgenommen und gezählt. Für ein Effektor:Zielzellverhältnis von 200:1 wurde die Zellsuspension der Konzentration 1×10^7 Zellen/ml angeglichen. In jedes Loch der 3. Reihe einer U-förmigen 96-Loch-Gewebekulturplatte (Greiner) wurden 200 µl Effektorzellen pipettiert. Eine 1:2 Verdünnungsreihe der Effektorzellen erfolgte von Reihe 3 bis 8. Der Hintergrund (spontane ⁵¹Cr-Freisetzung der Zielzellen) wurde durch Effektorzellfreies Medium (100 µl) in der 2. Reihe bestimmt. Für die maximale Lyse der Zielzellen wurden 100 µl 2 % Triton-X in H₂O in die 1. Reihe gegeben.

4.2.5 Präparierung der Zielzellen

Bei den Zielzellen muss erneut eine gute Antigenpräsentation gewährleistet sein. Als Zellen dienten daher wiederum die oft als *Targets* verwendeten MC57G Zellen. Die Antigenbeladung der MC57G Zellen fand in Anlehnung an Jooss *et al.* (1998) statt.

40 h vor der Infektion wurden je 1x10⁶ Zielzellen pro 10 cm Schale ausgesät. Die Infektion erfolgte mit VV-NS1, VV-NS2, VV-VP1/VV-VP2 in Kombination, MVMp oder Vaccinia Wildtypviren. In jedem Fall wurde eine moi von 5 pfu/Zelle verwendet, außer bei MVMp (moi 10 pfu/Zelle). Bei den rekombinanten Viren wurde mit VV-T7 Virus (moi 5 pfu/Zelle) überinfiziert. Nach 6 Stunden Infektion wurde mit dem Trypsinieren (1,5 mM-EDTA/PBS) der Zellen begonnen.

Als weitere Zielzellen dienten nicht infizierte P815 Zellen für allo-Balb/c stimulierte C57Bl/6-Effektorzellen, nicht infizierte RMA oder MC57G Zellen für allo-C57Bl/6 stimulierte Balb/c-Effektorzellen, und nicht infizierte MC57G Zellen als Kontrolle für die spezifische Lyse Antigentragender Zellen. Sie wurden parallel zu den anderen infizierten Zellen trypsiniert und gezählt.

Jeweils 10⁶ Zellen wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert (900 rpm, 8 min, RT) und in 200 µl RPMI-Komplettmedium/plus aufgenommen. Anschließend wurden jeder *Target*-Zellsuspension 50 µCi ⁵¹Cr zugegeben, vorsichtig geschüttelt und für maximal 60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 3 mal mit 8 ml RPMI-Komplettmedium/plus gewaschen und auf $5x10^4$ Zellen/ml angeglichen. Von dieser Zielzellsuspension wurden in jedes Loch der mit Effektorzellen vorbereiteten Gewebekulturplatte (4.2.4) 100 µl pipettiert und 6 h bei 37°C und 7,5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Platte kurz zentrifugiert (1000 rpm, 1 min) und von allen Löchern 50 µl Überstand auf eine Luma Platte (LumaPlateTM-96, Canberra

Packard) transferiert und getrocknet. Die Messung des Isotopes ⁵¹Cr erfolgte in einem Szintillations und Lumineszenz *Counter* (Microbeta Trilux 1450, PerkinElmer Wallac). Die spezifische Lyse errechnete sich wie folgt:

spezifische Lyse = maximale Lyse – spontane ⁵¹Cr-Freisetzung * 100 % * 100 %

4.3 Antikörpernachweis in Maus-Sera

4.3.1 Gewinnung von Blut-Serum

Bei lebendigen Mäusen wurde Blut durch retrobulbäre Blutentnahme mit einer Pasteurpipette aus dem Auge gewonnen. Diese Art der Blutentnahme, die unter Leitung eines Tierpflegers stattfand, konnte maximal 3 mal durchgeführt werden. Bei toten Mäusen wurde Blut durch Herzpunktion gewonnen. Das Blut wurde in einem kleinen Eppendorfgefäß 2 Stunden bei RT gerinnen lassen. Damit das geronnene Blut absedimentieren konnte, wurde das Blut ü.N. bei 4°C inkubiert. Am Tag darauf wurde das Sediment abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 4°C) und das gewonnene Serum bei 4°C zur sofortigen Verwendung, oder bei –20°C zur späteren Verwendung gelagert.

4.3.2 Bestimmung unspezifischer Serum-Immunglobuline

Zur Bestimmung unspezifischer Serum-Immunglobuline der Isotypen IgM, IgG, IgG1, IgG2a und IgG3 wurde die Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) Methode angewandt. Es wurde dabei jeweils die Serum-Immunglobulin-Konzentration in Mäusen vor und nach viraler Infektion, als auch von infizierten und nicht infizierten Mäusen miteinander verglichen. In der Regel wurden Mäuse dazu mit 10⁸ pfu MVMp Virus infiziert.

96-Loch MaxiSorpTM Platten (Nunc) wurden mit dem nachzuweisenden Antigen (gereinigte anti-Ig Antikörper) in *Coating* Puffer (50 µl) ü.N. bei 4°C beschichtet. Der Coating Puffer wurde durch 3-maliges Waschen mit ELISA-Waschlösung (0,05 % Tween 20 in PBS) entfernt. Durch Inkubation (1 h bei RT oder länger bis zu einer Woche bei 4°C) von jeweils 400 µl Probenverdünnungslösung (*Assay Diluent*) pro Loch wurden unspezifische Bindungen blockiert.

Die Blocklösung wurde durch 3-maliges Waschen entfernt und die Probenlösungen bzw. der Standard in 50 µl Probenverdünnungslösung aufgetragen. Die Probenvorbereitung erfolgte dazu in einer 96-Loch-V-Platte, damit alle Proben mit einer 12-Kanalpipette zügig auf die MaxiSorpTM Platten gegeben werden konnten. Proben und Standard wurden stets in Duplikaten bestimmt. Für den Standard wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe angefertigt, wobei die Startkonzentration in der Regel 2 µg/ml betrug. Die Probenlösungen stellten eine Startverdünnung des Serums von 1:100 und eine anschließende 1:2 oder 1:4 Verdünnungsreihe dar. Zur Bestimmung des Hintergrunds dienten zwei Blindproben (*blanks*) mit reiner Probenverdünnungslösung. Wenn möglich wurden die Randlöcher der Platte nicht zur Analyse benutzt. Die Proben- und Standardlösungen wurden 2 h bei 37°C inkubiert.

Als nächstes wurde die Platte gründlich gewaschen (5 mal unter Verwendung eines Schüttlers), 50 µl der Detektionsantikörper (in Probenverdünnungslösung verdünnt)

zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubieren lassen. Nach erneutem gründlichen Waschen erfolgte die Detektion mit ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Die bei –20°C aufbewahrte ABTS-Lösung (150 mg ABTS in 500 ml 0,1 M-Citronensäure, pH 4,35) wurde vor ihrer Anwendung 1:100 mit 3 % H₂O₂ versetzt. Die ABTS-Reaktion erfolgte unter Licht-Ausschluß und wurde in 10-minütigem Abstand bei der Wellenlänge von 405 nm gemessen, bis sich beim Standard eine Sättigung abzeichnete. Die Auswertung der Standardkurve und der Probenwerte erfolgte mit der SoftMax Pro® *Software* (Molecular Devices). In Tab. 14 sind die zur Bestimmung der einzelnen murinen Serum-Immunglobulin-Isotypen verwendeten Antikörper unter Angabe ihrer Herkunft, Modifikation und eingesetzter Konzentration aufgelistet.

lg- Isotyp	Funktion	Ak α-Maus	Herkunft	Modifikation	Konz.	Firma
lgM	Besch.	IgM	Ziege	gereinigt	1 mg/ml	KPL
	Det.	IgM	Ratte	Biotin	1:1000	Pharmingen
	STD	lgM	Maus	gereinigt	2 µg/ml	Serotec
lgG	Besch.	lgG	Ziege	gereinigt	1 mg/ml	KPL
	Det.	lgG	Ziege	HRP	1:700	Biosource
	STD	lgG	Maus	gereinigt	2 µg/ml	Serotec
lgG1	Besch.	lgG1	Ratte	gereinigt	0,5 mg/ml	Pharmingen
	Det.	lgG1	Ratte	HRP	1:1000	Pharmingen
	STD	lgG1	Maus	gereinigt	8 µg/ml	Serotec
lgG2a	Besch.	lgG	Ziege	gereinigt	1 mg/ml	KPL
	Det.	lgG2c*	Ziege	HRP	1:4000	South Biot.
_	STD	lgG2a	Maus	gereinigt	10 µg/ml	Serotec
lgG3	Besch.	lgG3	Ratte	gereinigt	0,5 mg/ml	Pharmingen
	Det.	lgG3	Ziege	HRP	1:1000	South Biot.
	STD	lgG3	Maus	gereinigt	2 µg/ml	Serotec

Tab. 14: Auflistung der für Serum-Immunglobulin-ELISAs verwendeten Antikörper

* Da C57Bl/6 Mäuse anstelle des IgG2a ein anderes Gen, den neuen Isotyp IgG2c, besitzen, konnte aufgrund einer geringen Kreuzreaktivität innerhalb der Ig-Isotypen kein herkömmlicher IgG2a Detektionsantikörper verwendet werden (Martin *et al.*, 1998). Anstelle dessen wurden spezifische anti-Maus IgG2c Antikörper (Southern Biotech, South Biot.) verwendet.

Konz.: Konzentration; Besch.: Beschichtung; Det: Detektion; STD: Standard

4.3.3 Nachweis antiviraler Antikörper verschiedener Isotypen

Der Nachweis antiviraler Antikörper in MVMp-immunisierten Mäuseseren gegen MVMp Kapside und das NS1 Protein erfolgte mit der spezifischen Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) Methode. 96-Loch MaxiSorpTM Platten (Nunc) wurden entweder mit leeren MVMp Kapsiden oder mit aufgereinigtem, nativem NS1 Protein (siehe unten) beschichtet. Dafür wurde die Konzentration (mg/ml) der MVMp-Kapside und des NS1 Proteins spektrophometrisch durch Messung der

Absorption bei 280 nm und Multiplikation dieses Wertes mit dem Faktor 0,83 bestimmt. Die Beschichtung eines jeden Loches erfolgte mit 1 μ g Protein.

Der methodische Ablauf erfolgte wie in 4.3.2 beschrieben. Für die Bestimmung antiviraler IgG-Antikörper wurde mit einer Serumverdünnung von 1:400, für alle anderen Ig-Isotypen dagegen mit einer Serumverdünnung von 1:100 begonnen, an die sich jeweils eine 1:3 Verdünnungsreihe anschloß. Die Verdünnung des arbiträren Standards (siehe unten) erfolgte gleichermaßen. Für die Detektion wurden die Detektionsantikörper verwendet, die in Tab. 14 beschrieben sind. Als Kontrollen diente Serum von nicht infizierten Mäusen.

Definierung eines arbiträren Standards:

Eine Serumprobe (eigene Bezeichnung: #35-TV12) mit durchschnittlicher antiviraler Antikörperkonzentration wurde als repräsentativer Standard festgelegt. Für jeden Ig-Isotyp wurde eine Standardkurve mit dieser Serumprobe erstellt, die 2 maximale und 2 minimale Werte enthält. Als positive Antikörperreaktion wurde ein Signal, das oberhalb des Mittelwerts (MW) der Blindproben (*blanks*) plus 3x die Blindproben-Standardabweichung (STABW) lag, gewertet. Aus genau diesem Wert (MW + 3x STABW) wurde die Serumkonzentration anhand der diesem Punkt entsprechenden Serumverdünnung arbiträr definiert. Ein Beispiel ist in Abb. 58 angeführt.



Abb. 58: Beispiel für die Definierung eines arbiträren Standards

Gewinnung leerer MVMp Kapside für den ELISA:

Die verwendeten leeren MVMp Kapside wurden als Nebenprodukt während einer rekombinanten Virusproduktion gewonnen. Die Virussuspension wurde dabei über einen CsCl-Gradienten aufgereinigt und einzelne Fraktionen des Gradienten mit einem Hämagglutinationstest (6.5) analysiert. Die Fraktionen, die anhand der Dichte und der Hämagglutinationsreaktion fast ausschließlich leere Kapside enthalten können wurden vereinigt und die Proteinkonzentration wie zuvor beschrieben bestimmt.

Gewinnung nativer NS1 Proteine für den ELISA:

Das Material für die Gewinnung nativer NS1 Proteine wurde von Dr. J. Nüesch erhalten. Die Produktion und Aufreinigung des NS1 ist in Nüesch *et al.* (1995) genau

beschrieben und wurde in dieser Weise durchgeführt. Die mit Ni²⁺-NTA Agarose-Säulen aufgereinigten NS1 Proteine wurden mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE Elektrophorese (3.2.1) und anschließender Coomassie Färbung (3.2.3) analysiert.

4.3.4 Nachweis antiviraler Antikörper mittels Immunfluoreszenz

Im ELISA konnten nur anit-MVMp Kapsid- und anit-NS1 Antikörper nachgewiesen werden. Zum Nachweis von Antikörpern gegen weitere virale Proteine (NS2 und VP1) wurde die Methode der Immunfluoreszenz angewandt. Jeweils 5000 A9 Zellen wurden in 50 µl MEM-Komplettmedium auf 10-Loch-Objektträger, sogenannte *Spotslides*, ausgesät und nach 1 bis 2 Tagen, sobald die Zellen gut an der Glasoberfläche angeheftet waren, infiziert. Es wurde jeweils nur eine der zwei Zellreihen der Spotslides infiziert, die andere Reihe diente als negative Kontrolle. Die Infektion erfolgte für 6 h mit den rekombinanten Vacciniaviren VV-NS1, VV-NS2, VV-VP1 zusammen mit VV-T7 (siehe 6.8), oder aber mit leeren Kapsiden anstelle des Proteins VP2, das spontan Kapside bilden kann. Die moi betrug 10 pfu/Zelle. Anschließend wurden die Zellen nach Abnahme des Zellkulturmediums mit 50 µl 3 %-Paraformaldehyd maximal 30 min bei RT fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden gut mit PBS gewaschen und bis zur Immunfluoreszenzfärbung bei 4°C feucht gelagert. Die bisherigen Schritte wurden freundlicherweise von Dr. J. Nüesch ausgeführt.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen 1 h mit jeweils 20 μ l 20 % Ziegenserum (Dianova) in PBS bei RT inkubiert. Die Mäuseseren wurden 1:40 in 20 μ l 2 % Ziegenserum (in PBS) verdünnt und mit den Zellen nach Abnahme des Zellkulturüber-standes ebenfalls 1 h mit den Zellen bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente jeweils eine Inkubation mit anti-NS1, -NS2, -VP1 und -Kapsid-Antikörpern. Der darauf folgende Waschschritt musste sorgfältig durchgeführt werden, um einerseits eine niedrige Hintergrundfluoreszens und andererseits ein Ablösen der Zellen zu vermeiden. Dabei wurde PBS auf die Zellen getropft und gleichzeitig seitlich wieder abgesaugt. Jedes Loch wurde somit mindestens mit 3x5 Tropfen PBS gewaschen.

Der FITC-markierte Zweitantikörper (Dianova) wurde 1:100 in 20 µl 2 % Ziegenserum verdünnt und 1 h mit den Zellen und den daran gebundenen Antikörpern bei RT im Dunkeln inkubiert. Da die als Kontrolle verwendeten anti-NS1, -NS2 und -VP1 Antikörper aus dem Kaninchen stammen, musste dafür ein anti-Kaninchen-FITC Antikörper verwendet werden, während die anderen Proben mit einem anti-Maus-FITC Antikörper inkubiert wurden. Wiederum mussten die Zellen gut und vorsichtig mit PBS gewaschen werden. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden sie mit *Mounting*-Medium (Alexis) und einem Glasplättchen bedeckt und konnten nun im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Die fertig gefärbten Objektträger können bei RT im Dunkeln für längere Zeit aufbewahrt werden. Die Fluoreszenzintensität kann jedoch mit de Zeit verblassen.

4.3.5 Bestimmung der neutralisierenden Aktivität antiviraler Antikörper

Zur Bestimmung der Virus-neutralisierenden Aktivität von antiviralen Antikörpern wurde der Einfluß einer Inkubation von Viren mit Antikörpern vor der Infektion auf die Virus-induzierte Lyse oder die virale Transgenexpression analysiert. Es wurden jeweils 3000 A9 oder 4000 NBK Zellen in 96-Lochplatten ausgesät. Je nach Versuch sollten die Zellen mit MVMp oder H1 Wildtyp Viren, oder mit rekombinanten MVMp/EGFP Viren infiziert werden. Vor der Infektion wurde eine einer moi von 10 ru/Zelle entsprechenden Virusmenge mit verschiedenen Serumverdünnungen 1 h unter stetigem Schwenken bei RT inkubiert.

Bei mit Wildtyp Virus infizierten Zellen wurde nach 3 Tagen ein Zytotoxizitätstest mit dem Reagenz Alamar Blue (Serotec) durchgeführt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte und normal infizierte Zellen ohne vorheriger Inkubation mit Serum. Die virus-neutralisierende Aktivität der Antikörper wurde wie folgt bestimmt: (Überleben infizierter Zellen mit Antikörperinkubation - Überleben virusinfizierter Zellen) / (Überleben nicht infizierter Zellen - Überleben virusinfizierter Zellen) * 100 %.

Bei mit MVMp/EGFP infizierten Zellen wurde nach 3 Tagen die EGFP Expression im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Als Kontrolle dienten wiederum nicht infizierte und normal infizierte Zellen ohne vorheriger Inkubation mit Serum.

5. Zellbiologische Methoden

5.1 Kultivierung von Zellen

Etablierte Säugetierzellen wurden als adhärente Monolayerkulturen in Schalen oder Suspensionskulturen in Flaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Je nach Wachstumsverhalten der Zellen wurden sie 2-3 mal pro Woche im Verhältnis 1:5 bis 1:20 verdünnt. Dabei wurden adhärente Zellen mit Trypsin (Invitrogen) oder mit schonenderem 1,5 mM-EDTA in PBS (Dulbecco, pH 7) von der Schalenoberfläche abgelöst und in frisches Komplettmedium ausgesät. Allen Komplettmedien wurde 5% oder 10% fötales Kälberserum (FCS, Invitrogen), sowie 2 mM-*L*-Glutamin (Invitrogen) und 100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) zugesetzt. In den Tab. 15 und 16 ist der Verwendungszweck der einzelnen Zelllinien, sowie ihr jeweiliges Komplettmedium aufgelistet.

Zelllinie	Medium/Zusätze	Verwendungszweck in dieser Arbeit
A9	MEM, 5% FCS	Standardzelle, Produktion und Titration von MVMp
RENCA	DMEM, 10% FCS	Tumormodell in Balb/c Mäusen
TS/A	DMEM, 10% FCS	Tumormodell in Balb/c Mäusen
B78/H1	DMEM, 10% FCS	Tumormodell in C57Bl/6 Mäusen
H5V	DMEM, 10% FCS	Tumormodell in C57Bl/6 Mäusen
P815	DMEM, 10% FCS	Tumormodell in DBA/2 Mäusen, Targetzelle
MC57G	MEM, 10% FCS, 1% Natriumpyruvat	Stimulator- und Targetzelle (C57Bl/6 Mäuse)
RMA	RPMI, 10% FCS	Targetzelle (C57Bl/6 Mäuse)

Tab. 15: Verwendungszweck und Komplettmedien muriner Zelllinien

Zelllinie	Medium/Zusätze	Verwendungszweck in dieser Arbeit
293T	DMEM, 10% FCS	Produktion rek. Viren mittels Co-Transfektion
NBK	MEM, 5% FCS	Standardzelle für H1, Titration von MVMp und H1
HeLa	DMEM, 10% FCS	sensitives Tumormodell für H1 Viren

humane Zelllinien:

Tab. 16: Verwendungszweck und Komplettmedien humaner Zelllinien

5.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zellen können in flüssigem Stickstoff über Jahre gelagert werden. Über kürzere Zeit (1-2 Jahre) können Zellen auch bei –80°C gelagert werden. Eine erfolgreiche Kryokonservierung ist abhängig von einer möglichst langsamen Kühlung auf die Lagertemperatur und von dem Zusatz einer der Kristallisierung vorbeugenden Schutzsubstanz, Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma). Etwa 5x10⁶ Zellen wurden zentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Um eine langsame Abkühlung zu gewährleisten, fand das Einfrieren in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter, eine sogenannte Einfrierbox, statt. Eingefrorene Zellen wurden dagegen sehr schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in vorgewärmtes Medium aufgenommen.

5.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen druch Trypanblaufärbung

Ein Aliquot der zu zählenden Zellsuspension wurde 1:2 mit einer 0,4 % Trypanblau-Lösung (Sigma) vermischt und nach kurzer Inkubation in einer Neubauer Zählkammer (Roth) unter dem Mikroskop ausgezählt. Lebende Zellen mit intakter Membran werden im Gegensatz zu absterbenden oder toten Zellen nicht blau angefärbt. Die Zellkonzentration pro ml ergibt sich aus der mittleren Anzahl der Zellen der vier Großquadrate x 10⁴, die Verdünnung mit Trypanblau muss zudem berücksichtigt werden.

5.4 Methoden zur Bestimmung zytopathischer Effekte

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um zytopathische Effekte (zum Beispiel durch Virus induziert) auf Zellkulturen zu bestimmen. Zum einen können metabolische Prozesse lebender Zellen nachgewiesen werden, zum Beispiel mit den Reagenzien Alamar-Blue und MTT. Auf der anderen Seite können einige Farbstoffe speziell nur lebende Zellen markieren, wie zum Beispiel Kristallviolett oder Neutralrot, andere dagegen nur tote Zellen, wie zum Beispiel Trypanblau. Tote Zellen können zum Beispiel auch durch ihre LDH-Freisetzung nachgewiesen werden.

Die zytotoxischen Zelltests wurden aus rationellen Gründen in 96-Lochplatten durchgeführt. In jede Vertiefung wurden dabei 3000 Zellen der Zelllinien A9, RENCA oder B78/H1 oder 4000 NBK Zellen ausgesät. Die zytotoxische Bestimmung virusinfizierter Zellen erfolgte 3 Tage nach Infektion. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen.

5.4.1 Färbung mit Alamar-Blue

Alamar-Blue ist ein wasserlösliches Reagenz, das dem dem Zellkulturmedium direkt zugegeben werden kann und von atmenden Zellen reduziert wird, wobei ein Farbumschlag von blau nach rosa entsteht. Es ist daher ein Indikator für zelluläre, metabolische Prozesse, die bei einem toxischen Zelleffekt beeinträchtigt sein können. Die Wasserlöslichkeit dieses Reagenzes stellt einen großen Vorteil gegenüber anderen zytotoxischen Zellkulturmethoden dar. Nach der Behandlung ist zum Beispiel eine weitere Beobachtung der Zellen möglich, zumal Alamar Blue selbst keine toxische Wirkung auf Zellen besitzt.

Pro Vertiefung wurden 10 μ l der Alamar-Blue Lösung (Serotec) dem Zellkulturmedium zugegeben und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Je nach Zelle konnte die Inkubationsphase auch länger dauern. Die Messung der Absorption erfolgte durch duale Wellenlängenmessung bei 540 und 620 nm.

5.4.2 Färbung mit MTT

MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, ist ebenso wie Alamar-Blue ein Indikator für zelluläre, metabolische Prozesse. Nur lebende Zellen mit normaler mitochondrialer Funktion können aus MTT ein unlösliches, blau gefärbtes Formazan Präzipitat bilden. Dieser Farbstoff ist nur in organischen Lösemitteln löslich.

Pro Vertiefung wurden 10µl einer MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS, Sigma) zugegeben und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde zentrifugiert (1000 rpm, 5 min) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Alle Zellen wurden in 100 µl Isopropanol resuspendiert und gewartet, bis der Farbstoff homogen verteilt war. Die Absorption wurde bei der Wellenlänge von 595 nm gemessen.

5.4.3 Messung der LDH Aktivität

LDH (Lactat-Dehydrogenase) wird von toten Zellen freigesetzt und kann außerhalb der Zellen im Zellkulturmedium durch eine Redoxreaktion mit Farbumschlag nachgewiesen werden. Für diesen Test wurde das Kit CytoTox96® (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.4.4 Färbung mit Neutralrot

Der schwach kationische Farbstoff Neutralrot bindet an anionische Vakuolen oder Granula in der Zelle und akkumuliert somit in den Vakuolen oder Lysosomen. Sobald die Zelle stirbt, kann der Farbstoff nicht mehr in der Zelle gehalten werden. Die Färbung mit Neutralrot-Lösung (Merck) wurde bei der Plaque-Test Methode (6.6.2) angewandt.

5.4.5 Färbung mit Kristallviolett nach McCoy

Der Farbstoff Kristallviolett färbt ebenfalls nur vitale Zellen an. Diese Methode eignet sich unter anderem zum Anfärben von Zellklonen.

Die Zellen wurden nach Abnahme des Zellkultur-Überstandes zunächst mit einer eiskalter Essigsäure-Ethanol-Mischung (Verhältnis 1:3) für 20 min bei 4°C fixiert.

Daran schloss sich eine Inkubation mit Ethanol für weitere 20 min bei RT. Die Zellkulturschalen mussten nun gründlich mit Wasser gespült werden, um die Färbung von Zellen mit dem ethanol-löslichen Kristallviolett zu ermöglichen. Nun wurde die Kristallviolett-Lösung im Überschuss zugegeben und mind. 1 h bei RT mit den Zellen inkubiert. Nach Abnahme der Kristallviolett-Lösung wurde die Schale erneut gewaschen. Vitale Zellen waren nun violett gefärbt und Zellklone konnten gezählt werden. Der Farbstoff konnte aber auch mit Methanol gelöst und die Absorption bei 595 nm gemessen werden.

5.4.6 Klonbildungstest

Je $6x10^5$ Zellen wurden in 6 cm Schalen ausgesät und mit Virus mit entsprechender moi in einem Inokulum von 400 µl MEM für 1 h infiziert. Nach 6 weiteren Stunden wurden die Zellen trypsiniert, zweimal 1:10 verdünnt (insgesamt nun 1:100 verdünnt) und davon wiederum 100, 200 oder 400 Zellen je 6 cm Schale in Triplikaten ausgesät. Die Zellklonbildung wurde im Mikroskop beobachtet. Bei geeigneter Klongröße nach 1 bis 2 Wochen wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und eine Kristallviolettfärbung nach McCoy durchgeführt (5.4.5).

5.4.7 Soft-Agar-Klonbildungstest

Der Soft-Agar-Klonbildungstest ist eine Variation des Klonbildungstests für nicht adhärente Zellen in Suspension, wie zum Beispiel P815 Zellen. Je $6x10^5$ Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 300 µl MEM in einem Röhrchen für 1 h infiziert. In dieser Zeit wurden 6 cm Schälchen mit einem zählbaren Raster an der Unterseite mit 7 ml 0,56 %-Agarmischung (45 % 1,25 %-Agar in H₂O, 55 % MEM 2x komplett) beschichtet. Die infizierten Zellen wurden auf 2000, 5000 und 10000 Zellen/ml verdünnt und jeweils 1 ml Zellsuspension mit 2 ml 0,56 %-Agarmischung vermischt. Dabei war es vorteilhafter, erst den Anteil an MEM 2x komplett mit den Zellen zu vermischen, ehe der 43°C heiße Agar vorsichtig zugegeben wurde. Jeweils 3 ml der neuen Zellmischung wurden auf den Agar-beschichteten Schalen verteilt. Die Zellklonbildung wurde im Mikroskop verfolgt und auch im Mikroskop unter Zuhilfe-nahme der Raster gezählt.

5.5 Infektion von Zellen

Die Infektion von Zellen mit Virus erfolgte stets in MEM Medium ohne weiteren Zusätze. Dabei wurde beachtet, dass das Virus ausreichend verdünnt wurde, um größere Einflüsse der Virusaufbewahrungslösungen (Iodixanol, CsCl) auf die Zellen und die Infektion zu vermeiden. Für 10 cm Schalen wurde ein Inokulum von 1 ml verwendet, für 6 cm Schalen ein Inokulum von 400 μ l. Bei davon abweichenden Schalen wurde, wenn möglich, die Menge an Inokulum anhand der standardisierten Werte der Schalengröße angepasst. Zur Infektion wurden die Schalen mit dem Virusinokulum alle 10 min geschwenkt, um alle Zellen gleich gut mit Virus zu benetzen. Nach einer Stunde wurde das Inokulum abgenommen und durch gewöhnliches Komplettmedium ersetzt. 96-Lochplatten mit 100 μ I Zellsuspensionen wurden jeweils mit 10 oder 20 μ l infiziert, ohne dabei den Zellkulturüberstand abzunehmen. Allerdings konnte in allen Fällen eine ausreichend lange Inkubationszeit des Virus gewährleistet werden, meist 2-3 Tage.

6 Virologische Methoden

6.1 Produktion von Wildtyp Viren durch Infektion

MVMp Wildtyp Viren wurden in A9 Zellen produziert. Nahezu konfluente 10 cm Schalen wurden mit einer moi von 0,001 pfu infiziert und nach 4 h auf neue Schalen 1:8 gesplittet. Die Ernte der Nachkommenviren erfolgte bei Beginn deutlich sichtbarer Zytolyse, in der Regel nach 3-5 Tagen. Die Zellen wurden mit Zellschabern gelöst und die Zell- und Mediumsuspensionen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml VTE aufgenommen. Nach dreimaligen Frier-Tau-Zyklen (-20°C / RT) wurde das Zellpellet in weitere 10 ml VTE resuspendiert. Nach erneuten dreimaligen Frier-Tau-Zyklen wurden die virushaltigen VTE-Lösungen als Rohextrakt vereinigt und bei 4°C aufbewahrt.

6.2 Produktion rekombinanter Viren durch Transfektion

Rekombinante Viren wurden in 293T Zellen durch Co-Transfektion mittels CaPO₄-Präzipitation hergestellt (Abb. 59).

30 h vor der Transfektion wurden 2x10⁶ 293T Zellen in 10 cm Schalen ausgesät. Für die Transfektion wurden pro Schale 6 µg des VP-deletierten, rekombinanten parvoviralen Plasmids und 12 μg des Kapsidprotein-exprimierenden Helferplasmids (Verpackungshelfer) in 450 µl CaCl₂-Lösung 293T Zelle (250 mM in H_2O) verteilt. Tropfenweise unter leichter Durchmischung wurde dieser Mischung das gleiche Volumen an 450 µl 2x HBSS zugegeben. Zur Bildung der CaPO₄-Präzipitate wurde der Ansatz 15 min bei RT inkubiert und dann vorsichtig in das Zellkulturmedium pipettiert. Die Schale wurde dabei schräg gehalten und die Präzipitate gleichmäßig verteilt.



Abb. 59: Produktionsschema rekombinanter Viren

Die Ernte der produzierten rekombinanten Viren erfolgte am Tag 3 bevor die Zellen abstarben. Analog zur Produktion der Wildtyp Viren wurden die Zellen mit Zellschabern gelöst und die Zell- und Mediumsuspensionen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde ebenfalls in 10 ml VTE aufgenommen. Nach dreimaligen Frier-Tau-Zyklen wurde das Zellpellet in weiteren 10 ml VTE resuspendiert. Nach erneuten dreimaligen Frier-Tau-Zyklen wurden die virushaltigen VTE-Lösungen (20 ml insgesamt) als Rohextrakt vereinigt bei 4°C aufbewahrt.

6.3 Produktion von Wildtyp Viren durch Transfektion (MVMp/Tr)

Die Produktion von Wildtyp Viren mit ähnlicher Methode, wie sie bei den rekombinanten Viren angewandt wird, erfolgte über Transfektion eines infektiösen MVMp Klons (# 372) mittels CaPO₄-Präzipitation wie zuvor beschrieben (6.2). Der Verpackungshelfer wurde allerdings nicht dabei benötigt. Um eine Zweitinfektion und dadurch über Infektion hergestellte Wildtyp Viren zu vermeiden, erfolgte die Virus Ernte bereits 30 h nach Transfektion. Im weiteren wurde wie bei einer normalen Virusproduktion (siehe 6.1 oder 6.2) vorgegangen. Die produzierten Viren wurden mit MVMp/Tr bezeichnet.

6.4 Aufreinigung und Konzentrierung von Viren nach ihrer Produktion

Die Aufreinigung der nach Ernte und Frier-Tau-Zyklen erhaltenen viralen Rohextrakte, efolgte entweder mit CsCl- oder Iodixanol-Dichtegradientzentrifugationen. Unter anderem konnten dabei auch leere Kapside abgetrennt werden.

6.4.1 CsCl-Dichtegradient

In ein Zentrifugenröhrchen (Beckmann) wurden 5 ml CsCl-Lösung der Dichte 1,4 g/cm³ zunächst mit 1 ml 1 M-Saccharose in VTE und dann mit 5 ml des Virusrohextraktes überschichtet. Für 20 ml wurden daher 4 Zentrifugenröhrchen benötigt. Die Zentrifugation erfolgte für 20 h bei 39000 rpm und 10°C. Die Gradientflüssigkeit wurde anschließend von unten her fraktioniert und die Dichte der einzelnen Fraktionen durch Refraktionsmessung von 5 µl Fraktionslösung bestimmt. Die gemessenen Werte wurden anhand der Formel $\rho = [(10,5416 \times n) - 13,059]$ kg/l in die Dichte umgerechnet. Infektiöse Viren sind im Dichtebereich 1,38 - 1,42 g/cm³ zu erwarten. Zur genauen Bestimmung der Fraktionen, die infektiöse Viren enthalten, wurde auch ein Hämagglutinationstest (6.5) durchgeführt. Alle infektiöse Viren enthaltende Fraktionen wurden schließlich vereint und gegen VTE dialysiert, da die Viren in CsCl nicht aufbewahrt werden können.

6.4.2 Iodixanol-Dichtegradient

In ein 40 ml großes Zentrifugenröhrchen (Beckmann) wurden 20 ml Virusrohextrakt schrittweise mit 7 ml einer 15 %-, 5 ml einer 25 %-, 4 ml einer 40 %- und 4 ml einer 60 %-Iodixanollösung (OptiPrep®, Sigma) unterschichtet. Als Verdünnungsmedium des Iodixanols diente speziell hergestelltes PBS, das 1 mM MgCl₂ und 2,5 mM KCl enthielt. Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Schichten wurden der 60 %- und 25 %-Phase jeweils 0,01 µg/ml Phenolrot zugesetzt. Die 15 %-Schicht enthielt außerdem 1 M-NaCl, um eine Partikelaggregation zu unterbinden. Die fertig verschweisten Gradienten wurden 4 h bei 40000 rpm und 4°C zentrifugiert. Aufgrund ihrer Dichte akkumulieren DNA-haltige Viruspartikel in der farblosen 40 %-Phase, die von außen mit einer Kanüle abgezogen wurde. Zellreste und leere Kapside sind in der leichteren 25 %-Phase zu finden. Die aufgereinigte Virussuspension musste nicht dialysiert werden und wurde bei 4°C aufbewahrt.

6.4.3 Viruskonzentrierung durch Filtration

Zur Herstellung hoch konzentrierter Viruslösungen, wurden aufgereinigte Virussuspensionen, vor allem Iodixanol-haltige, mit PBS (Dulbecco) ausreichend verdünnt und mit VIVASPIN (Vivascience) Filtereinheiten filtriert. Die Filterröhrchen wurden zur Sterilisation ü.N. in 70 % Ethanol eingelegt und vor der Zugabe der Viruslösung mit PBS gewaschen. Die Viruslösung wurde nach und nach zugegeben dazwischen und am Ende mit PBS gewaschen, bis das gewünschte Volumen erreicht war. Die immer konzentrierter werdenden Flüssigkeit wurde hin und wieder resuspendiert. Die nun in PBS vorliegenden Viren wurden möglichst bald in den Versuchen eingesetzt.

6.5 Hämagglutinationstest

Die Hämagglutination beruht auf der Eigenschaft mancher Parvoviren, an Erythrozyten bestimmter Tiere, zum Beispiel Meerschweinchen, zu binden und diese zu vernetzen. In Gefäßen mit V-förmigen Bodenvertiefungen können die Erythrozyten daher nicht sedimentieren und das Medium erscheint milchig-trüb. Für den Test wurden 1:2 Verdünnungsreihen (in 25 μ l PBS) virushaltiger Lösungen mit 2 %- Meerschweinchenerythrozyten (25 μ l, in PBS) einige Stunden bei 4°C inkubiert. Der Kehrwert der Verdünnung des ersten erkennbaren Sediments in der Vertiefung wurde als Titer gewertet.

6.6 Titration von Viren

Viren können nach verschiedenen Kriterien titriert werden. Häufig verwendet werden der Replikationstiter (6.6.1), Transgenexpressionstiter, Lysetiter (6.6.2) und Genomtiter (6.6.3). Im Gegensatz zum Viruspartikeltiter können die anderen drei als infektiöse Titer bezeichnet werden.

6.6.1 Bestimmung des Replikationstiters mittels Filter-Hybridisierungstest

Der Filter-Hybridisierungstest, mit dem der Replikationstiter (RT in ru/ml) bestimmt wird, ist die Standard-Titrationsmethode für rekombinante Viren. Für MVMp Viren wurden jeweils 2,5x10⁵ A9 Zellen/ 6 cm Schale, für H1 Viren jeweils 5x10⁵ NBK Zellen/ 6 cm Schale ausgesät. 24 h später wurden die Zellen jeweils mit verschiedenen Verdünnungsstufen (in der Regel 10⁻⁴ bis 10⁻⁶) der Viren in 400 µl MEM Medium infiziert (siehe 5.5). Nach 48 h wurden die Zellen wie folgt geerntet. Die Zellen wurden mit 4 ml PBS gewaschen und nach dem Absaugen des Mediums 30 mm runde Nitrocellulose-Filter (Schleicher& Schüll) luftblasenfrei auf den Zellrasen aufgelegt. Die Filter wurden mit 100 µl PBS befeuchtet. Die Zellen wurden immer stets feucht gehalten. Die Filter wurden vorsichtig wieder von der Schale gelöst und einem Denaturierungs- und Neutralisierungsschritt (siehe 2.5.1) unterzogen. Anschließend folgte die Hybridisierung der gebackenen Filter mit spezifischer Sonde (siehe 2.5.1). Nach Entwicklung des Filmes, der zur Bestimmung rekombinanter Viren 3 - 4 Tage bei –80°C inkubiert wurde, wurde ieder schwarze Punkt als infizierte Zelle gewertet. Der Umrechnungsfaktor, der das Inokulum und die kleinere Filtergröße im Verhältnis zur Schale berücksichtigt, betrug 7,5. Der Titer errechnete sich wie folgt: RT (ru/ml) = gezählte Punkte * 7,5 * entsprechende Verdünnung.
6.6.2 Bestimmung des Lysetiters mittels Plaque-Test

Der Plaque-Test, mit dem der Lysetiter (LT in pfu/ml) bestimmt wird, ist die Standard-Titrationsmethode für Wildtyp Viren. Hierbei werden die zytopathischen Effekte der Viren für ihre Quantifizierung genutzt. Während der längeren Inkubation der Zellen mit Virus werden infektiöse Nachkommenviren gebildet, die die benachbarten Zellen infizieren und lysieren können. Dadurch entstehen Löcher im Zellrasen, sogenannte Plaques, die bei einer Färbung der Zellen mit Neutralrot (siehe 5.4.4) nicht mitangefärbt werden. Rekombinante Viren können aufgrund ihrer Unfähigkeit, Nachkommenviren zu bilden, mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Analog zu 6.6.1 wurden jeweils $2,5x10^5$ A9 Zellen/ 6 cm Schale für MVMp Wildtyp Viren und jeweils 5x10⁵ NBK Zellen/ 6 cm Schale für H1 Viren ausgesät. 24 h später wurden die Zellen jeweils mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Viren in 400 µl MEM Medium infiziert (siehe 5.5). Nach 1 h Inkubation wurde das Virusinokulum abgenommen und die Zellen mit eine Agar-Mischung (7 ml für A9 Zellen: 3 Teile 2 %-Agar, 4 Teile MEM 2x komplett; 8 ml für NBK Zellen: 3 Teile 1,7 %-Agar, 5 Teile MEM 2x komplett) überschichtet. Das MEM 2x komplett Medium wurde dabei auf 37°C und der Agar auf 48°C erwärmt und erst vor dem Überschichten gemischt. Nach dem Erstarren des Agar-Überzugmediums wurden die Zellen 6 Tage bei 37°C inkubiert. Am sechsten Tag erfolgte die erneute Überschichtung der alten Agarschicht mit 3 ml Neutralrot-Färbemedium (22,5 ml 2xPBS, 3 ml Neutralrot-Lösung, beide auf 37°C erwärmt und 22,5 ml 2 %-Agar, auf 48°C temperiert; beide Mischungen erst kurz vor dem Überschichten mischen). Nach weiterer Inkubation bei 37°C ü.N. konnten die Schalen ausgewertet werden. Dazu wurde der Agar-Überzug vorsichtig entfert und die nicht gefärbten Plaques gezählt. Der Lysetiter errechnete sich wie folgt: LT (pfu/ml) = 2,5 * Plagues * Verdünnung

6.6.3 Bestimmung des Genomtiters mittels Dot-Blot

Der Genomtiter (GT in g/) wurde mit der Dot-Blot Methode bestimmt. Hierbei werden alle DNA-haltigen Virionen erfasst, unabhängig von ihrer Infektiösität. 10 µl Virusprobe wurden mit 190 µl DMEM und 5 u DNase I (Promega, Invitrogen) 1 h bei 37°C inkubiert. Eine Positivkontrolle, die die Funktionstüchtigkeit der DNase anzeigen soll, wurde mit 5 ng DNA angesetzt. Alle Proben wurden in Duplikaten angesetzt. Nach dieser Stunde Inkubation wurden 200 µl 2x Proteinase Puffer und 100 µg Proteinase K (Quiagen) zugegeben und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Phenol-Chloroform-Extraktion wurden 400 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben und mit der Probe gut geschüttelt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, RT) wurde die wässrige obere Phase vorsichtig abgenommen. Die niedermolekulare DNA wurde durch 0,1x Volumen 3 M-NaOAc/ 40 µg Glykogen (Roche)/ 2x Volumen Ethanol 100 % 30 min bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4°C) wurde die DNA mit 1 ml Ethanol 70 % gewaschen und erneut zentrifugiert (13000, 5 min, 4°C). Die DNA wurde in 300 µl 0,4 M-NaOH/ 10 mM EDTA aufgenommen. Davon wurden 27 µl und 2,7 µl in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt und mit 0,4 M-NaOH/ 10 mM EDTA Mischung auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt. Die drei Volumina bilden nun eine 1:10 Verdünnungsreihe der DNA (270: 10^{-2} / 27: 10^{-3} / 2,7: 10^{-4}). In die Dot-Blot Apparatur wurde eine PBSbefeuchtete Nitrocellulose Membran (HybondTM-ECLTM, Amersham) angepasst, die Apparatur geschlossen und Vakuum angelegt. Die Proben wurden 5 min auf 100°C erhitzt und jeweils in die Vertiefungen pipettiert. Eine 1:2 Standardverdünnungsreihe mit 80 ng bis 0,15 ng Plasmid-DNA wurde vorbereitet und ebenfalls auf die Nylonmembran transferiert. Der Blot wurde durch UV-cross-Linking fixiert und die Membran hybridisiert (siehe 2.5.1). Die Dot-Blot Apparatur wurde ü.N. in 1N-HNO₃ eingelegt und dann gewaschen. Die Auswertung erfolgte grob über Abschätzung der Spot-Intensitäten auf einem Röntgenfilm und genau über Messung mittels Phosphor-Imager Platte. Anhand der Standardreihe wurde die Konzentration der Proben bestimmt und in die Titereinheit Genome/ml (g/ml) umgerechnet. 1 ng des Standards (MVMp/MDC Plasmid) entsprach dabei 1,36x10⁸ Genome. Berücksichtigt werden mussten die Verdünnung der Probe (siehe oben) und dass das Plasmid aus ds DNA, das Virus dagegen aus ss DNA besteht.

6.7 Zellulärer Dot-Blot

Die Zelluläre Dot-Blot Methode stellt eine Dot-Blot Methode in größerem Maßstab dar (25 mm² Dots). Es wurden jeweils $2x10^5$ Zellen ausgesät und mit der gewünschten moi und Virus infiziert (siehe 5.5). Die Zell Absorption wurde 2 h nach Infektion, die Amplifikation 30, 48 oder 65 h nach Infektion getestet.

25 mm² Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schüll) wurden mit PBS befeuchtet, beschriftet, in die Dots der großen Dot-Blot Kammer gelegt und ein Vakuum angelegt. Die Filter wurden mit einer Metall-Umrandung befestigt, um ein Auslaufen zu verhindern. Die Zellen wurden trypsiniert, in die Metallröhrchen auf die Filter gegeben und die Schale gut gewaschen. Die Filter wurden wie in 2.5.1 beschrieben de- und renaturiert und hybridisiert. Die Auswertung erfolgte durch Flüssig-Szintillationsmessung mit 4 ml Ready SafeTM (Beckman Coulter) je Filter in einem Schraubverschlussröhrchen.

6.8 Infektion mit rekombinanten Vacciniaviren

Die rekombinanten <u>NS1</u>- (Nüesch *et al.*, 1992), <u>NS2</u>- (Nüesch *et al.*, 2003), <u>VP1</u>- (Nüesch, nicht veröffentlicht), oder <u>VP2</u>- (Nüesch, nicht veröffentlicht), exprimierenden Vacciniaviren wurden von Dr. J. Nüesch (DKFZ) zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden sie vereinfacht als **VV-NS1**, **VV-NS2**, **VV-VP1** oder **VV-VP2** bezeichnet.

Da die Transgenexpression der rekombinanten Vacciniaviren von einem T7 Promotor kontrolliert wird, ist eine Doppelinfektion mit einem T7 RNA Polymeraseexprimierenden, rekombinanten TF7-3 Vacciniavirus nötig (Fürst *et al.*, 1986). Das rekombinante TF7-3 Virus wird in dieser Arbeit vereinfacht als **VV-T7** bezeichnet.

Ein Vorteil der Vacciniaviren ist, dass sie keine Spezies- oder Gewebespezifität zeigen. Alle Säugetierzellen sind für eine Infektion dieser Viren empfänglich. Die Expressionsrate ist zudem sehr hoch.

7. Tierexperimentelle Methoden

7.1 Versuchstiere

Balb/c, C57Bl/6 und DBA/2 Mäuse wurden von der Firma Charles River bezogen. IFNAR-/- Mäuse mit C57Bl/6 Hintergrund stammten von Dr. R. Zawatzky aus eigener Zucht (DKFZ). Die 4 - 6 Wochen alten Weibchen wurden in Gruppen von maximal 5 Tieren in Isolatoren bei 21-24°C, 40- 60 % Luftfeuchtigkeit und 12 - 15 Luftwechseln pro Stunde gehalten. Die Versuchsbehandlung der Tiere erfolgte jeweils in S2 Werkbänken. Die Tötung der Tiere erfolgte durch CO₂.

7.2 Tumor- und Organentnahme

Nach der Tötung des Tieres wurde Blut durch Herzpunktion gewonnen (siehe 4.3.1). Im Anschluß daran wurden die Organe (Leber, Lunge, Thymus, Herz, Niere, Milz, Darm, Lymphknoten und Tumor in dieser Reihenfolge) mit einer Schere oder Messer abgetrennt, in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Organe erfolgte bei –80°C.

7.3 Immunisierung von Mäusen

Die Immunisierung von Mäusen erfolgte mit $10^8 \cdot 10^9$ pfu/ml MVMp oder 2×10^7 pfu/ml Vaccinia Wildtyp Viren in 100 µl frischem PBS (Dulbecco). Die Immunisierungswege umfassten die subkutane, intraperitoneale, intranasale (nur 20 µl) und intravenöse (unter Hilfe der Tierpfleger) Virusinjektion. Die Immunisierungsdauer betrug für 14 oder 15 Tage für die Analyse der humoralen, und 10 Tage für die Analyse der zellulären Immunantwort. Für RT-PCR Reaktionen erfolgte die Immunisierung 3 - 5 Tage. Die zweite Virusgabe im Readministrationsmodell erfolgte 10 Tage nach der ersten Virusgabe.

7.4 Injektion *in vitro* infizierter Tumorzellen (*ex vivo* Versuche)

Mindestens 24 h vor Versuchsbeginn wurden die zu infizierenden Tumorzellen in 10 cm Schalen ausgesät. Die in vitro Infektion dieser Zellen mit Virus (moi 10 ru/ml) erfolgte in 2 ml für 1 h, danach in 8 ml. Die Zellen wurden 4 h infiziert und dann für die Injektion in Mäuse vorbereitet. Nach Trypsinierung und mehrmaligem Waschen der Zellen mit MEM Medium ohne weiteren Zusätzen wurden die Zellen gezählt und auf die zu injizierende Menge eingestellt. Es wurden jeweils 2x10⁵ RENCA Zellen pro Balb/c Maus oder 2-10x10⁵ P815 Zellen pro DBA/2 Maus subkutan in die rechte Flanke injiziert. Die Injektion erfolgte in MEM Medium, das Volumen betrug 100 µl. Unmittelbar vor der Injektion wurden die Zellen resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension erneut gezählt und somit rückblickend überprüft. Eine gleiche Menge an Zellen wurde in vitro ausgesät und bezüglich ihrer Transgenexpression oder Kontamination Vitalität, einer beobachtet. Zur statistischen Untersuchung des Tumorwachstums wurde der Wilcoxon-Rank-Sum-Test verwendet.

7.5 Injektion etablierter Tumore (*in vivo* Versuche)

Es wurden $6x10^5$ P815 Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. An den Tagen 3, 7 und 9 erhielten die Mäuse intratumorale Injetktionen mit insgesamt $2x10^8$ pfu/ml MVMp Viren.

7.6 Bestimmung des Tumorvolumens

Zur Erfassung des Tumorvolumens wurde 2 - 3 mal wöchentlich die Länge, Breite und Höhe der Tumore mit einer elektronischen Schieblehre gemessen. Das Tumorvolumen errechnete sich demnach wie folgt:

Tumorvolumen V = $\pi/6 *$ Länge * Breite * Höhe

Die Tiere wurden bei einem Tumorvolumen von 1,5 - 2,0 cm³, nekrotischen Tumoren oder sonstigen Leiden getötet.

V Literaturverzeichnis

Abbott A. (2002). On the offensive (News Feature). Nature 416: 470-474.

Addison C.L., Bramson J.L., Hitt M.M., Muller W.J., Gauldie J., Graham F.L. (1998). Intratumoral coinjection of adenoviral vectors expressing IL-2 and IL-12 results in enhanced frequency of regression of injected and untreated distal tumors. Gene Ther 5(10): 1400-9.

Agbandje-McKenna M., Llamas-Saiz A.L., Wang F., Tattersall P., Rossmann M.G. (1998). Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. Structure 6(11): 1369-81.

Astell C.R., Chow M.B., Ward D.C. (1985). Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. J Virol 54(1): 171-7.

Astell C.R., Liu Q., Harris C.E., Brunstein J., Jindal H.K., Tam P. (1996). Minute virus of mice *cis*-acting sequences required for genome replication and the role of the trans-acting viral protein, NS-1.

Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 55: 245-85.

Ball-Goodrich L.J., Tattersall P. (1992). Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice.

J Virol 66(6): 3415-23.

Ball-Goodrich L.J., Paturzo F.X., Johnson E.A., Steger K., Jacoby R.O. (2002). Immune responses to the major capsid protein during parvovirus infection of rats. J Virol 76(19): 10044-9.

Banat G.A., Christ O., Cochlovius B., Pralle H.B., Zoller M. (2001). Tumour-induced suppression of immune response and its correction. Cancer Immunol Immunother 49(11): 573-86.

Bantel-Schaal U. (2001). Integration of adeno-associated virus 2 DNA in human MKR melanoma cells induces a peptide with oncosuppressive properties. Int J Cancer 92(4): 537-44.

Barbis D.P., Chang S.F., Parrish C.R. (1992). Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. Virology 191(1): 301-8.

Bashir T., Horlein R., Rommelaere J., Willwand K. (2000). Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model.

Proc Natl Acad Sci 97(10): 5522-7.

Becker N., Wahrendorf J. (2001). Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland (1997, jährliche Aktualisierung der Daten im Internet). *Springer Verlag*.

Berns K.I. (1996). Parvoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology* 3rd ed vol 2: 2173-2197. Lippincott-Raven-Publisher, Philadelphia, Pa.

Besselsen D.G., Wagner A.M., Loganbill J.K. (2000). Effect of mouse strain and age on detection of mouse parvovirus 1 by use of serologic testing and polymerase chain reaction analysis.

Comp Med 50(5): 498-502.

Bodey B., Bodey B. Jr., Siegel S.E., Kaiser H.E. (2000). Failure of cancer vaccines: the significant limitations of this approach to immunotherapy. *Anticancer Res* 20(4): 2665-76.

Bonecchi R., Sozzani S., Stine J.T., Luini W., D'Amico G., Allavena P., Chantry D., Mantovani A. (1998). Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood* 92(8): 2668-71.

Brandenburger A., Legendre D., Avalosse B., Rommelaere J. (1990). NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology* 174(2): 576-84.

Brockstedt D.G., Podsakoff G.M., Fong L., Kurtzman G., Mueller-Ruchholtz W., Engleman E.G. (1999). Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin Immunol* 92(1): 67-75.

Brownstein D.G., Smith A.L., Jacoby R.O., Johnson E.A., Hansen G., Tattersall P. (1991). Pathogenesis of infection with a virulent allotropic variant of minute virus of mice and regulation by host genotype. *Lab Invest* 65(3): 357-64.

Brunstein J., Astell C.R. (1997). Analysis of the internal replication sequence indicates that there are three elements required for efficient replication of minute virus of mice minigenomes. *J Virol* 71(12): 9087-95.

Casal J.I. (1999). Use of parvovirus-like particles for vaccination and induction of multiple immune responses. *Biotechnol Appl Biochem* 29 (Pt 2): 141-50.

Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.L., Bousso P., Deist F.L., Fischer A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288(5466): 669-72.

Chapman M.S., Rossmann M.G. (1995). Single-stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus. *Structure* 3(2):151-62.

Chirmule N., Xiao W., Truneh A., Schnell M.A., Hughes J.V., Zoltick P., Wilson J.M. (2000). Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J Virol* 74(5): 2420-5.

Christensen J., Cotmore S.F., Tattersall P. (1997). A novel cellular site-specific DNAbinding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J Virol* 71(2): 1405-16.

Chung Y.H., Jun H.S., Son M., Bao M., Bae H.Y., Kang Y., Yoon J.W. (2000). Cellular and molecular mechanism for Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in DR-BB rats. *J Immunol* 165(5): 2866-76.

Chyczewska E., Mroz R.M. (1997). Cytokines in lung cancer. *Rocz Akad Med Bialymst* 42 Suppl 1: 8-22.

Clément N., El Bakkouri K., Thierry V., Brandenburger A. (2002). Production of oncotropic vectors derived from the autonomous parvovirus MVM(p). *IX Parvovirus Workshop*, Bologna.

Coonrod A., Li F.Q., Horwitz M. (1997). On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther* 4: 1313-1321.

Corbau R., Duverger V., Rommelaere J., Nuesch J.P. (2000). Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects. *Virology* 278(1): 151-67.

Cornelis J.J., Becquart P., Duponchel N., Salome N., Avalosse B.L., Namba M., Rommelaere J. (1988). Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J Virol* 62(5): 1679-86.

Costa-Pereira A.P., Williams T.M., Strobl B., Watling D., Briscoe J., Kerr I.M. (2002). The antiviral response to gamma interferon. *J Virol* 76(18): 9060-8.

Cotmore S.F., Tattersall P. (1986). The NS-1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. *Virus Res* 4(3): 243-50.

Cotmore S.F., Tattersall P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 33: 91-174.

Cotmore S.F., Tattersall P. (1989). A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J Virol* 63(9): 3902-11.

Cotmore S.F., Tattersall P. (1990). Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* 177(2): 477-87.

Cotmore S.F., Tattersall P. (1994). An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO J* 13(17): 4145-52.

Cotmore S.F., Tattersall P. (1995). DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Semin Virol* 6(5): 271-281.

Cotmore S.F., D'Abramo A.M. Jr, Carbonell L.F., Bratton J., Tattersall P. (1997). The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology* 12;231(2): 267-80.

Cotmore S.F., D'abramo A.M. Jr, Ticknor C.M., Tattersall P. (1999). Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology* 254(1): 169-81.

Coutelier J.P., van der Logt J.T., Heessen F.W., Warnier G., Van Snick J. (1987). IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J Exp Med* 165(1): 64-9.

Coutelier J.P., van der Logt J.T., Heessen F.W., Vink A., van Snick J. (1988). Virally induced modulation of murine IgG antibody subclasses. *J Exp Med* 168(6): 2373-8.

Daeffler L., Giese N., Peters J., Hörlein R., Rommelaere J. (2002). Involvement of the non-structural proteins in the cytotoxic activity of MVMp. *IX Parvovirus Workshop*, Bologna.

Deleu L., Pujol A., Faisst S., Rommelaere J. (1999). Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* 73(5): 3877-85.

Dinsart C., Cornelis J.J., Rommelaere J. (1996). Recombinant autonomous parvoviruses: new tools for the gene therapy of cancer? *chemistry today*. sept.

Doerig C., Hirt B., Beard P., Antonietti J.P. (1988). Minute virus of mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter. *J Gen Virol* 69 (Pt 10): 2563-73.

Dredge K., Marriott J.B., Todryk S.M., Dalgleish A.G. (2002). Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 51(10): 521-31.

Druet P., Sheela R., Pelletier L. (1996). Th1 and Th2 cells in autoimmunity. *Chem Immunol* 63: 138-70.

Dupont F., Avalosse B., Karim A., Mine N., Bosseler M., Maron A., Van den Broeke A.V., Ghanem G.E., Burny A., Zeicher M. (2000). Tumor-selective gene transduction and cell killing with an oncotropic autonomous parvovirus-based vector. Gene Ther 7(9): 790-6.

Dupressoir T., Vanacker J.M., Cornelis J.J., Duponchel N., Rommelaere J. (1989). Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. Cancer Res 49(12): 3203-8.

Egeblad M., Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer 2(3): 161-174.

Eichwald V., Daeffler L., Klein M., Rommelaere J., Salome N. (2002). The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. J Virol 76(20): 10307-19.

Emtage P.C., Wan Y., Hitt M., Graham F.L., Muller W.J., Zlotnik A., Gauldie J. (1999). Adenoviral vectors expressing lymphotactin and interleukin 2 or lymphotactin and interleukin 12 synergize to facilitate tumor regression in murine breast cancer models. Hum Gene Ther 10(5): 697-709.

Espinoza-Delgado I. (2002). Cancer vaccines. Oncologist 7(Suppl 2): 20-33.

Fürst T.R., Niles E.G., Studier F.W., Moss B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase.

Proc Natl Acad Sci 83(21): 8122-6.

Gaertner D.J., Jacoby R.O., Johnson E.A., Paturzo F.X., Smith A.L. (1995). Persistent rat virus infection in juvenile athymic rats and its modulation by immune serum. Lab Anim Sci 45(3): 249-53.

Gaffen S.L., Goldsmith M.A., Greene W.C. (1998). Interleukin-2 and the Interleukin-2 Receptor. Academic Press. The Cytokine Handbook, 3rd ed.

Germann T., Bongartz M., Dlugonska H., Hess H., Schmitt E., Kolbe L., Kolsch E., Podlaski F.J., Gately M.K., Rude E. (1995). Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. Eur J Immunol 25(3): 823-9.

Giese N.A., Raykov Z., DeMartino L., Vecchi A., Sozzani S., Dinsart C., Cornelis J.J., Rommelaere J. (2002). Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMp vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther* 9(5): 432-42.

Gissmann L. (2001). Possibilities of vaccination against HPV infections in cervix carcinoma. Zentralbl Gynakol 123(5): 299-301.

Graham M.B., Dalton D.K., Giltinan D., Braciale V.L., Stewart T.A., Braciale T.J. (1993). Response to influenza infection in mice with a targeted disruption in the interferon gamma gene.

J Exp Med 178(5): 1725-32.

Gregorian S.K., Battisto J.R. (1990). Immunosuppression in murine renal cell carcinoma. I. Characterization of extent, severity and sources. II. Identification of responsible lymphoid cell phenotypes and examination of elimination of suppression. *Cancer Immunol Immunother* 31(6): 325-341.

Guo J., Wang B., Zhang M., Chen T., Yu Y., Regulier E., Homann H.E., Qin Z., Ju D.W., Cao X. (2002). Macrophage-derived chemokine gene transfer results in tumor regression in murine lung carcinoma model through efficient induction of antitumor immunity. *Gene Ther*;9(12): 793-803.

Haag A., Menten P., Van Damme J., Dinsart C., Rommelaere J., Cornelis J.J. (2000). Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther* 11(4): 597-609.

Halbert C.L., Standaert T.A., Wilson C.B., Miller A.D. (1998). Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol* 72(12): 9795-805.

Halbert C.L., Rutledge E.A., Allen J.M., Russell D.W., Miller A.D. (2000). Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol* 74(3): 1524-32.

Hallek M., Buening H., Ried M., Hacker U., Kurzeder Ch., Wendtner C.M. (2001). Grundlagen der Gentherapie. *Internist* 42: 1306-1313.

Hanson N.D., Rhode S.L. (1991). Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *J Virol* 65(8):4325-33.

Hardt N., Dinsart C., Spadari S., Pedrali-Noy G., Rommelaere J. (1983). Interrelation between viral and cellular DNA synthesis in mouse cells infected with the parvovirus minute virus of mice. *J Gen Virol* 64 (Pt 9): 1991-8.

Hawkins L., Lemoine N., Kirn D. (2002). Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* 3: 17-26.

Heinzer H., Huland E., Aalamian M., Huland H. (1999). Behandlung des pulmonal metastasierten Nierenzellkarzinoms mit inhalativem Interleukin-2. *Urologe(A)* 38: 466-473.

Heiss M.M., Lamerz R., Lersch C., Schlimok G., Weber B. (2001). Tumorimmunologie und Tumorendokrinologie. *Manual Gastrointestinale Tumoren*: 58-63. Tumorzentrum München.

Huang A.Y., Golumbek P., Ahmadzadeh M., Jaffee E., Pardoll D., Levitsky H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264(5161): 961-5.

Ingram D.G., Cho HJ. (1984). Aleutian disease in mink: virology, immunology and pathogenesis. *J Rheumatol* 11(5): 576-7.

Jacoby R.O., Johnson E.A., Paturzo F.X., Ball-Goodrich L. (2000). Persistent rat virus infection in smooth muscle of euthymic and athymic rats. *J Virol* 74(24): 11841-8.

Jankovic D., Liu Z., Gause W.C. (2001). Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 22(8): 450-7.

Jooss K., Ertl H.C., Wilson J.M. (1998). Cytotoxic T-lymphocyte target proteins and their major histocompatibility complex class I restriction in response to adenovirus vectors delivered to mouse liver. *J Virol* 72(4): 2945-54.

Kay M.A., Manno C.S., Ragni M.V., Larson P.J., Couto L.B., McClelland A., Glader B., Chew A.J., Tai S.J., Herzog R.W., Arruda V., Johnson F., Scallan C., Skarsgard E., Flake A.W., High K.A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 24(3): 257-61.

Kerbel R., Folkman J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2(10): 727-39.

Kestler J., Neeb B., Struyf S., Van Damme J., Cotmore S.F., D'Abramo A., Tattersall P., Rommelaere J., Dinsart C., Cornelis J.J. (1999). cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum Gene Ther* 10(10): 1619-32.

Kimsey P.B., Engers H.D., Hirt B., Jongeneel C.V. (1986). Pathogenicity of fibroblast- and lymphocyte-specific variants of minute virus of mice. *J Virol* 59(1): 8-13.

Kinoshita Y., Kono T., Yasumoto R., Kishimoto T., Wang C.Y., Haas G.P., Nishisaka N. (2001). Antitumor effect on murine renal cell carcinoma by autologous tumor vaccines genetically modified with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 cells.

J Immunother 24(3): 205-11.

Kishore J., Kapoor A. (2000). Erythrovirus B19 infection in humans. *Indian J Med Res* 112: 149-64.

Kootstra N.A., Verma I.M. (2003). Gene Therapy with Viral Vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 413-39.

Ladekjaer-Mikkelsen A.S., Nielsen J. (2002). A longitudinal study of cell-mediated immunity in pigs infected with porcine parvovirus. *Viral Immunol* 15(2): 373-84.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259): 680-5.

Lasek W., Mackiewicz A., Czajka A., Switaj T., Gol b J., Wiznerowicz M., Korczak-Kowalska G., Bakowiec-Iskra E.Z., Gryska K., Izycki D., Jakobisiak M. (2000). Antitumor effects of the combination therapy with TNF-alpha gene-modified tumor cells and interleukin 12 in a melanoma model in mice. *Cancer Gene Ther* 7(12): 1581-90.

Legendre D., Rommelaere J. (1992). Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J Virol* 66(10): 5705-13.

Legrand C., Rommelaere J., Caillet-Fauquet P. (1993). MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells. *Virology* 195(1): 149-55.

Li X., Rhode S.L. 3rd. (1990). Mutation of lysine 405 to serine in the parvovirus H-1 NS1 abolishes its functions for viral DNA replication, late promoter trans activation, and cytotoxicity.

J Virol 64(10): 4654-60.

Linser P., Bruning H., Armentrout R.W. (1977). Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J Virol* 24(1): 211-21.

Lo W.D., Qu G., Sferra T.J., Clark R., Chen R., Johnson P.R. (1999). Adeno-associated virus-mediated gene transfer to the brain: duration and modulation of expression. *Hum Gene Ther* 10(2): 201-13.

Lo-Man R., Rueda P., Sedlik C., Deriaud E., Casal I., Leclerc C. (1998). A recombinant virus-like particle system derived from parvovirus as an efficient antigen carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant. *Eur J Immunol* 28(4): 1401-7.

Lombardo E., Ramirez J.C., Garcia J., Almendral J.M. (2002). Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* 76(14): 7049-59.

López-Bueno A., Almendral J.M. (2002). Selection of single amino acid changes at the surface of the parvovirus MVMi capsid allows the virus to evade a passive immunotherapy in SCID mice.

IX Parvovirus Workshop, Bologna.

Luster A.D., Leder P. (1993). IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymusdependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 178(3): 1057-65.

Mantovani A., Gray P.A., Van Damme J., Sozzani S. (2000). Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol* 68(3): 400-4.

Marchisone C., Pfeffer U., Del Grosso F., Noonan D.M., Santi L., Albini A. (2000). Progress towards gene therapy for cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 19(3): 261-70.

Markine-Goriaynoff D., van der Logt J.T., Truyens C., Nguyen T.D., Heessen F.W., Bigaignon G., Carlier Y., Coutelier J.P. (2000). IFN-gamma-independent IgG2a production in mice infected with viruses and parasites. *Int Immunol* 12(2): 223-30.

Martin R.M., Brady J.L., Lew A.M. (1998). The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *J Immunol Methods* 212(2): 187-92.

Mastakov M.Y., Baer K., Symes C.W., Leichtlein C.B., Kotin R.M., During M.J. (2002). Immunological aspects of recombinant adeno-associated virus delivery to the mammalian brain.

J Virol 76(16): 8446-54.

Maxwell I.H., Spitzer A.L., Maxwell F., Pintel D.J. (1995). The capsid determinant of fibrotropism for the MVMp strain of minute virus of mice functions via VP2 and not VP1. *J Virol* 69(9): 5829-32.

McCormick F. (2001). Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer* 1(2): 130-41.

McKisic M.D., Paturzo F.X., Smith A.L. (1996). Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T cell effector functions. *Transplantation* 61(2): 292-9.

McKisic M.D., Macy J.D. Jr, Delano M.L., Jacoby R.O., Paturzo F.X., Smith A.L. (1998). Mouse parvovirus infection potentiates allogeneic skin graft rejection and induces syngeneic graft rejection. *Transplantation* 65(11): 1436-46.

Mo X.Y., Tripp R.A., Sangster M.Y., Doherty P.C. (1997). The cytotoxic T-lymphocyte response to Sendai virus is unimpaired in the absence of gamma interferon. *J Virol* 71(3): 1906-10.

Möhler M., Zeidler M., Schede J. Rommelaere J., Galle P.R., Cornelis J.J., Heike M. (2003). The oncolytic parvovirus H1 induces release of heat shock protein HSP72 in susceptible human tumor cells but may not affect primary immune cells. *Cancer Gene Ther.* in press.

Moskalenko M., Chen L., van Roey M., Donahue B.A., Snyder R.O., McArthur J.G., Patel S.D. (2000). Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. J Virol 74(4): 1761-6.

Mullen J.T., Tanabe K.K. (2002). Viral oncolysis. Oncologist 7(2): 106-19.

Naeger L.K., Salome N., Pintel D.J. (1993). NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J Virol* 67(2): 1034-43.

Neville L.F., Mathiak G., Bagasra O. (1997). The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(3): 207-19.

Nicholas B.L., Brennan F.R., Martinez-Torrecuadrada J.L., Casal J.I., Hamilton W.D., Wakelin D. (2002). Characterization of the immune response to canine parvovirus induced by vaccination with chimaeric plant viruses. *Vaccine* 20(21-22): 2727-34.

Nüesch J.P., Cotmore S.F., Tattersall P. (1992). Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: effects of mutations in the nucleotide-binding motif. *Virology* 191(1): 406-16.

Nüesch J.P., Tattersall P. (1993). Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport. *Virology* 196(2): 637-51.

Nüesch J.P., Cotmore S.F., Tattersall P. (1995). Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* 209(1): 122-35.

Nüesch J.P., Lachmann S., Corbau R., Rommelaere J. (2003). Regulation of minute virus of mice NS1 replicative functions by atypical PKClambda in vivo. *J Virol* 77(1): 433-42.

O'Donnell D., Patel P., Sousa C.R. (1999). Gene manipulation in the induction of antitumour immunity. *Gene Ther* 6(11): 1796-7.

Olijslagers S., Dege A.Y., Dinsart C., Voorhoeve M., Rommelaere J., Noteborn M.H., Cornelis J.J. (2001). Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther* 8(12): 958-65.

Palmer G., Constant S., Tattersall P. (2002). Sustained humoral immunity following single inoculation of a parvoviral vaccine vector. *IX Parvovirus Workshop*, Bologna.

Parker J.S., Parrish C.R. (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* 74(4): 1919-30.

Penn I. (2000). Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf* 23(2): 101-13.

Parmiani G., Colombo M.P., Melani C., Arienti F. (1997). Cytokine gene transduction in the immunotherapy of cancer. *Adv Pharmacol* 40: 259-307.

Parmiani G., Rivoltini L., Andreola G., Carrabba M. (2000). Cytokines in cancer therapy. *Immunol Lett* 74(1): 41-4.

Penn I. (2000). Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf* 23(2): 101-13.

Perales M.A., Blachere N.E., Engelhorn M.E., Ferrone C.R., Gold J.S., Gregor P.D., Noffz G., Wolchok J.D., Houghton A.N. (2002). Strategies to overcome immune ignorance and tolerance. *Semin Cancer Biol* 12(1): 63-71.

Pertl U., Luster A.D., Varki N.M., Homann D., Gaedicke G., Reisfeld R.A., Lode H.N. (2001). IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol* 166(11): 6944-51.

Previsani N., Fontana S., Hirt B., Beard P. (1997). Growth of the parvovirus minute virus of mice MVMp3 in EL4 lymphocytes is restricted after cell entry and before viral DNA amplification: cell-specific differences in virus uncoating in vitro. *J Virol* 71(10): 7769-80.

Puisieux I., Odin L., Poujol D., Moingeon P., Tartaglia J., Cox W., Favrot M. (1998). Canarypox virus-mediated interleukin 12 gene transfer into murine mammary adenocarcinoma induces tumor suppression and long-term antitumoral immunity. *Hum Gene Ther* 9(17):2481-92.

Rayet B., Lopez-Guerrero J.A., Rommelaere J., Dinsart C. (1998). Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol* 72(11): 8893-903.

Rhode SL 3rd. (1976). Replication process of the parvovirus H-1 V. Isolation and characterization of temperature-sensitive H-1 mutants. *J Virol* 17(2): 659-67.

Rhode SL 3rd. (1985). *trans*-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J Virol* 55(3): 886-9.

Richards R.G., Armentrout R.W. (1979). Early events in parvovirus replication: lack of integration by minute virus of mice into host cell DNA. *J Virol* 30(1): 397-9.

Rommelaere J., Cornelis J.J. (1991). Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* 33(3): 233-51.

Rommelaere J., Cornelis J.J. (2001). Autonomous Parvoviruses. *Monogr Virol* 22: 100-129.

Ros C., Burckhardt C.J., Kempf C. (2002). Cytoplasmic Trafficking of Minute Virus of Mice: Low-pH Requirement, Routing to Late Endosomes, and Proteasome Interaction. *J Virol* 76(24): 12634-45.

Roth J.A., Cristiano R.J. (1997). Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 89(1): 21-39.

Rubio M.P., Guerra S., Almendral J.M. (2001). Genome replication and postencapsidation functions mapping to the nonstructural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells.

J Virol 75(23): 11573-82.

Sahli R., McMaster G.K., Hirt B. (1985). DNA sequence comparison between two tissuespecific variants of the autonomous parvovirus, minute virus of mice. *Nucleic Acids Res* 13(10): 3617-33.

Santaren J.F., Ramirez J.C., Almendral J.M. (1993). Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMp: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis. *J Virol* 67(9): 5126-38.

Schlehofer J.R., Rentrop M., Mannel D.N. (1992). Parvoviruses are inefficient in inducing interferon-beta, tumor necrosis factor-alpha, or interleukin-6 in mammalian cells. *Med Microbiol Immunol* 181(3): 153-64.

Schutz A., Oertli D., Marti W.R., Noppen C., Padovan E., Spagnoli G.C., Heberer M., Zajac P. (2001). Immunogenicity of nonreplicating recombinant vaccinia expressing HLA-A201 targeted or complete MART-1/Melan-A antigen. *Cancer Gene Ther* 8(9): 655-61.

Segovia J.C., Real A., Bueren J.A., Almendral J.M. (1991). In vitro myelosuppressive effects of the parvovirus minute virus of mice (MVMi) on hematopoietic stem and committed progenitor cells. *Blood* 77(5): 980-8.

Shedlock D.J., Weiner D.B. (2000). DNA vaccination: Antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* 68(6): 793-806.

Shin S., Kim Y.B., Hur G.H. (1999). Involvement of phospholipase A2 activation in anthrax lethal toxin-induced cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 15(1): 19-29.

Siegl G. (1976). Die Virusforschung in Einzeldarstellungen. *Springer Verlag*.

Siegl G. (1984). Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses. (In: K.I. Berns (ed.) The Parvoviruses). *Plenum Press* (New York, 1984): 297-362.

Siegl G., Bates R.C., Berns K.I., Carter B.J., Kelly D.C., Kurstak E., Tattersall P. (1985). Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23: 61-73. **Sigal** L.J., Reiser H., Rock K.L. (1998). The role of B7-1 and B7-2 costimulation for the generation of CTL responses in vivo. *J Immunol* 161(6): 2740-5.

Sioud M. (2002). How does autoimmunity cause tumor regression? A potential mechanism involving cross-reaction through epitope mimicry. *Mol Med* 8(3): 115-9.

Smelt S.C., Borrow P., Kunz S., Cao W., Tishon A., Lewicki H., Campbell K.P., Oldstone M.B. (2001). Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics.

J Virol 75(1): 448-57.

Snapper C.M., McIntyre T.M., Mandler R., Pecanha L.M., Finkelman F.D., Lees A., Mond J.J. (1992). Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med* 175(5): 1367-71.

Snapper C.M., Mond J.J. (1993). Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today* 14(1): 15-7.

Srivastava P.K., Amato R.J. (2001). Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine* 19(17-19): 2590-7.

Takahashi Y., Murai C., Shibata S., Munakata Y., Ishii T., Ishii K., Saitoh T., Sawai T., Sugamura K., Sasaki T. (1998). Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci* 95(14): 8227-32.

Takaoka A., Mitani Y., Suemori H., Sato M., Yokochi T., Noguchi S., Tanaka N., Taniguchi T. (2000). Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains.

Science 288(5475): 2357-60.

Tamm I., Dorken B., Hartmann G. (2001). Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* 358(9280): 489-97.

Tattersall P., Cawte P.J., Shatkin A.J., Ward D.C. (1976). Three structural polypeptides coded for by minite virus of mice, a parvovirus. *J Virol* 20(1): 273-89.

Tolfvenstam T., Oxenius A., Price D.A., Shacklett B.L., Spiegel H.M., Hedman K., Norbeck O., Levi M., Olsen K., Kantzanou M., Nixon D.F., Broliden K., Klenerman P. (2001). Direct ex vivo measurement of CD8(+) T-lymphocyte responses to human parvovirus B19. *J Virol* 75(1): 540-3.

Toolan H.W., Ledinko N. (1968). Inhibition by H-1 virus of the incidence of tumors produced by adenovirus 12 in hamsters. *Virology* 35(3): 475-8.

Tullis G.E., Burger L.R., Pintel D.J. (1993). The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. J Virol 67(1): 131-41.

Vanacker J.M., Corbau R., Adelmant G., Perros M., Laudet V., Rommelaere J. (1996). Transactivation of a cellular promoter by the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice through a putative hormone-responsive element. *J Virol* 70(4): 2369-77.

Wadhwa P.D., Zielske S.P., Roth J.C., Ballas C.B., Bowman J.E., Gerson S.L. (2002). Cancer gene therapy: scientific basis. *Annu Rev Med* 53: 437-52.

Wang Z., Qiu S.J., Ye S.L., Tang Z.Y., Xiao X. (2001). Combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 8(10): 751-8.

Wetzel K. (2000). Untersuchung MCP-3-rekombinanter Parvoviren zur Gentherapie von Krebs: Vorklinische Studien in zwei Tiermodellen. *Doktorarbeit*, Heidelberg.

Wetzel K., Menten P., Opdenakker G., Van Damme J., Grone H.J., Giese N., Vecchi A., Sozzani S., Cornelis J.J., Rommelaere J., Dinsart C. (2001). Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts. *J Gene Med* 3(4): 326-37.

Whalen M.M., Doshi R.N., Bader B.W., Bankhurst A.D. (1999). Lysophosphatidylcholine and arachidonic acid are required in the cytotoxic response of human natural killer cells to tumor target cells. *Cell Physiol Biochem* 9(6): 297-309.

Willwand K., Hirt B. (1991). The minute virus of mice capsid specifically recognizes the 3' hairpin structure of the viral replicative-form DNA: mapping of the binding site by hydroxyl radical footprinting. *J Virol* 65(9): 4629-35.

Wilson G.M., Jindal H.K., Yeung D.E., Chen W., Astell C.R. (1991). Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* 185(1): 90-8.

Wolkers M.C., Stoetter G., Vyth-Dreese F.A., Schumacher T.N. (2001). Redundancy of direct priming and cross-priming in tumor-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* 167(7): 3577-84.

Wrzesinski C., Tesfay L., Salomé N., Jauniaux J.C., Rommelaere J., Cornelis J.J., Dinsart C. (2003). Chimeric and pseudotyped parvoviruses minimize the contamination of recombinant stocks with replication-competent viruses and identify a DNA sequence that restricts parvovirus H-1 in mouse cells. *J Virol*. in press.

Zadori Z., Szelei J., Lacoste M.C., Li Y., Gariepy S., Raymond P., Allaire M., Nabi I.R, Tijssen P. (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* 1(2): 291-302.

Zadori Z., Szelei J., Forest S., Li Y., Tijssen P. (2002). Identification of a novel protein with a crucial role in PPV egress. *IX Parvovirus Workshop*, Bologna.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jean Rommelaere für die Überlassung des Arbeitsplatzes und seine Unterstützung jeglicher Art.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jan Cornelis für die Themenstellung, Betreuung und Bereitschaft, die Projekte zu jeder Zeit zu diskutieren, die vielen wissenschaftlichen Anregungen und Erklärungen und seine Unterstützung in all den Jahren.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Zawatzky für seine Betreuung und stetige Unterstützung, für viele interessante Diskussionen, sowie das geduldige Korrekturlesen und die Begutachtung dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Gert Fricker danke ich sehr für die Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Reichling und Herrn Prof. Dr. Manfred Wießler möchte ich mich für Ihre Bereitschaft, diese Arbeit zu prüfen, bedanken.

Dr. Christiane Dinsart danke ich für viele Diskussionen und ihre konstruktive Kritik.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. Jürg Nüesch für zahlreiche wissenschaftliche Hilfestellungen und nicht zuletzt den Gedankenaustausch über Themen aller Art.

Dem gesamten Labor möchte ich für die fröhliche und lockere Arbeitsstimmung danken. Im Besonderen danke ich Dr. Christopher Kornfeld, der mich sehr geduldig in die Molekularbiologie einführte und dem ich viele schöne Erinnerungen verdanke. Ich bedanke mich sehr bei Alexandra Stroh-Dege für die umfangreiche Laboreinweisung und die vielen kleinen Hilfestellungen bei Routineversuchen; bei Dr. Andreas Haag, der mich an seinen letzten Projekten teilhaben ließ; bei Dr. Claudia Wrzesinski, mit der ich Höhen und Tiefen der Doktorarbeit gemeinsam durchlebte, und für Ihren Einsatz beim Korrekturlesen dieser Arbeit; bei Tim Kayser für die exakten Korrekturen, seinen Humor und die Apothekerzeitungen; bei Marta Enderlin, die unsere Laborhälfte zum Leben erweckte; bei Lia Tesfay, die mir eine liebe Freundin wurde; bei Ginette Balboni, die mir, wenn nötig, auch ihren Platz zur Verfügung stellte; und nicht zuletzt bei Stephanie Bölz, mit der ich sehr gerne zusammengearbeitet habe.

Besonders danke ich Dr. Nathalia Giese, die mich in die Tiefen der Immunologie einführte und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Weiterhin danke ich den anderen Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere Ellen Burkhard, Barbara Leuchs, Lars Krüger, Dr. Tarig Bashir, Dr. Dirk Grimm, Dr. Jason King, Anabell Grewenig, Marcus Müller, Zahari Raykov und dem Tierlabor, insbesondere Martin Friedel, für viele Hilfestellungen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Dr. Wolfram Osen danke ich für die Einweisung in den CTL-*Assay*. Ich möchte auch unserem Pförtner Herrn Koch für die abwechslungsreichen Gespräche während meiner Schreibphase in den späten oder frühen Stunden danken.

Allen, die mich während der Doktorarbeit außerhalb des Labors begleitet haben, sei hiermit ganz besonders gedankt. Es war so schön mit Euch!

Besonders liebevoll bedanke ich mich bei Thomas für seine Geduld und Unterstützung, die Korrekturen und seinen unvergleichlichen Humor.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Christoph und dem Rest der Familie, die mich stets liebevoll unterstützt und aufgebaut haben und mir eine angenehme, sorgenfreie Doktorandenzeit ermöglichten. Vielen lieben Dank!