Charakterisierung eines parvoviralen Hybridvektors hinsichtlich der Transduktion und präferentiellen Expression in transformierten Zellen

> Lars Krüger März 2005

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplombiologe Lars Krüger

aus Münster

Tag	der	mündlichen	Prüfung:	

Charakterisierung eines parvoviralen Hybridvektors hinsichtlich der Transduktion und präferentiellen Expression in transformierten Zellen

Gutachter: PD Dr. Jürgen A. Kleinschmidt

Prof. Dr. Hans-Georg Kräußlich

Danksagung

Ich bedanke mich bei PD Dr. Jürgen Kleinschmidt für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen. Dabei danke ich ganz besonders für seine freundliche und geduldige Unterstützung und für die vielen anregenden Diskussionen. Seine genauen Korrekturen und guten Vorschläge waren mir eine große Hilfe.

Prof. Dr. Hans-Georg Kräußlich danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten. Bei Prof. Dr. Lutz Gissmann und Prof. Dr. Hell bedanke ich mich für ihre Bereitwilligkeit, als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Prof. Dr. Uwe Haberkorn, Helmut Eskerski, Fabian Birkle und Alexandra Tietz danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung des *in vivo* Modells.

Helmut Eskerski danke ich in besonderem Maß für die kompetente Anleitung, seine Organisationsfähigkeiten und große Motivation. Es gab keine unmöglichen Arbeitszeiten, wenn das Experiment es erforderte, und interessante Gespräche waren dabei inklusive.

Dr. Jan Cornelis danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und die förderlichen Anregungen bei der Korrektur eines Einleitungsteils.

Dr. Wilma Dormeyer danke ich sehr für die intensive Durchsicht der Diskussion und ihre guten Ideen dafür. Darüber hinaus bin ich sehr dankbar für die Freundschaft, die ich durch Wilma, aber auch durch Per, Tamara, Nina, Tobi und Steffi erfahren habe.

Thomas Holz gilt mein Dank für die schnelle Hilfe bei leidigen Computerproblemen.

Dem Labor 2.219 danke ich für eine freundliche Atmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft.

"Wissenschaft ist Reden"... in diesem Sinne danke ich allen, die mich durch ihre Gesprächsbereitschaft fachlich sicherer und persönlich froher gemacht haben.

Ich danke meiner lieben Mutter, Ingeborg Krüger-Kosatschuk, für ihre beständige, liebevolle und fürsorgliche Unterstützung, ohne die diese Arbeit in dieser Weise nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis Zusammenfassung 1. Einleitung 1.1 Die Familie der Parvoviridae – Ein Überblick 1.2 Genomische Organisation der Parvovirinae – Ein Überblick 1.3 Lebenszyklus der Parvoviren – Ein Überblick 1.4 Das Dependovirus AAV-2 1.4.1 Genomische Organisation von AAV-2 1.4.2 Replikation bei AAV-2 1.4.3 Regulation der Genexpression bei AAV-2 1.4.4 Kapsidbildung und Enkapsidierung bei AAV-2 1.4.5 Der Helfereffekt – Interaktion von AAV-2 mit adenoviralen Proteinen 1.4.6 Integration 1.5 Die autonom replizierenden Parvoviren H-1 Virus und MVMp 1.5.1 Genomische Organisation von MVMp 1.5.2 Replikation bei autonomen Parvoviren 1.5.3 Regulation der Genexpression bei autonomen Parvoviren 1.6 Onkotropismus und Onkolyse der autonomen Parvoviren 1.6 Onkotropismus und Onkolyse der autonomen Parvoviren MVMp und H-1 Virus 1.7 Der Einfluß einer Infektion mit Parvoviren auf den Zellzyklus 1.8 Gentherapie mit viralen Vektoren 1.8.1 Virale Vektoren in der Gentherapie 2. Material 2.1 Biochemisches Material 2.1.2 Enzyme 2.1.3 Verbrauchslösungen 2.2 Biologisches Material 2.2.1 Größenmarker 2.2.2 Plasmide	III
Tabellenverzeichnis	V
Zusammenfassung	1
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
1. Einleitung	3
1.1 Die Familie der Parvoviridae – Ein Überblick	3
1.2 Genomische Organisation der Parvovirinae – Ein Überblick	4
1.3 Lebenszyklus der Parvoviren – Ein Überblick	5
1.4 Das Dependovirus AAV-2	5
1.4.1 Genomische Organisation von AAV-2	7
1.4.2 Replikation bei AAV-2	8
1.4.3 Regulation der Genexpression bei AAV-2	10
1.4.4 Kapsidbildung und Enkapsidierung bei AAV-2	11
1.4.5 Der Helfereffekt – Interaktion von AAV-2 mit adenoviralen Proteinen	12
1.4.6 Integration	13
1.5 Die autonom replizierenden Parvoviren H-1 Virus und MVMp	15
1.5.1 Genomische Organisation von MVMp	16
1.5.2 Replikation bei autonomen Parvoviren	18
1.5.3 Regulation der Genexpression bei autonomen Parvoviren	21
1.6 Onkotropismus und Onkolyse der autonomen Parvoviren MVMp und H-1 Virus	23
1.7 Der Einfluß einer Infektion mit Parvoviren auf den Zellzyklus	24
1.8 Gentherapie mit viralen Vektoren	27
1.8.1 Virale Vektoren in der Gentherapie	28
2. Material	
2.1 Biochemisches Material	37
2.1.1 Chemikalien	37
2.1.1.1 Radiochemikalien	37
2.1.2 Enzyme	37
2.1.3 Verbrauchslösungen	37
2.2 Biologisches Material	39
2.2.1 Größenmarker	39
2.2.2 Plasmide	39
2.2.3 Oligonukleotide	41
2.2.4 Sonden	41
2.2.5 Bakterienzellen	41
2.2.6 Eukaryontische Zellinien	42

	2.2.7 Antikörper	42
	2.3 Kits	42
	2.4 Geräte und Zubehör	43
	2.4.1 Geräte	43
	2.4.2 Zubehör	44
3. Me	ethoden	
	3.1 Molekularbiologische Methoden	45
	3.1.1 Bakterienkulturen	45
	3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	45
	3.1.3 Isolierung von Plasmid DNA	45
	3.1.3.1 Isolierung von Plasmid DNA zur Analyse – Mini Prep	45
	3.1.3.2 Isolierung von Plasmid DNA in präparativem Maßstab	
	– Maxi-/Mega Prep	46
	3.1.4 Analyse von Plasmid DNA	46
	3.1.4.1 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von DNA	46
	3.1.4.2 Restriktionsanalyse	46
	3.1.4.3 DNA Gelelektrophorese	46
	3.1.5 Methoden für die Klonierung von DNA Fragmenten	47
	3.1.5.1 Isolierung von DNA Fragmenten durch Gene Clean	47
	3.1.5.2 Dephosphorylierung von DNA Fragmenten	47
	3.1.5.3 Auffüllen von 5´-Überhängen – "Klenow-Blunten"	47
	3.1.5.4 Blunten durch Entfernen von 3´-Überhängen durch T4 DNA	
	Polymerase	47
	3.1.5.5 Ligation von DNA Fragmenten	48
	3.1.6 Methoden für den Nachweis von DNA Fragmenten	48
	3.1.6.1 Radioaktive Markierung von Sonden DNA	48
	3.1.6.2 "Southern Blot"	48
	3.1.7 PCR-Mutagenese	49
	3.1.8 Analyse der Proteinexpression	49
	3.1.8.1 Herstellung der Zellextrakte	49
	3.1.8.2 SDS-PAGE	49
	3.1.8.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran	50
	3.1.8.4 Coomassie-Färbung	50
	3.1.8.5 Immunodetektion der transferierten Proteine	50
	3.2 Zellbiologische Methoden	50
	3.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	50
	3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	51
	3.2.3 Bestimmung der Zellzahl	51
	3.3 Virologische Methoden	51
	3 3 1 Pränaration von rekombinanten viralen Vektoren	51

3.3.2 Reinigung und Konzentration von rekombinanten Vektoren	52
3.3.3 Titration von AAV-2 Vektorpräparationen – "Replication Dot Blot"	53
3.3.4 Titration von rH-1 Vektorpräparationen – "Replication Filter Center	
Assay"	53
3.3.5 Titration von rekombinanten Vektoren auf der Ebene der verpackten	
Genome – "Dot Blot"	54
3.3.6 Isolierung niedermolekularer DNA aus eukaryontischen Zellen	54
3.4 Messmethoden	54
3.4.1 Analyse durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	54
3.4.2 "Cell killing" Test	55
3.4.3 Quantifizierung der Luciferase-Expression	55
3.4.4 Proteinbestimmung in Gewebeproben	56
3.5 Methodische Beschreibung der <i>in vivo</i> Untersuchung zur stimulierten Expression in transformierten Zellen	56
4. Ergebnisse	
4.1 Herstellung und schematische Repräsentation des parvoviralen Hybridvektors TRH1	57
4.2 Transduktion <i>in vitro</i>	60
4.2.1 Der Einfluss des Adenovirus 5 als Helfervirus auf die	00
Transduktion der AAV-2 Vektoren	61
4.2.2 Der Einfluss genotoxischer Agenzien auf die Transduktion	01
durch die AAV-2 Vektoren	63
4.2.3 Transduktionssteigerung durch γ-Bestrahlung	63
4.2.4 Transduktionssteigerung durch UV-Bestrahlung	65
4.2.5 Der Einfluß von Cisplatin, Mitomycin und Carmustine (BCNU)	00
auf die Transduktion von AAV-Vektoren	66
4.3 Vergleich der Stärke der Expression nach Transfektion	70
4.4 Erstellung eines Profils infizierbarer Tumorzellinien durch die Vektoren	70
rH1-GFP und TRH1-GFP	72
4.4.1 Das Spektrum infizierbarer Zellen unterscheidet und ergänzt sich	72
4.4.2 Vergleichende Transduktion glialer Zellinien	78
4.6.3 Der Einfluss der Infektion durch den Hybridvektor TRH1-GFP auf	00
den Zellzyklus der glialen Tumorzellen	80
4.5 Vergleich der Expression in normalen gegenüber transformierten Zellinien	82
4.5.1 Vergleich der Internalisierung von AAV-2 Vektoren in Zellen der	00
verwendeten Zellpaare	86
4.6 Vergleich der Expression der verschiedenen Vektoren <i>in vivo</i> in Leberzelltumoren	
gegenüber der in normalem Leberparenchym	88

 .,	1 5 M	ในร	-	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,

5.1 Der Hybridvektor TRH1-GFP besitzt die Eigenschaften eines AAV-2 Vektors	
mit verstärkter Basistransduktion	95
5.2 Die Verwendung eines AAV Kapsids erweitert und ergänzt das Spektrum	
infizierbarer Zellen	99
5.3 Alle verwendeten AAV Vektoren exprimieren in vitro selektiv in transformierten	
Zellen	102
5.4 Analyse der präferenziellen Genexpression von parvoviralen Vektoren mit einer	
P4-ns1-P38 Kassette in transformiertem Gewebe in vivo	104
6. Literaturverzeichnis	110
7. Anhang	
7.1 Deletion eines Nukleotids zur Vermittlung von Replikationskompetenz	131

Abkürzungsverzeichnis

Mikro-

monoklonal

Milli-

μ-

mmc

-A Ampere antiα AAV Adeno-assoziiertes Virus Abb. **Abbildung** Ad Adenovirus **APS** Ammoniumpersulfat **ATP** Adenosintriphosphat **BCNU** Carmustine **BSA** Rinderserumalbumin Gensequenz für die Kapsidproteine bei AAV cap cdk Zyklin-abhängige Kinase CMV Cytomegalievirus CRE "cAMP response element" CRM1 "chromosome region maintenance protein 1" ¹³⁷Cs radioaktives Cäsium Isotop DMEM "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" DNA Desoxyribonukleinsäure Dnase Desoxyribonuclease ds-Doppelstrang-E2F Zellzyklus regulierter Transkriptionsfaktor **EBS** Ets-Bindungsstelle EDTA Ethylendiamintetraacetat Ets E26 transformationsspezifische Sequenz FACS Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung **FCS** Fötales Kälberserum **FGF** "Fibroblast Growth Factor" G_1 "Gap 1"-Phase im Zellzyklus Konstante der Erdbeschleunigung g Gramm -g GCV Ganciclovir **GFP** Grün fluoreszierendes Protein H-1 Ratten H-1 Parvovirus HMG "High Mobility Group" hRluc humanisierte Sequenz der Luciferase aus Renilla reniformis HSPG Heparansulfatproteoglykan HSV Herpes Simplex Virus IgG Immunglobulin G **ITR** invertiertes terminales Palindrom kD Kilo-Dalton LB Luria Broth Μ Mol

MOI "multiplicity of infection"

mRNA messenger RNA

MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

m.u. "map unit"

MVMp Minute Virus of Mice prototype strani

MWCO "molecular weight cut off"

ng Nanogramm

NS Nichtstrukturprotein O.D. optische Dichte

ORF offenes Leseraster

P4 Promotor bei der Karteneinheit 4 PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR Polymerasekettenreaktion
PIF "parvovirus initiation factor"
Ras GTPase, Proto-Onkoprotein

RBE Rep Bindungselement

Rep Nichtstrukturprotein bei AAV

RF replikative Form

S- Synthese-Phase im Zellzyklus

SA Splice Akzeptor SD Splice Donor

SDS Natriumdodecylsulfat

SP1 GC-Box bindender Transkriptionsfaktor

ss- Einzelstrang-SV40 Simian Virus 40

Tab. Tabelle

T-Ag großes T Antigen

TEMEDN,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TK Thymidinkinase
TR terminales Palindrom

Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan

trs terminale Auflösungsstelle

UV ultraviolett

V Volt

VP Virionenprotein

vs. versus wt Wildtyp

2n diploides Genom

Abbildungsverzeichnis

Abb. N	lr. Bezeichnung	Seite
1	Genomische Organisation von AAV-2	8
2	Inverted Terminal Repeat von AAV-2	9
3	Replikation bei AAV-2	9
4	Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression bei AAV-2	
	durch den Einfluß der Rep Proteine	10
5	Genomorganisation von MVMp	18
6	Replikation bei autonomen Parvoviren	19
7	Linkes Palindrom von MVMp	21
8	Der Einfluß einer Infektion mit AAV-2 oder einzelnen Komponenten davon	
	auf den Zellzyklus	25
9	Der Einfluß einer Infektion mit MVMp oder NS1 Protein auf den Zellzyklus	27
10	Parvoviraler Hybridvektor TRH1	57
11	Übersicht über die Konstruktion des Hybridvektors TRH1	58
12	Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren	59
13A	Transduktion von HeLa Zellen mit verschiedenen AAV Vektoren in Abhängig	keit
	von einer Adenovirus Koinfektion	61
13B	Steigerung der Transduktion durch Adenovirus 5 Koinfektion	62
14A	Viabilität und Transduktion von HeLa Zellen nach Bestrahlung mit 137Cs	64
14B/C	Vergleich der Transduktion der verschiedenen Vektoren in Abhängigkeit	
	von einer γ-Bestrahlung	64
15A	Viabilität von HeLa Zellen nach Bestrahlung mit UV-Licht	65
15B/C	Der Einfluß von UV-Bestrahlung auf die Transduktion der verschiedenen	
	AAV-2 Vektoren	66
16A	Viabilität von HeLa Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der	
	Medikamente Mitomycin oder Cisplatin	67
16B/C	Der Einfluß von Mitomycin und Cisplatin auf die Transduktion von AAV-2	
	Vektoren	68
17A/B	Der Einfluß von BCNU auf die Transduktion durch die verschiedenen AAV-2	
	Vektoren	69
18	Die Fluoreszenz-Intensität als Maß der Stärke der Expression auf der Ebene)
	einzelner Zellen	70
19A/B	Vergleich der Stärke der Expression auf der Ebene der Einzelzellexpression	
	und der Gesamtexpression durch FACS Analyse und Immunoblot	70
20A/B	Vergleich der Infizierbarkeit verschiedener Tumorzellinien durch die Vektore	n
	TRH1-GFP und rH1-GFP	74
21	Infizierbarkeit verschiedener Tumorzellinien durch TRH1-GFP und rH1-GFP	77
22A/B	Vergleich der Transduktion von glialen Tumorzellinien	79

23	Morphologie und Transduktion von NCH82 Zellen	79
24	Zellzyklusanalyse glialer Tumorzellinien nach einer Infektion mit TRH1-GFP	81
25	Transduktion im Zellpaarvergleich	83
26	Schematische Übersicht über den Ablauf des "Cell Killing Tests"	84
27	"Cell Killing Test" mit drei Zellpaaren von transformierten und	
	nicht-transformierten Zellen	85
28	Internalisierung des AAV-2 Vektors TRUF5 in die Zellpaare	87
29	Vergleich der Titer der Vektorpräparationen	88
30	Infizierbarkeit der Leberkarzinomzellinie MH3924A mit den verschiedenen	
	parvoviralen Vektoren	88
31	Schematische Darstellung des in vivo Experiments	90
32	in vivo Vorexperiment zur Kinetik der Renilla-Luciferase Expression der	
	verschiedenen parvoviralen Vektoren	88
33	Rattenleber mit Tumor	90
34	Vergleich der maximalen Expression im Tumor vs. Leberparenchym nach	
	Infektion durch die verschiedenen Vektoren	91
35A/B	Vergleich der mittleren maximalen Expression im Tumor vs. Leberparenchym	92
36	Vergleich der Gesamtexpression im Tumor vs. Leberparenchym nach Infektion	
	durch die verschiedenen Vektoren	93
37A/B	Vergleich der mittleren Gesamtexpression im Tumor vs. Leberparenchym	94
A1	Der linke Terminus des Hybridvektors TRH1 in der doppelsträngigen Form	131
A2	Replikation der verschiedenen Vektoren	132

Tabellenverzeichnis

Tab. Nr.	Bezeichnung	Seite
1	Sonden	41
2	Bakterienzellen	41
3	Eukaryontische Zellinien	42
4	Antikörper	42
5	Kits	42
6	Geräte	43
7	Zubehör	44
8	Zellinien und verwendete Zellkulturmedien	51
9	Zusammenstellung der verwendeten humanen Tumorzellinien für	
	den Vergleich der Infizierbarkeit durch rH1-GFP bzw. TRH1-GFP	72
10	Die verwendeten humanen, glialen Tumorzellinien	78
11	Zusammenstellung der verwendeten Zellinien für die Untersuchung de	er
	präferentiellen Expression in transformierten gegenüber (vs.) nicht-	
	transformierten, parentalen (p) Zellinien	82

Zusammenfassung

Für die autonomen Parvoviren MVMp und H-1 Virus wurden onkotrope und onkolytische Eigenschaften beschrieben, also eine präferentielle Replikation dieser Viren mit einhergehender Lyse in transformierten Zellen. Eine Transformation von Zellen mit Onkoproteinen wie aktiviertem Ras Protein führt zu einer Steigerung der Expression vom frühen P4 Promotor und zu einer verstärkten Toxizität des Nichtstrukturproteins NS1. Die Verwendung der P4-*ns1*-P38 Kassette aus H-1 Virus in einem AAV-2 Vektor sollte diesem Hybridvektor TRH1 neue Eigenschaften verleihen. Die Eigenschaften des Hybridvektors TRH1 wurden einerseits hinsichtlich der Transduktion charakterisiert, andererseits bezüglich einer selektiven Expression in transformierten Zellen.

Der Hybridvektor TRH1-GFP zeigte in HeLa Zellen eine erhöhte Basistransduktion gegenüber herkömmlichen AAV-2 Vektoren, vermutlich aufgrund einer stärkeren Expression. Eine Transduktion mit AAV-2 Vektoren kann durch verschiedene Behandlungen der Zellen oder Koinfektion mit Adenovirus 5 stimuliert werden. Eine Transduktion mit TRH1-GFP kann neben einer Koinfektion mit Adenovirus 5 durch UV- und γ-Bestrahlung und einer Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika wie Cisplatin, Mitomycin und Carmustine (BCNU) gesteigert werden. Somit verhält sich der Hybridvektor TRH1-GFP wie ein reiner AAV-2 Vektor. Eine Stimulierung der Transduktion mit AAV-2 Vektoren durch Chemotherapeutika oder γ-Bestrahlung bietet die Möglichkeit einer Kombinationstherapie. Die hier beschriebene Möglichkeit einer Stimulierung durch BCNU erweitert das Spektrum kombinierbarer Medikamente mit einer AAV Vektor vermittelten Gentherapie.

In einem Vergleich der Infizierbarkeit verschiedener Tumorzellinien mit dem Hybridvektor TRH1-GFP gegenüber einem rekombinanten H-1 Vektor, rH1-GFP, konnten die Tumorzellinien erwartungsgemäß mit unterschiedlicher Effizienz transduziert werden. Die Verwendung des Hybridvektors TRH1-GFP in einem AAV-2 Kapsid vermittelt also ein anderes Spektrum infizierbarer Zellen gegenüber einem rekombinanten H-1 Vektor und erweitert so den Einsatzbereich für die Verwendung der P4-ns1-P38 Kassette.

In vitro konnte für die Hybridvektoren TRH1-GFP und TRH1-TK, aber auch für herkömmliche AAV-2 Vektoren, eine selektive Expression in transformierten Zellen unter Verwendung von Zellpaaren gezeigt werden. In einem in vivo Tumormodell wurde die Expression verschiedener parvoviraler Vektoren untersucht. Es wurde ein Vektor verwendet, der sich von H-1 Virus ableitete (rH1-hRluc), ein herkömmlicher AAV-2 Vektor (CMV-hRluc) und der Hybridvektor TRH1-hRluc. Die Expression der verschiedenen Vektoren im Leberzellkarzinom (MH3924A) wurde mit der im Leberparenchym verglichen. Alle verwendeten parvoviralen Vektoren zeigten eine stimulierte Expression im Tumorgewebe gegenüber der im Leberparenchym. Jedoch erhöhte die Verwendung der P4-ns1-P38 Kassette im Hybridvektor TRH1-hRluc verglichen mit CMV-hRluc in diesem Tumormodell nicht die Selektivität der Expression im Leberzellkarzinom gegenüber der im Leberparenchym. Die Expression von Vektoren der autonom replizierenden Parvoviren in normalen gegenüber transformierten Zellen wurde bisher nur in vitro, jedoch nicht in vivo untersucht. Der in diesem in vivo Tumormodell ermittelte Faktor einer Stimulierung der Expression des Hybridvektors TRH1-hRluc im Leberzellkarzinom war vergleichbar mit dem Faktor bei der Verwendung des Vektors rH1-hRluc.

Summary

The autonomously replicating parvoviruses MVMp and H-1 virus are oncolytic viruses with oncotropic properties, i.e. preferential replication in and lysis of transformed cells. Oncogenic transformation of cells by oncoproteins like activated Ras protein stimulates expression from the early viral promotor P4, leading to increased levels of non-structural protein 1, NS1, and furthermore, enhances cytotoxicity mediated by this NS1 protein. Transfer and usage of the P4-*ns1*-P38 cassette derived from H-1 virus into an AAV-2 vector should confer new qualities to this hybridvector TRH1. On the one hand transduction properties of this hybridvector TRH1 have been characterized and on the other hand specificity of expression in transformed cells has been proved.

In HeLa cells hybridvector TRH1-GFP showed enhanced levels of transduction compared to conventional AAV-2 vectors, presumably due to enhanced expression. In general transduction with AAV-2 vectors can be stimulated by different treatments or coinfection with adenovirus 5. Besides a coinfection with adenovirus 5, transduction with TRH1-GFP was augmented by irradiation of the cells with UV- or X-rays and treatment of the cells with chemotherapeutic drugs such as Cisplatin, Mitomycin or Carmustine (BCNU). Concerning transduction properties hybridvector TRH1-GFP behaved like a pure AAV-2 vector. There is a chance in the treatment of cancer to combine AAV-2 vector mediated gene therapy with an anti-cancer therapy which also enhances transduction efficiency. BCNU as described here broadens the field of drugs for combinatorial therapies.

The ability of the hybridvector TRH1-GFP to transduce a panel of transformed cells of different origin was compared to the ability of a recombinant H-1 vector, rH1-GFP. As expected these vectors showed a different pattern in their ability to transduce those cells. Infections with the hybridvector TRH1-GFP are mediated at least in early infection steps by the AAV-2 capsid, which expands the spectrum of cells becoming transduced by parvoviral vectors carrying the P4-*ns1*-P38 cassette.

In vitro both hybridvectors TRH1-GFP and TRH1-TK and conventional AAV-2 vectors were shown to express selectively in transformed cells, making experimental use of cell pairs of transformed and normal cells. In vivo expression of different parvoviral vectors was investigated. Therefore expression profiles from a recombinant H-1 vector, rH1-hRluc, a conventional AAV-2 vector, CMV-hRluc, and hybridvector TRH1-hRluc were compared in hepatocellular carcinoma (MH3924A) bearing rats. Levels of expression of the different vectors in liver tumors were compared to the corresponding expression in normal liver tissue. Expression of all parvoviral vectors was increased in tumors compared to normal liver tissue. However, usage of the P4ns1-P38 cassette within hybridvector TRH1-hRluc did not yield a benefit compared to CMV-hRluc concerning selectivity of expression in tumor tissue. Selectivity of expression, applying vectors derived from the autonomously replicating parvoviruses MVMp or H-1 virus to transformed cells versus normal cells, was shown in vitro but had not been previously investigated in vivo. Stimulation of expression of hybridvector TRH1-hRluc in the liver tumor as determined here was comparable to the stimulation of expression of rH1-hRluc.

1. Einleitung

1.1 Die Familie der Parvoviridae – Ein Überblick

Die Parvoviridae sind kleine, unbehüllte Viren mit einem einzelsträngigen und linearen DNA Genom. Die Familie der Parvoviridae umfaßt die beiden Unterfamilien der Parvovirinae, die Vertebraten infizieren, und der Densovirinae, deren Wirte Arthropoden sind. Die Parvovirinae werden unterteilt in die Gattungen Parvovirus, Erythrovirus und Dependovirus. Die Gattungen der Densovirinae sind Densovirus, Iteravirus und Contravirus (zur Übersicht siehe Berns, 1996).

Gemäß einer Unabhängigkeit von einem Helfervirus für die Replikation werden die Gattungen Erythrovirus und Parvovirus als autonom replizierende Parvoviren zusammengefaßt und so den helferabhängigen Parvoviren, den Dependoviren gegenübergestellt (Siegl, 1976; Siegl et al, 1985). Diese werden durch die Adenoassoziierten Viren (AAV1-8) und den neuerlich beschriebenen Dependoviren des Rinds (Schmidt et al., 2004) und der Königspython (Farkas et al. 2004) repräsentiert. Die meisten Adeno-assoziierten Viren (mit Ausnahme von AAV-5) wurden als "Kontaminationen" in Adenovirus-Präparationen gefunden oder aus Affen isoliert, die zuvor in einer Studie eingesetzt wurden, in der sie mit Adenoviren infiziert wurden (Gao et al., 2002).

In dieser Arbeit wird bezug genommen auf die Parvoviren Minute Virus of Mice prototype strain (MVMp) und H-1 Virus, die den autonom replizierenden Parvoviren der Gattung Parvovirus angehören und auf AAV-2, ein Dependovirus.

Im allgemeinen besitzen die Parvovirinae große morphologische, strukturelle und physikalische Übereinstimmungen in ihren Eigenschaften. Die Virionen sind nicht von einer äußeren Membranhülle umgeben. Ihre Ausdehnung beträgt zwischen 18 und 26 nm im Durchmesser. Das ikosaedrische Kapsid besteht aus 2-3 unterschiedlichen Proteinen und wird aus 60 einzelnen Proteinmolekülen aufgebaut. Das häufigste Protein ist dabei entweder das VP2 beziehungsweise VP3, das 80-95% des Kapsids ausmacht. Die Proteine des Kapsids sind nicht glykosyliert. Das relative Molekulargewicht der Virionen beträgt 5.5 - 6.2 x 10^6 , die Dichte voller Partikel liegt bei 1.39 - 1.42 g/cm³ und der Sedimentationskoeffizient im Saccharosegradienten liegt zwischen 110 und 122 S. Die Virionen sind stabil bei pH Werten zwischen 3 und 9 und sind resistent gegen eine Inaktivierung durch Inkubation bei 56° C für 1 Stunde (Bachmann et al., 1979). Diese Stabilität besitzt besondere Bedeutung für die Dependoviren. Für die Produktion von AAV Wildtyp (wt) wird Adenovirus, ein doppelsträngiges DNA Virus, als Helfervirus eingesetzt. Dieses kann im CsCl-Gradienten

durch die Dichteunterschiede abgetrennt werden, oder es wird im Überstand durch Inkubation bei 56°C für 1 Stunde inaktiviert.

1.2 Genomische Organisation der Parvovirinae – Ein Überblick

Das virale Genom der Parvovirinae liegt einzelsträngig und linear vor (zur Übersicht siehe Berns, 1996; Berns & Bohenzky, 1987). Es umfaßt ca. 5000 Nucleotide (nt). Bei Dependoviren (AAV) und Erythroviren werden DNA-Stränge beider Polaritäten in gleichem Maße verpackt, während bei Viren der Gattung Parvovirus (u.a. MVMp und H-1 Virus) überwiegend der kodogene Strang verpackt wird. Aufgrund dieser Tatsache besteht die Übereinkunft, das Genom der Parvoviren in 3'-5'-Richtung anzugeben. An beiden Enden der viralen DNA befinden sich palindromische Sequenzwiederholungen unterschiedlicher Länge. die allgemein als "terminal repeats" (TR) und bei AAV-2 als invertierte terminale Sequenzwiederholungen (ITR) bezeichnet werden. Diese TR Regionen bilden ausgeprägte Sekundärstrukturen, bei AAV-2 sogenannte T-förmige Haarnadelschleifen, aus. Bei AAV-2 sind die ITRs an beiden Enden 145 nt lang und zueinander komplementär. Dadurch kann auch eine andere Sekundärstruktur, eine sogenannte Pfannenstielstruktur gebildet werden. Die TRs am 3'- bzw. 5'- Ende bei Viren der Gattung Parvovirus unterscheiden sich in der Nukleotidsequenz und der Länge dieser Sequenzen. Diese palindromischen Sequenzen sind bei allen Mitgliedern der Parvovirinae in cis notwendige Elemente für die Replikation und Verpackung des viralen Genoms.

Die Anordnung der viralen Gene ist weitgehend konstant. Bei allen Parvoviren enthält das Genom zwei große offene Leserahmen ("open reading frame" - ORF), die einander überlappen. Der 3' gelegene ORF codiert für die Nichtstrukturproteine, die für die Replikation, Genexpression und Verpackung des Genoms verantwortlich sind. Dabei wird eines oder mehrere Proteine kodiert, die durch alternatives Spleißen der RNA entstehen. Die Struktur und Anordnung der Promotoren ist nicht konserviert. Bei dem humanen Parvovirus B19 zum Beispiel wird durch diesen 3' gelegenen ORF das einzige Nichtstrukturprotein NS1 kodiert, bei den autonomen Parvoviren der Nagetiere (Maus / Ratte) entsteht durch Spleißen der RNA neben dem größeren NS1 Protein ein weiteres, NS2 genanntes, regulatorisches Protein, während der Nichtstrukturbereich (bei Dependoviren mit *rep* bezeichnet) bei AAV-2 für 4 Rep-Proteine codiert.

Der 5' gelegene ORF, der *cap*-Bereich ("coat proteins") oder *vp*-Bereich (Virionenprotein) genannt wird, codiert für 2-3 Proteine, die durch alternatives Spleißen der Transkripte, durch Nutzung alternativer Startkodons oder posttranslationale Proteolyse entstehen können. Bei allen Mitgliedern der Parvovirinae existiert im 5' terminalen Bereich des Genoms eine

Polyadenylierungsstelle, bei manchen Parvoviren gibt es eine weitere, zentral gelegene Polyadenylierungsstelle.

Die Kapsidproteine der Parvoviren besitzen relative Molekulargewichte von 80-86 kD für VP1, 64-75 kD für VP2 und 60-62 kD für VP3.

1.3 Lebenszyklus der Parvoviren – Ein Überblick

Durch Interaktion mit einem zellulären Rezeptor gelangt das Kapsid in die Zelle. Nur für wenige Parvoviren sind die Rezeptoren bekannt (Berns, 1996). Beim humanpathogenen Parvovirus B19 ist dieser Rezeptor als das Erythrozyten P-Antigen, ein Globosid, identifiziert worden (Brown et al., 1993). Es gibt Hinweise, daß die Rezeptoren für die autonomen Parvoviren MVMp und H-1 Virus Glykoproteine sind, die Sialinsäure enthalten (Cotmore & Tattersall, 1987). Für eine Infektion mit AAV-2 und AAV-3 dient Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) als primärer Rezeptor (Summerford et al., 1998; Qiu et al., 2000), und AAV-4 und AAV-5 nutzen Sialinsäure-haltige Rezeptoren (Kaludov et al., 2001; Walters et al., 2001). Im Inneren der Zelle gelangt die virale DNA in das Kernkompartiment und dort findet die Replikation und Verpackung statt. Parvoviren sind in starkem Maß abhängig von zellulären Funktionen. Die Replikation wird bei MVMp durch die zelluläre DNA Polymerase δ übernommen (Kolleck et al., 1982; Bashir et al., 2000). Die autonomen Parvoviren MVMp und H-1 Virus sind für ihre Replikation abhängig vom Eintritt der Zelle in die S-Phase und damit von der Proliferation der Zellen (Berns, 1990). In der Regel endet eine produktive Parvovirusinfektion mit der Zellyse und dem Freisetzen der Nachkommenpartikel. Dependoviren besitzen jedoch die Möglichkeit, bei Abwesenheit von Helferviren in das zelluläre Genom zu integrieren und eine latente Infektion zu etablieren. Diese Latenz kann durch eine spätere Koinfektion mit einem Helfervirus in eine produktive Infektion durch Ausschneiden des integrierten Genoms und Bildung von Nachkommenpartikeln rückgängig gemacht werden (Atchinson et al., 1965; Hoggan et al., 1966; Hoggan et al., 1970).

1.4 Das Dependovirus AAV-2

Heparansulfat-Proteoglykane dienen als primäre zelluläre Rezeptoren mit geringer Affinität für Infektionen mit dem humanen Dependovirus AAV-2 (Summerford et al., 1998). Heparansulfat ist weit verbreitet in Proteoglykanen der zellulären Matrix, wodurch das breite Spektrum infizierbarer Zellen erklärt wird. Als sekundäre Rezeptoren wurden das $\alpha V \beta 5$

Integrin und der FGF-Rezeptor 1 (FGFR1) beschrieben (Summerford et al., 1999; Qing et al., 1999).

Das Genom von AAV-2 hat eine Größe von 4681 nt (Cassinotti et al., 1988; Ruffing et al., 1994; Srivastava et al., 1983). AAV-2 ist für eine produktive Infektion abhängig von Helferfunktionen, die durch gleichzeitige Infektion mit Adenovirus (Ad), aber auch durch Herpes Simplex Virus (HSV Typ1 und 2), Cytomegalievirus (CMV), Humanem Herpes Virus Typ 6 (HHV6) (Buller et al., 1981; McPherson et al., 1985; Thomson et al., 1994) oder zum Teil durch Vaccinia Virus oder Herpes Varicella Zoster gestellt werden (Georg-Fries et al., 1984; Schlehofer et al., 1986). Diese Abhängigkeit von Helferfunktionen wird kompensiert in Zellen, die mit chemischen Karzinogenen, γ- oder UV-Bestrahlung, Hydroxyharnstoff oder Topoisomerase-Inhibitoren behandelt wurden sowie in synchronisierten Zellen (Russel et al., 1995; Ferrari et al., 1996; Yalkinoglu et al. 1988; Yakobson et al., 1987; Yakobson et al., 1989). Dies spiegelt die Abhängigkeit von zellulären Faktoren wider (Yakobson et al., 1989). Aber auch eine direkte Interaktion mit Adenovirus Proteinen wurden gezeigt (siehe 1.4.5 Der Helfereffekt - Interaktion von AAV-2 mit adenoviralen Proteinen).

In Abwesenheit von Helferfunktionen kann das virale Genom von AAV-2 ortsspezifisch und stabil in das humane Chromosom 19 in den q-Arm integrieren (Kotin, 1990/'91; Samulski et al., 1991). Diese ortsspezifische Integration wird duch die Rep Proteine vermittelt. Repdeletierte AAV-2 Vektoren besitzen weiterhin die Fähigkeit zur Integration in die zelluläre DNA, allerdings in variable Positionen (McLaughlin et al., 1988).

Eine Besonderheit unter den S-Phase abhängigen Parvovirinae stellt die Fähigkeit von rekombinanten AAV-2 zur Infektion und Transduktion von ruhenden Zellen dar. Durch AAV-2 Vektoren konnten Neuronen und Muskelzellen transduziert werden (McCown et al., 1996; Xiao et al., 1996). Die S-Phase des Zellzyklus ist demnach für eine Transduktion durch AAV-2 Vektoren weniger entscheidend und reicht alleine dafür auch nicht aus (Ferrari et al., 1999; Miao et al., 2000).

AAV-2 besitzt einen Onkotropismus und bewirkt einen als Onkosuppression bezeichneten Effekt, der zuerst bei autonom replizierenden Parvoviren gefunden wurde (zur Übersicht siehe Schlehofer, 1994).

Eine epidemiologische Untersuchung erbrachte einen hohen Anteil der Untersuchten in verschiedenen Ländern, die Antikörper gegen AAV-2 gebildet hatten (Erles et al.,1999). AAV-2 sind apathogene und wenig immunogene Viren. Da neutralisierende Antikörper eine Infektion mit AAV-2 Vektoren verhindern können (Peden et al., 2004), war diese hohe Seroprävalenz ein Anlaß zur Entwicklung von Vektorproduktionssystemen, die die anderen bisher bekannten AAV Serotypen verwenden (Grimm et al., 2003a/b).

1.4.1 Genomische Organisation von AAV-2

In der Genomkarte von AAV-2, die in 100 Karteneinheiten ("map units" / m.u.) eingeteilt ist, entspricht eine m.u. 46,81 Nukleotiden (Abb. 1). Das Dependovirus AAV-2 besitzt drei Promotoren bei den Genomkarteneinheiten 5 (P5), 19 (P19) und 40 (P40) (Green & Roeder, 1980a/b; Laughlin et al., 1979) und eine gemeinsame, terminale Polyadenylierungsstelle bei der Karteneinheit 96 (Laughlin et al., 1979; Srivastava et al., 1983). Die Promotoren P5 und P19 stellen zwei Initiationspunkte für die Transkription der 4 unterschiedlich großen Rep Proteine dar. Die Transkripte, die an P5 bzw. P19 initiiert wurden, werden gespleißt, so daß nach Translation die vier Rep Proteine Rep78 (P5), Rep68 (P5 - mRNA gespleißt), Rep52 (P19) und Rep40 (P19 - mRNA gespleißt) entstehen (Mendelson et al., 1986; Srivastava et al., 1983; Trempe et al., 1987). Der Promotor P40 ist für die Initiation der Transkription der RNA verantwortlich, von der aus die Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 entstehen (Johnson et al., 1971; Rose et al., 1971). Das Transkript vom Promotor P40 wird alternativ gespleißt (Trempe & Carter, 1988b; Cassinotti et al., 1988). Es gibt eine Spleiß Donor Stelle bei Nukleotid 1907 und zwei Spleiß Akzeptor Stellen bei den Nukleotiden 2201 (Samin) und 2228 (Sa_{mai}). So entstehen zwei unterschiedlich gespleißte 2,3 kb große mRNAs vom P40 Promotor aus. Das Spleißprodukt der Spleiß Donor Stelle (SD) und der seltener genutzten Spleiß Akzeptor Stelle minor (SA_{min}) enthält das Startkodon für VP1. Die gemeinsame mRNA für VP2 und VP3 ist ein Spleiß Produkt der SD und der Spleiß Akzeptor Stelle major (SAmai), in der das Startkodon für VP1 nicht mehr vorhanden ist. Stattdessen enthält diese mRNA das Startkodon für die Translation von VP3 und das seltene Startkodon ACG für die Translation von VP2. Durch die seltenere Nutzung der SA_{min} entstehen geringere Mengen der mRNA, von der aus VP1 translatiert werden kann. Durch die Verwendung eines seltenen Startkodons für die Translation von VP2 wird von der mRNA, von der aus VP2 und VP3 translatiert werden können, weniger VP2 als VP3 translatiert. Als Konsequenz daraus werden die Kapsidproteine in einer Stöchiometrie (VP1:VP2:VP3) von 1:1:10 produziert (Becerra et al., 1988; Cassinotti et al., 1988; Trempe & Carter, 1988a). Die Kapsidproteine von AAV-2 sind N-acetyliert (Becerra et al., 1985) und besitzen relative Molekulargewichte von 87 kD (VP1), 73 kD (VP2) und 62 kD (VP3).

Genomorganisation von AAV-2

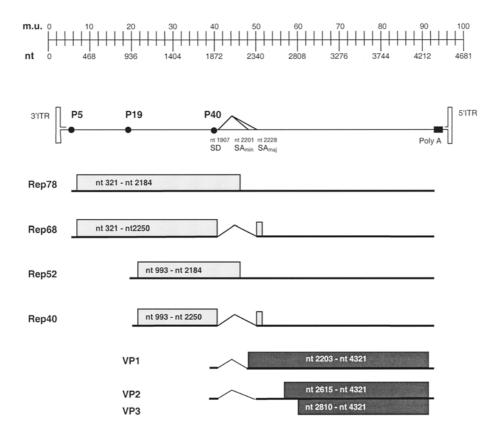


Abb. 1: Genomische Organisation von AAV-2

Das AAV-2 Genom wird in 100 Karteneinheiten eingeteilt. Bei einer Gesamtlänge von 4681 Nukleotiden (nt) entspricht eine Karteneinheit ("Map Unit" – m.u.) 46,81 nt. Das Genom enthält 3 Promotoren bei Karteneinheiten 5, 19 und 40. Alle Transkripte werden an einer PolyA Stelle (96 m.u.) polyadenyliert. Flankierend von den kodierenden Sequenzen befinden sich identische invertierte palindromische Sequenzen, die ITRs. Konventionell werden parvovirale Genome in 3'→5'-Richtung angegeben, die jeweiligen mRNAs wie üblich in 5'→3'-Richtung. Das Genom enthält zwei große offene Leserahmen, den *rep* und den *cap* ORF. Die Promotoren P5 und P19 initiieren die Transkripte für die Rep Proteine, P40 initiiert die der Kapsidproteine (VPs). Durch die zentral gelegenen Spleiß-Sequenzen (SD/SA - Splice Donor / Splice Acceptor minor und - major) entstehen so die mRNAs der 4 Rep Proteine, die ihren Namen durch ihr Molekulargewicht (in kD) bekommen haben. Bei den gespleißten mRNA-Formen von Rep68 und Rep40 sowie den VP mRNAs, ist der entfernte Bereich durch ein Dach angegeben. Die Balken symbolisieren den translatierten Bereich der Proteine. VP2 und VP3 werden von der gleichen mRNA Form translatiert. Dabei wird für VP2 das seltene Startkodon ACG verwendet. Die Form der ITRs deutet an, daß diese in einer gepaarten Sekundärstruktur vorliegen, so daß doppelsträngige DNA Bereiche entstehen. Das 3' ITR dient so als Primer der Polymerisationsreaktion bei der Replikation des Genoms. Die Spleißakzeptorstellen und die ITRs sind in Größe und Position verzerrt dargestellt, um eine Übersichtlichkeit zu gewährleisten.

1.4.2 Replikation bei AAV-2

Die Replikation von AAV verläuft über einen unidirektionalen quasizirkulären rollenden Haarnadel Mechanismus (Straus, 1976a; Hauswirth & Berns, 1979). Bei AAV werden beide DNA Stränge mit gleicher Effizienz verpackt (Rose et al., 1969; Mayor et al., 1969; Berns & Rose, 1970; Berns & Adler, 1972) und auch die Konfiguration der ITRs kommt in beiden Orientierungen, in 'Flip' und 'Flop', vor (Lusby et al., 1981). Die entscheidenden Proteine für die Replikation sind die "großen" Rep Proteine (Rep78 und Rep68). Diese besitzen DNA Bindungseigenschaften, eine ATP-abhängige Endonukleaseaktivität und DNA-Helikaseaktivität (Ashktorab & Srivastava, 1989; Im & Muzyczka, 1989/'90/'92; Snyder et al.,

1990b; Wonderling et al., 1995). Das doppelsträngige 3' ITR dient als Startpunkt der Replikation (zur Übersicht siehe Muzyczka, 1992).



Abb. 2: Inverted Terminal Repeat von AAV-2

Von den 145 Nucleotiden liegen 125 gepaart vor. Innerhalb des großen Palindroms befinden sich zwei kleinere palindromische Einheiten (B und C Palindrom), die zusammen eine T-förmige Struktur bilden können. Im Stamm des A-Palindroms befindet sich ein Rep-Bindungselement (RBE) und die terminale Auflösungsstelle (trs) zur Replikation der ITRs. Die ungepaarten Nukleotide werden als D-Sequenz bezeichnet.

Von den 145 nt liegen 125 nt gepaart vor (Abb. 2). Innerhalb des großen Palindroms liegen zwei kleinere Palindrome, die eine T-förmige Struktur bilden (Lusby et al., 1980). Die gepaarten palindromischen Sequenzen werden A-, B- und C-Palindrom genannt, die ungepaarten 20 nt bezeichnet man als D-Sequenz (Wang et al., 1995/1996). Das freie 3'-OH des A-Palindroms dient als Primer der Polymerisation, von dem aus die Replikation zum 5' ITR fortschreitet und dort in einer Strangverdrängungsreaktion das rechte ITR repliziert (Abb. 3). Rep68/78 binden an die Rep-Bindungssequenz [GAGC]₃ ("Rep binding element" - RBE) im A-Palindrom und bilden Oligomere (Smith et al., 1997; Weitzmann et al., 1996a; Im & Muzyczka, 1989/1990; Owens et al., 1991/1993; McCarty et al., 1994a/b). Rep68 und Rep78 führen einen DNA Einzelstrangbruch bei nt 124 an der terminalen Auflösungsstelle ("terminal resolution site" - trs) am 3' ITR ein. Dabei wird das 5'-Phosphatende kovalent über

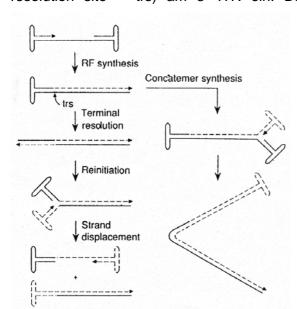


Abb. 3: Replikation bei AAV-2

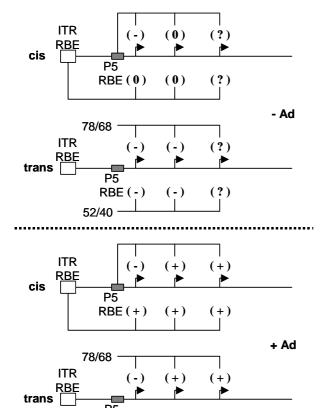
Das linke Palindrom dient als Primer der ersten Auffüllreaktion zu Beginn der Replikation. Das 5' ITR wird dann in einer Strangverdrängungsreaktion repliziert. Entweder faltet sich das replizierte rechte ITR zurück und blidet somit einen Primer für die weitere Replikation ("Concatemer synthesis"), die zur Bildung eines doppelsträngigen, konkatemeren Intermediats dsRF2 führt, oder die großen Rep Proteine führen einen Einzelstrangbruch an der terminalen Auflösungsstelle (trs) ein, der ein freies 3'-OH für weitere DNA-Synthese schafft. Dadurch wird das linke ITR repliziert. Durch Rückfaltung der ITRs und DNA-Synthese in einem Strangverdrängungsmechanismus wird die Replikation fortgesetzt. (Abb. aus Muzyczka, 1992)

einen Tyrosinrest mit dem Rep-Protein verbunden (Im & Muzyczka, 1990/'92; Snyder et al., 1990a/b; Prasad & Trempe, 1995). Das freie 3'-OH dient wiederum als Primer für die Polymerisationsreaktion, wodurch das linke, 3' ITR repliziert wird. Das AAV-Genom liegt nun dimer in einer doppelsträngigen Konformation vor. Die freien 3'-OH Enden dienen nach Rückfaltung der ITRs wieder als Primer für eine erneute Replikation. Es werden doppelsträngige Replikationsintermediate beobachtet, die zwei (monomere ds DNA; RF1)

bzw. vier (dimere dsDNA; RF2) Genomen entsprechen (Straus et al., 1976a/b; Berns & Hauswirth, 1979). Die sequenzspezifische Bindung und endonukleolytische Aktivität der Rep Proteine, die zur terminalen Auflösung führen, werden durch die Interaktion mit "High Mobility Group-1" Protein (HMG-1) verstärkt (Costello et al., 1997). Es finden außerdem Interaktionen zwischen den Rep Proteinen Rep78/68 und dem DNA-Einzelstrang-bindenden zellulären Replikationsprotein A (RPA) oder gegebenenfalls mit viralen Proteinen mit analoger Funktion, mit dem Adenovirus E2A Protein oder Herpes Simplex Virus-1 ICP8 statt, die die Prozessivität der Replikation steigern (Stracker et al., 2004).

1.4.3 Regulation der Genexpression bei AAV-2

Die Rep Proteine besitzen wichtige Aufgaben bei der Regulation der Transkription viraler Sequenzen (Labow et al., 1986; Beaton et al., 1989; McCarty et al., 1991). Dabei wird die Funktion dieser Proteine beeinflußt durch Anwesenheit von adenoviralen Helferfunktionen, die zur DNA Replikation und Transkription von AAV-2 führen. Die Rep78/68 Proteine üben dabei transaktivierenden Einfluß auf die AAV-2 Promotoren aus (Labow et al., 1986; Tratschin et al., 1986; McCarty et al., 1991; Weger et al., 1997). Die ITRs besitzen eine Enhancer-ähnliche Aktivität, die abhängig ist von den *trans*-Effekten der Rep-Proteine (Beaton et al., 1989; McCarty et al., 1991).



RBE(+)

52/40 ·

(?)

(?)

Abb. 4: Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression bei AAV-2 durch den Einfluß der Rep Proteine

Die Regulation der Genexpression bei AAV-2 ist unterschiedlich in Abwesenheit (-Ad) oder Anwesenheit (+Ad) von Adenovirus. Dargestellt sind jeweils die *cis* Einflüsse (cis) der Rep Bindungsstellen im 3'ITR (ITR RBE) und der Rep Bindungsstelle vor dem P5 Promotor (P5 RBE) auf die Promotoraktivitäten der AAV-2 Promotoren (gebogene Pfeile) und die Einflüsse einer Bindung entweder der "großen" Rep Proteine Rep78/68 oder der "kleinen" Rep Proteine Rep52/40 an die RBEs und daraus resultierende Aktivitätsänderungen der Promotoren (trans). Abbildung nach Pereira et al., 1997a

Eine Bindung von Rep78/68 an das Rep Bindungselement (RBE) im 3' ITR transaktiviert in Anwesenheit von Adenovirus (+Ad/cis) alle AAV-2 Promotoren P5, P19 und P40, während die Bindung an das RBE im P5 Promotor nur stimulierend auf P19 und P40 wirkt, den P5 jedoch inhibiert (Abb.4; Pereira et al., 1997a). Diese Hemmung des P5 Promotors kann durch die Rep52/40 Proteine teilweise vermindert werden (+Ad/trans). Dieser Effekt wird indirekt und kompetetiv durch Interaktion von Rep52 mit Rep78 oder Rep 68 vermittelt (Pereira et al., 1997a). Eine direkte Interaktion der "kleinen" Rep Proteine mit *cis* Elementen des AAV-2 Genoms findet nicht statt (Im & Muzyczka, 1992; McCarty et al., 1992). Weiterhin konkurriert ein Zinkfingerprotein ZF5 mit den Rep Proteinen Rep78/68 um die Bindungsstelle im P5 Promotor und kann so die Expression und Replikation von AAV-2 inhibieren (Cathomen et al., 2001).

Der P19 Promotor benötigt für eine Aktivierung eine Rep78/68 Interaktionen mit der RBE im P5 Promotor, einen bisher nicht identifizierten zellulären Faktor ("cellular AAV activating protein" – cAAP) und eine SP1 Bindungsstelle vor dem P19 Promotor (Pereira et al., 1997b). Dabei führt eine Proteininteraktion der Rep Proteine zusammen mit SP1 zu einer DNA Konformation, die den YY1 Proteinkomplex des P5 Promotors in die Nähe des P19 Promotors bringt und so transaktiviert (Pereira et al., 1997c; Lackner et al., 2002).

Der P40 Promotor benötigt für eine Transaktivierung durch die großen Rep Proteine Rep78 und Rep68 eine RBE entweder im 3'-ITR oder vor dem P5 Promotor (Pereira et al., 1997a), ein CArG-ähnliches Element vor dem P19 Promotor und eine SP1 Bindungsstelle und eine TATA-Box direkt vor dem P40 Promotor (Pereira et al., 1997c).

Die Rep Proteine sind somit Aktivatoren und auch Inhibitoren für die Expression viraler Sequenzen. Die Inhibition des P5 Promotors durch das eigene Genprodukt, die Rep Proteine Rep78/68, wird als eine notwendige Kontrolle der Menge dieser multifunktionellen Proteine interpretiert.

Die Rep Proteine Rep78/68 interagieren mit dem transkriptionellen Koaktivatorprotein PC4 vornehmlich in der nicht-phosphorylierten Form (Weger et al., 1999). Bei Abwesenheit von Helferfunktionen inhibieren Rep68 und Rep78 die AAV-2 Promotoren in Interaktion mit PC4 durch die Bindung an die RBEs (Kyöstiö et al., 1994/'95; McCarty et al., 1994b; Hörer et al., 1995; Pereira et al., 1997a; Weger et al., 1999). Die kleinen Rep Proteine Rep52 und Rep40 zeigen diese inhibitorische Aktivität nicht oder nur gering (Kyöstiö et al., 1994; Hörer et al., 1995; Weger et al., 1997; Pereira et al., 1997a).

Einer der limitierenden Schritte zur Expression viraler Sequenzen ist die Einzelstrangkonversion. Experimentell konnte die Zweitstrangsynthese bei rAAVs mit der Induktion der Transgenexpression korreliert werden (Ferrari et al., 1996; Fisher et al., 1996b). Wichtige Effektoren auf die Induktion der Einzelstrangkonversion sind das Adenovirus E4ORF6 Genprodukt und ein zellulärer Faktor FKBP52 (ehemals "single-

D-sequence binding protein"- ssD-BP), stranded der abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus an Tyrosinresten durch die EGF-Rezeptor Tyrosinkinase die D-Seguenz des AAV-2 ITRs bindet und so die Einzelstrangkonversion inhibiert (Qing et al., 1997; Mah et al., 1998). Dabei besitzen das Adenovirus E4ORF6 Protein, Hydroxy-Harnstoff, Kinase-Inhibitoren und die T-Zell Protein Tyrosin Phosphatase (TC-PTP) Einfluß auf den Phosphorylierungsstatus des FKBP52 und damit auf Induktion der Expression bei rekombinanten AAV Vektoren (Ferrari et al., 1996; Yalkinoglu et al. 1988; Yakobson et al., 1987 / '89; Russell et al., 1995; Qing et al., 2003; Zhong et al., 2004), welche in der Regel nicht die AAV-2 Promotoren verwenden und somit nicht der Regulation der Genexpression durch Rep Proteine unterworfen sind.

1.4.4 Kapsidbildung und Enkapsidierung bei AAV-2

Ein assembliertes Kapsid wird aus 60 einzelnen Virionenproteinen aufgebaut (Chapman & Rossmann, 1993) in einem Verhältnis von 8:6:86% für VP1:VP2:VP3 (Hoggan, 1970; Johnson et al., 1971). Die verschiedenen N-terminalen Anteile dieser drei Kapsidproteine sind auf der Innenseite des Kapsids in globulären Strukturen lokalisiert, so daß ein äusserlich homogenes Kapsid mit ikosaedrischer Form gebildet wird (Kronenberg et al., 2001).

Das Kapsidassembly findet im Zellkern statt (Myers & Carter, 1980), wobei die Effizienz der Kapsidbildung mit der Expression der VPs korreliert (Li et al., 1997; Vincent et al., 1997; Wistuba et al., 1997). Die Kapsidproteine bilden zuerst leere Partikel, die in das periphere Nukleoplasma verlagert werden (Wistuba et al., 1997). An diese Partikel lagern sich replizierte, einzelsträngige AAV-2 Genome an, die im 5'-terminalen Bereich mit Rep78 oder Rep68 kovalent verbunden sind und die innerhalb von vier bis acht Stunden in diese Kapside verpackt werden (Myers & Carter, 1980). In dem Modell für die Verpackung viraler Genome in AAV-2 Kapside schaffen Rep Proteinkomplexe als Heterooligomere eine Verbindung zwischen dem assemblierten Kapsid und der viralen DNA und transportieren die virale DNA durch die Helikasefunktion aktiv in das Kapsid (King et al., 2001; Dubielzig et al., 1999). Für eine effiziente und vollständige Verpackung von viralen Genomen werden die kleinen Rep Proteine Rep52 und Rep40 und deren Helikasefunktionen benötigt.

Es wurden mehrere Formen assemblierter Kapside beschrieben, die in einem CsCl-Gradienten unterschiedliche Schwebedichten besitzen. Infektiöse AAV-2 Partikel besitzen eine Schwebedichte von 1,41 und leere Kapside von 1,32. Man findet in einem CsCl-Gradienten außerdem Kapside bei den Dichten 1,45, die eine geringere Ausdehnung und Infektiosität haben und AAV-2 Virionen mit unvollständigem Genom, sogenannte "Defective Interfering Particles", die zwischen 1,32 und 1,41 bandieren (de la Maza & Carter, 1980; Myers & Carter, 1980; Roy et al., 1978).

1.4.5 Der Helfereffekt - Interaktion von AAV-2 mit adenoviralen Proteinen

Als das vermutlich wichtigste adenovirale Protein für einen Helfereffekt auf eine produktive Infektion von AAV-2 wurde ein DNA Einzelstrang-bindendes Protein (DBP) identifiziert, das durch die adenovirale E2A Region codiert wird (Matsushita et al., 1998). Die Anwesenheit von DBP steigert sowohl die adenovirale Transkription als auch die von AAV (Chang et al., 1990) und fördert die Effizienz der Produktion von AAV-2 (Carter et al., 1992; Matsushita et al., 1998). Eine Adenovirusinfektion induziert Replikationszentren im Nukleus, in denen E2A Protein (DBP) bei einer AAV-2 Koinfektion mit den Rep78/68 Proteinen und AAV-2 Genomen kolokalisiert ist (Weitzmann et al., 1996b). Es konnte eine direkte Interaktion der AAV-2 Rep78/68 Proteine mit E2A Protein gezeigt werden, die die Bindung und endonukleolytischen Aktivität der Rep Proteine am viralen Replikationsursprung stimulierte (Stracker et al., 2004).

Das Adenovirus Genprodukt E4ORF6 wurde als ein weiteres wichtiges Protein identifiziert, das einen Helfereffekt vermittelt (Richardson & Westphal, 1981; Ferrari et al., 1996; Fisher et al., 1996b). Die Funktionen des E4ORF6 Genproduktes sind vielfältig. Es interagiert mit dem adenoviralen Protein E1B, wodurch der Transport adenoviraler mRNA (und auch der mRNA von AAV) gefördert wird und die Transkripte zeitlich abgestimmt akkumuliert werden (Samulski & Shenk, 1988; Sarnow et al., 1984). Das E4ORF6 Protein bindet an das Tumorsuppressor Protein p53, wodurch dessen transkriptionelle Transaktivierungsaktivität inhibiert wird und p53 spezifisch degradiert wird (Dobner et al., 1996; Steegenga et al., 1998).

Für die Expression von Transgenen rekombinanter AAV-2 ist die Stimulierung der Zweitstrang-Synthese durch das E4ORF6 Protein von besonderer Bedeutung (Ferrari et al., 1996; Fisher et al., 1996b; Qing et al., 1997). Die Expression dieses Proteins führt zu einer Akkumulation der Zellen in der S-Phase durch die spezifische Degradation von Zyklin A und p53 und zu einer Inhibition der Kinaseaktivität von cdc2 (Grifman et al., 1999). Während p53 keinen Einfluß auf die Stimulierung oder Inhibition der Transduktion von AAV-2 Vektoren besitzt, wirkt die Überexpression von Zyklin A dem Effekt von E4ORF6 Protein entgegen. Außer dem E2A Protein und dem E4 ORF6 Protein wurden weitere adenovirale Genprodukte identifiziert, die einen Helfereffekt vermitteln. Es sind die Produkte der Regionen E1 und VA I/II. E1A Proteine binden eine Erkennungssequenz im P5 Promotor von AAV-2 und stimulieren die Expression der Rep78 und Rep68 Proteine durch eine Interaktion von E1A Protein mit den zellulären Transkriptionsfaktoren "Major Late Transcription Factor" (MLTF) und YY1 (Chang et al., 1989). Indirekt wirken die E1A Proteine durch die Regulation adenoviraler Promotoren und einer Induktion der Expression weiterer Helferfaktoren

(Richardson & Westphal, 1981). Die VA I/II RNA-Moleküle unterstützen die effiziente Translation adenoviraler wie auch AAV mRNAs (Thimmappaya et al., 1982; West et al., 1987; Janik et al., 1989).

1.4.6 Integration

Die Abwesenheit von Helferfunktionen führt zu einer latenten Infektion durch Integration des Genoms, wobei nur geringe Mengen an AAV mRNA oder viraler Proteine gebildet werden und keine Replikation nachweisbar ist (Rose & Kosczot, 1972; Laughlin et al., 1892; Redemann et al., 1989; Antoni et al., 1991; Young et al., 2000). In Zellen, die ein integriertes Genom, ein sogenanntes Provirus, tragen, kann dieses Adenovirusinfektion ausgeschnitten werden und dann einen produktiven Infektionszyklus durchlaufen (Hoggan et al., 1970; Cheung et al., 1980). Eine Integration von AAV-2 wt erfolgt vornehmlich in dem langen Arm des humanen Chromosoms 19 [19q13.3-gter] (Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991). Dieses Sequenzelement auf Chromosom 19 wurde AAVS1 genannt (Kotin et al., 1992). Innerhalb dieser Region existiert eine kurze Sequenzhomologie zum Rep-Bindungselement (RBE) und der terminalen Auflösungsstelle (trs) des AAV-2 ITRs. Es besteht ein wichtiger Unterschied zwischen der Integration von AAV-2 wt und rekombinanten AAV Vektoren in Anwesenheit der großen Rep Proteine Rep78 und Rep68 oder deren Abwesenheit: der offensichtlichste Unterschied ist ein Verlust der gerichteten Integration von Vektoren (Walsh et al., 1992; Kearns et al., 1996). Die Rep78 und Rep68 Proteine sind notwendig für eine gerichtete Integration (Chiorini et al., 1996; Owens et al., 1993; Weitzmann et al., 1994). Vermittelt durch DNA Bindungseigenschaften und Nickaseaktivität der Rep78 und Rep68 Proteine findet eine gerichtete Integration durch nichthomologe Rekombination statt (Chiorini et al., 1996; Linden et al., 1996a/b). In einem Modell zum Mechanismus der gerichteten Integration dient der Rep Protein vermittelte Strangbruch innerhalb der chromosomalen Integrationsstelle als Primer für die DNA-Polymeraseaktivität. Der Polymerasekomplex wird von der chromosomalen DNA auf die virale übertragen, wodurch die erste kovalente Verbindung geschaffen wird (Linden et al., 1996a).

Man beobachtet aber häufig zwei tandemartig angeordnete virale Genome, die nur von einem ITR getrennt werden (Laughlin et al., 1986; McLaughlin et al., 1988). Dies, sowie die Fähigkeit von Vektoren zur Integration in Abwesenheit von Rep Proteinen, werden durch das Modell zur Integration nicht erklärt.

Die Integration von AAV Vektoren zeigt gewisse Übereinstimmungen mit der Integration in Anwesenheit der Rep Proteine Rep78 und Rep68 (Yang et al., 1997). Sie erfolgt zwar nicht gerichtet, jedoch wurden die integrierten Vektoren in einer tandemartigen Anordnung gefunden und es wurden Deletionen und Insertionen von geringer, aber variabler Länge

innerhalb der ITRs und an den Integrationsstellen gefunden. Obwohl bei in vivo Experimenten die Integration von AAV-2 Vektoren erwartungsgemäß nicht in einen bestimmten Genlocus gerichtet war, befanden sich die untersuchten Integrationsstellen präferentiell in aktiven Genen (Nakai et al., 2003; Miller et al., 2004). Im Unterschied zu der Rep Protein vermittelten Integration wird für die Integration der AAV-2 Vektoren angenommen, daß chromosomale Doppelstrangbrüche genutzt werden und diese die Integrationsstellen vorgeben (Miller et al., 2004). Diese chromosomalen Doppelstrangbrüche werden jedoch nicht von den Vektoren erzeugt, so daß die ungerichtete Integration von AAV-2 Vektoren das Risiko von chromosomalen Schädigungen nicht weiter erhöhen, sofern die Integration eines Provirus nicht zur Aktivierung von nahegelegenen Proto-Onkogenen führt. Die Behandlung von Zellen mit genotoxischen Agenzien, die zu chromosomalen Doppelstrangbrüchen führen, erhöht die Integrationsrate in Infektionen mit AAV-2 Vektoren (Alexander et al., 1994; Russell et al., 1995). Das Modell einer Integration durch nichthomologe Rekombination der AAV-2 Vektoren an chromosomalen Doppelstrangbrüchen wird weiterhin unterstrichen durch einen AAV-2 Vektor vermittelten Genaustausch durch homologe Rekombination, ein sogenanntes "Gene Targeting", das durch das Einführen von Doppelstrangbrüchen in das Zielgen in der Effizienz gesteigert werden konnte (Porteus et al., 2003).

Allgemein wird daher angenommen, daß die ITRs die einzigen in *cis* notwendigen Elemente für eine Integration sind und daß die Rep Proteine die Mediatoren für eine gerichtete und effiziente Integration darstellen (Owens et al., 1993; Weitzmann et al., 1994; Chiorini et al., 1996; Yang et al., 1997). Im Gegensatz dazu wurde im Falle einer Rep Protein vermittelten, gerichteten Integration von AAV-2 Vektoren eine 3´-terminale 138 nt lange Sequenz des P5 Promotors, das sogenannte "p5 integration efficiency element" (P5IEE), das sich von den ITRs unterscheidet, als das einzige in *cis* notwendige Element beschrieben (Philpott et al., 2002a/b).

Obwohl die Integration von AAV-2 Vektoren mit deren Fähigkeit zur Langzeitexpression verbunden ist, kann eine stabile Transduktion der Leber und des Skelettmuskels von Mäusen auch durch episomal vorliegende Vektorgenome erzielt werden (Song et al., 2001; Nakai et al., 2001; Song et al., 2004). Die stabil transduzierten Zellen durch episomal vorliegende Vektor DNA stellen sogar den größten Anteil an transduzierten Zellen dar.

1.5 Die autonom replizierenden Parvoviren H-1 Virus und MVMp

H-1 Virus und MVMp sind tierpathogene Parvoviren mit einem Genom von 5176 beziehungsweise 5149 Nukleotiden. Der natürliche Wirt dieser Viren sind Nagetiere. Das

Mausvirus MVMp und das Ratten H-1 Virus sind nah miteinander verwandt. MVMp ist ein Parvovirus Archetypus mit großer Sequenzhomologie zu H-1 Virus im Nichtstrukturprotein 1 (NS1) und hoher Sequenzidentität im Bereich des linken Palindroms mit dem frühen Promotor P4. Viele Untersuchungen, insbesondere die Untersuchung des frühen P4 Promotors, erfolgten an MVMp.

Die autonomen Parvoviren MVMp und H-1 Virus sind in ihrem Lebenszyklus abhängig von zellulären Faktoren der S-Phase (Rhode, 1973; Deleu et al., 1999; Bashir et al., 2000). Sie zeigen einen ausgeprägten Onkotropismus, d.h. eine Replikation und Expression vornehmlich in transformierten Zellen (zur Übersicht siehe Dinsart et al., 1996; Cornelis et al., 2004). In verschiedenen Zellen führt eine H-1 Virusinfektion zum Zelltod durch Apoptose durch Induktion eines Caspase-3-abhängigen apoptotischen Signalweges (Ohshima et al., 1998; Rayet et al., 1998). Da Apoptoseinduktion in U937 Zellen ebenfalls mit rekombinanten H-1 Viren gezeigt werden konnte, in denen die Nukleotidsequenzen der Kapsidproteine (vp) deletiert und durch ein Transgen ersetzt waren, beruht die Apoptoseinduktion auf der Wirkung der Nichtstrukturproteine, vermutlich des NS1 Proteins (Rayet et al., 1998). In anderen Zellen, die mit H-1 Virus infiziert wurden, wurde zwar die Spaltung des nukleären Enzyms Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) als ein Charakteristikum von Apoptose gefunden, allerdings verlief das Absterben der Zellen auf nekrotische Weise (Ran et al., 1999). Eine Infektion mit MVMp oder H-1 Virus kann also in bestimmten Zellen das Absterben durch Apoptose induzieren, doch dies scheint keine notwendige Voraussetzung für die Zellyse und die Vollendung des viralen Lebenszyklus zu sein.

Das NS1 Protein nimmt eine Schlüsselrolle im Lebenszyklus von H-1 Virus bzw. MVMp ein durch Aktivitäten bei der Replikation des viralen Genoms (siehe 1.5.2 Replikation bei autonomen Parvoviren), durch Modulation der Expression von viralen Promotoren (Rhode & Richards, 1987) und auch heterologen Promotoren (Legendre & Rommelaere, 1992; Vanacker & Rommelaere, 1995; Vanacker, 1996), und es beendet den Zyklus der Infektion durch seine zytotoxischen Eigenschaften. Mit dem NS1 Protein konnten verschiedene biochemische Eigenschaften verbunden werden, so eine ATP Bindung, ATPase und Helikase Aktivität (Christensen et al., 1995b; Wilson et al., 1991), Oligomerisierung (Nüesch & Tattersall, 1993; Pujol et al., 1997) und DNA-Bindungs- und Nickase Aktivität (Cotmore et al., 1995; Christensen et al., 1995; Christensen et al., 1997; Cotmore & Tattersall, 1998).

Das Genprodukt NS2 der gespleißten mRNA des 3' ORFs (R2) ist an der Speziesspezifität beteiligt (Naeger et al., 1990; Li & Rhode, 1993). In diesen Wirtszellen ist NS2 unverzichtbar für eine effiziente Replikation, Transkription und die Bildung von Nachkommenviren (Naeger et al., 1990/1993; Cotmore et al., 1997). NS2 interagiert mit Mitgliedern der 14-3-3 Proteinfamilie (Brockhaus et al.,1996). Diese Interaktion scheint im Zusammenhang mit

posttranslationalen Modifikationen von NS2 Protein zu stehen. Eine andere Interaktion von NS2 Protein findet mit dem nukleären Exportfaktor CRM-1 statt (Bodendorf et al., 1999; Ohshima et al., 1999; Lopez-Bueno et al., 2004). Eine Mutation des nukleären Exportsignals in NS2 Protein führt nicht nur zu einer Akkumulation dieses Proteins im Zellkern, sondern auch assemblierte Nachkommenviren werden im Kern zurückgehalten und eine Lyse der infizierten Zellen findet zeitverzögert statt (Eichwald et al., 2002).

1.5.1 Genomische Organisation von MVMp

Das virale Genom des Parvovirus Archetypus MVMp kodiert für die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 in einem 3' gelegenen ORF und für die Strukturproteine VP1 und VP2 im 5' gelegenen ORF (Rhode & Paradiso, 1983) (siehe Abb.5). Für die Synthese der mRNA der Nichtstrukturproteine wird ein früher, sogenannter P4 Promotor verwendet, während die Transkription der mRNA, die zur Bildung der Kapsidproteine führt, vom Promotor P38 initiiert wird. Wie bei AAV-2 geben die Benennungen P4 (m.u.4) und P38 (m.u.38) die Lage der Promotoren in Karteneinheiten an.

Das Nichtstrukturprotein NS1 besitzt bei den autonomen Parvoviren regulatorische Funktionen und ist ein Transaktivator des Promotors P38 für die Expression der Kapsidproteine (Vanacker & Rommelaere, 1995; Lorson et al., 1996/1998; Legendre & Rommelaere, 1994). Eine gespleißte mRNA vom P4 Promotor, bei der das große Intron des 3'ORFs entfernt wird, führt zur Bildung von NS2. Die N-terminalen Anteile der beiden Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 sind identisch, während der C-terminale Anteil von NS2 in einem anderen Leseraster kodiert wird. Die Transkripte R1 und R2 kommen in drei verschiedenen Spleißvarianten vor. Die häufigste benutzt die Spleißdonorsequenz D1 und die Spleißakzeptorsequenz A1 (75%), die seltenere Form ist D2/A2 gespleißt (20%) und bei einer sehr seltenen Spleißvariante werden die Spleißstellen D1/A2 (5%) verwendet (Morgan & Ward, 1986).

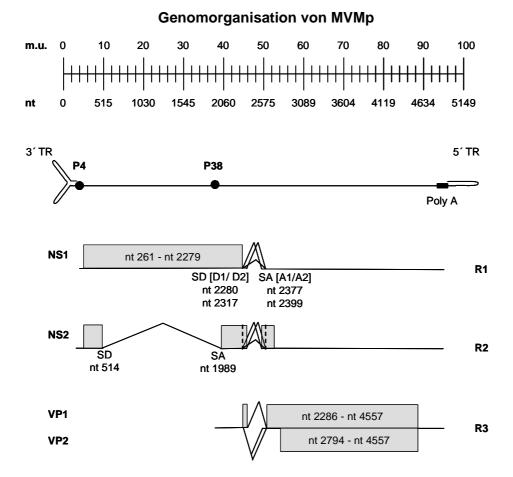


Abb. 5: Genomorganisation von MVMp

Das einzelsträngige Genom von MVMp hat eine Größe von 5149 Nukleotiden und wird von palindromischen Sequenzen flankiert (TR). Die Promotoren erhielten ihre Bezeichnung P4 und P38 durch ihre Position im Genom in "map units" (m.u.). Die Transkripte des P4 Promotors kodieren für die Nichtstrukturproteine des linken ORFs, während der P38 Promotor die Transkription der mRNA der Kapsidproteine kontrolliert. Es werden drei mRNAs transkribiert, die als R1-3 bezeichnet werden. Alle Transkripte werden an einer gemeinsame Poly A Stelle bei m.u. 96 polyadenyliert. Die Transkripte kommen jeweils in drei verschiedenen Spleißvarianten vor. Die herausgespleißten Sequenzen sind durch ein Dach dargestellt. R1 ist die mRNA, die zur Expression von NS1 Protein genutzt wird. In R2 ist das große Intron durch Spleißen entfernt. R2 ist die mRNA, die zur Expression von NS2 Protein führt. Der N-terminale Anteil von NS2 entspricht der Sequenz von NS1 Protein, der C-terminale Anteil wird in einem anderen Leseraster kodiert. Alternatives Spleißen von R3 führt zur Bildung von VP1 Protein oder VP2 Protein. Die Form der TRs deutet an, daß diese in einer gepaarten Sekundärstruktur vorliegen, so daß doppelsträngige DNA Bereiche entstehen. Das 3' TR dient so als Primer der Polymerisationsreaktion bei der Replikation des Genoms. Die Spleißakzeptorstellen und die TRs sind in Größe und Position verzerrt dargestellt, um eine Übersichtlichkeit zu gewährleisten.

Alternatives Spleißen des Transkriptes des 5' ORFs (R3) führt zur Bildung von VP1 und VP2. VP3 entsteht durch Proteolyse von VP2 im assemblierten Kapsid (zur Übersicht siehe Rommelaere & Tattersall, 1990; Berns, 1996).

1.5.2 Replikation bei autonomen Parvoviren

H-1 Virus induziert während einer Infektion nukleäre Strukturen, die als "H-1 parvovirusassociated replication bodies" ("H-1 PAR Bodies") bezeichnet wurden (Cziepluch et al., 2000). In diesen Strukturen ist das virale NS1 Protein mit "proliferating cell nuclear antigen" Protein (PCNA) und dem "small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing" Protein (SGT) kolokalisiert. In diesen "H-1 PAR Bodies" findet die Replikation statt. Die Replikation

1. Einleitung

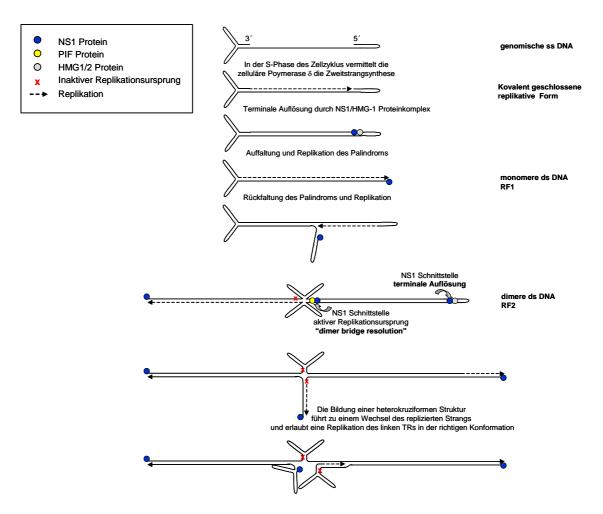


Abb. 6: Replikation bei autonomen Parvoviren

Die Replikation beginnt in der S-Phase des Zellzyklus. An der Zweitstrangsynthese des einzelsträngigen Genoms (genomische ss DNA) ist das NS1 Protein nicht beteiligt. Es wird eine kovalent geschlossenes, doppelsträngiges Genom gebildet, das durch NS1Protein in Interaktion mit HMG-1 in einer terminalen Auflösungsreaktion geöffnet wird. Das rechte Palindrom wird in einer Strangverdrängungsreaktion repliziert und bildet die monomere doppelstrang DNA (monomere ds DNA; Replikative Form 1 "RF1"). Die Palindrome falten sich zurück und die Replikation schreitet bis zur dimeren ds DNA (RF2) fort. Für die Auflösung der Konkatemere werden an den Termini unterschiedliche Mechansimen verwendet. Eine rechtes Palindrom, das eine kovalente Verbindung schafft, wird in einer Art geschnitten, die als terminale Auflösung (terminal resolution) bezeichnet wird. Durch die terminale Auflösung und Replikation wird das Palindrom auf den anderen Strang übertragen. Linke Palindrome, die durch die Replikation in einer dimeren doppelsträngigen Art vorliegen und eine sogenannte "dimer bridge" bilden, werden durch einen anderen Mechanismus repliziert, um das linke TR in der `Flip`Konformation zu erhalten. Das Dinukleotid der Blase (siehe Text und Abb. 1.6) erlaubt nur auf einer Seite die Interaktion zwischen NS1 Protein und PIF Protein. Nach dem Einführen eines Einzelstrangbruchs durch NS1 Protein bildet sich eine heterokruziforme Struktur der komplementären linken TRs. Der Polymerasekomplex wird auf den anderen Strang übertragen und das linke TR in 'Flop' Konformation wird repliziert. Die beiden TRs falten sich wieder zurück und die Polymerisation schreitet am "eigenen" Strang fort. Es entsteht so ein doppelsträngiges Genom (RF1) mit dem linken TR in der 'Flip'Konformation.

autonom replizierender Parvoviren verläuft über eine Folge von doppelsträngigen, konkatemeren Intermediaten nach einem unidirektionalen, rollenden Haarnadel Mechanismus (Cotmore & Tattersall, 1995). Die Replikation beginnt in der S-Phase des Zellzyklus und wird durch die zelluläre Polymerase δ vermittelt (Bashir et al., 2000). Die doppelsträngige Struktur des linken 3' Palindroms dient als Replikationsstartpunkt (Abb.6). Die doppelsträngige monomere Form des Genoms wird durch HMG-1 Protein und NS1 Protein gebunden und durch die endonukleolytische Aktivität von NS1 Protein gespalten (Cotmore et al., 2000). Durch die Helikaseaktivität von NS1 Protein wird das rechte Palindrom entwunden und durch die zelluläre Polymerase repliziert. So wird eine monomere doppelsträngige Form gebildet, die kovalent über das linke TR verbunden ist (Cotmore &

Tattersall, 1995). Durch Rückfaltung des rechten TRs und anhaltende Replikation werden doppelsträngige Konkatemere höherer Form gebildet (dimere doppelsträngige replikative Form; RF2). Dabei werden die kodierenden Sequenzen häufiger repliziert als die palindromischen. Diese müssen bei der Auflösung der Strukturen ergänzt werden, da sie die cis-Elemente für die Verpackung sind (Rommelaere & Tattersall, 1990). Nickaseaktivität von NS1 werden die Konkatemere nach unterschiedlichen Mechanismen aufgelöst (Cotmore & Tattersall, 1995). Die terminalen Palindrome können grundsätzlich in verschiedenen Orientierungen vorliegen, in der 'Flip' oder in der 'Flop' Konfiguration. Beide Konfigurationen der 5'-Palindrome (rechtes TR) werden in Nachkommenviren verpackt. Das 3'-Palindrom (linkes TR) wird in vivo – anders als bei AAV-2 - nur in 'Flip' Konfiguration beobachtet. Doppelsträngige Replikationsintermediate, die durch ein 5'-Palindrom kovalent verbunden sind, werden durch einen Mechanismus aufgelöst, den man als terminale Auflösung ("terminal resolution") bezeichnet. Dabei bindet das NS1 Protein zusammen mit einem "High Mobility Group Protein 1/2" (HMG 1/2) an seine Erkennungsseguenz [ACCA]₂₋₃ und führt einen Einzelstrangbruch innerhalb der Nick Konsensus-Sequenz 5'-CTWWTCA-3' ein (Cotmore et al., 1995; Cotmore & Tattersall, 1998; Nüesch et al., 1995). Es findet eine Umesterung statt, die das 5'-Phosphat der Nukleotidkette kovalent mit der aromatischen Hydroxylgruppe eines Tyrosinrestes von NS1 verbindet (Nüesch et al., 1995). Als Konsequenz bleibt das NS1 Protein mit dem 5'-Ende des Nukleotidstranges verbunden, der nun durch DNA-Neusynthese vom freien 3'-OH aus verdrängt wird. Hierbei ist das Palindrom auf den kodogenen (-)-Strang übertragen worden und wird am (+)-Strang neusynthetisiert. Die Konfigurationen `Flip´ und `Flop´ des rechten 5'-Palindroms besitzen in vivo die gleiche Häufigkeit. Dieser Mechanismus der terminalen Auflösung ist derjenigen bei der AAV Replikation analog und dort der einzige.

Die Konkatemere autonom replizierender Parvoviren werden am genomischen 3'-Ende durch einen "dimer bridge resolution" Mechanismus aufgelöst, der die Termini kodogener Sequenzen in nur einer Konfiguration entstehen läßt (Astell et al., 1983a; Cotmore & Tattersall, 2003). Genetische Grundlage für diese Restriktion ist bei MVMp und H-1 Virus eine Asymmetrie im Stamm des linken Palindroms, ein Dinukleotid, dem ein Triplett gegenübersteht (GA/GAA) (Astell et al., 1983a/b/1985; Cotmore & Tattersall, 1994). Durch diese Asymmetrie liegen diese Nukleotide im Palindrom ungepaart vor, so daß man dieser Stelle den anschaulichen Namen "Blase" gegeben hat (Abb.7). Der Teil der "Blase", der nur zwei Nukleotide enthält, stellt den aktiven Replikationsursprung dar. Führt man ein drittes Nukleotid in dieser "Blase" ein, verliert der Replikationsursprung seine Aktivität und das Palindrom wird nicht repliziert. Da auf dem quasikomplementären Teil der "Blase" das Triplett GAA gegeben ist, hat der Replikationsursprung in der replizierten Form eine Orientierung.

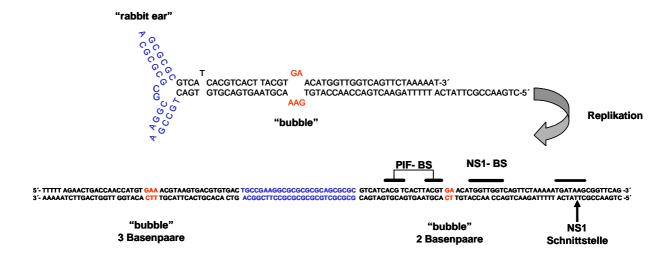


Abb. 7 Linkes Palindrom von MVMp

Der obere Teil der Abbildung zeigt das linke Palindrom von MVMp in der genomischen "rabbit ear" Konformation. Dieses Palindrom enthält einen ungepaarten Bereich, der als Blase ("bubble") bezeichnet wird. Während der Replikation entstehen Konkatemere, bei denen das linke TR doppelsträngig in der "dimer bridge" Konformation vorliegt (unterer Teil der Abbildung). In dieser Form dient die ehemalige "bubble" Sequenz als Abstandhalter zwischen den Proteinen NS1 und PIF. Nur auf der Seite des Palindroms, das die zwei Nukleotide der ehemaligen "bubble" Sequenz enthält, können diese Proteine interagieren. Diese Asymmetrie verleiht dem replizierten linken Palindrom eine Orientierung. Der Einzelstrangbruch durch NS1 Protein, der zur Auflösung des Konkatemers benötigt wird, findet nur auf der einen Seite des linken Palindroms statt.

Die aktuelle Sequenz der Blase ist von untergeordneter Bedeutung, da sie nicht Teil einer Bindesequenz ist. Ein doppelsträngiges, dimeres 3'-Palindrom stellt die Vorläufer der Palindrome in 'Flip' und der komplementäre Strang in 'Flop' dar. Es trägt zwei Nickstellen für NS1, jeweils eine auf einem Strang. Aber nur die Seite mit dem replizierten GA/TC Paar wird durch NS1 endonukleolytisch geschnitten und dient als aktiver Startpunkt der Replikation (Cotmore & Tattersall, 1994). Durch die Ausbildung einer heterokruziformen Struktur der Palindrome wird der Polymerasekomplex auf den anderen Strang übertragen (Cotmore & Tattersall, 2003). So wird das linke TR, das in `Flop` Orientierung vorliegt, kopiert und ein Replikat in der `Flip` Orientierung wird erzeugt. Nach der Rückfaltung der TRs verläuft die Replikation am "eigenen" Strang zurück. Somit wird durch den Mechanismus der "dimer bridge resolution" nur eine Sorte von linken Palindromen in der richtigen Konformation produziert. Für die spezifische Interaktion des NS1 Proteins am linken Origin ist ein zellulärer 110 kD Proteinfaktor erforderlich, der als "parvovirus initiation factor" (PIF) bezeichnet wird (Christensen et al., 1997). Diese Interaktion verläuft über zwei ACGT Bindesequenzen, die durch fünf Nukleotide inklusive des Dinukleotids GA/TC der ehemaligen "Blase" von der NS1 Bindestelle getrennt sind. PIF kann so mit NS1 in Kontakt treten, und dadurch erlangt NS1 Protein seine spezifische endonukleolytische Aktivität.

1.5.3 Regulation der Genexpression bei autonomen Parvoviren

Die Expression der viralen Gene erfolgt von der doppelsträngigen replikativen Form des viralen Genoms. Als Primärtranskripte werden die mRNAs R1 und R2 für NS1 Protein und NS2 Protein vom P4 Promotor initiiert. NS2 ist das Produkt der NS1 RNA, deren zentraler Bereich durch eine Spleißreaktion entfernt wurde. NS2 enthält den N-Terminus des NS1 Proteins. Der C-Terminus wird in einem anderen ORF kodiert (Cotmore & Tattersall, 1986a). Es konnte gezeigt werden, daß eine Zellyse durch NS1 in verstärktem Maße in transformierten Zellen gegenüber (vs.) nicht-transformierten Zellen geschieht (Salome et al., 1990; Mousset et al., 1994). Diese Onkolyse ist zumindest teilweise Ausdruck einer verstärkten Akkumulation von NS1 in transformierten Zellen, das heißt einer verstärkten Transkription vom P4 Promotor bei c-Ha-ras transformierten Zellen (Spegelaere et al., 1991). Bei MVM wurden mehrere cis regulatorische P4 Promotorelemente gefunden, namentlich zwei CRE-Sequenzelemente ("cAMP response element"), ein Element mit EBS Homologie ("Ets transcription factor-binding site), eine konstitutive E-Box, die sich teilweise mit einer Y-Box (Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor NF-Y) überschneidet und eine E2F-Bindestelle direkt stromaufwärts von den essentiellen GC- und TATA-Boxen (Faisst et al., 1994; Gu et al., 1995; Perros et al., 1995; Fuks et al., 1996; Deleu et al., 1997).

Es wirken verschiedene Transkriptionsfaktoren bei der Regulation des MVMp P4 Promotors, wie USF in Interaktion mit der E-Box (Gu et al., 1995), SP1 durch DNA-Bindung der Erkennungssequenzen der GC-Box (Ahn et al., 1989; Pitluk et al., 1991) und ein TATA-Box Bindeprotein.

Von CRE und CRE-ähnlichen Sequenzen wird vermutet, daß sie Steuerelemente für die Modulation der Transkription sein können, die durch Ras induziert wird (Galien et al., 1991; Kedar et al., 1990/'91). Mitglieder aus der ATF/CREB Familie besitzen eine DNA-Bindungsdomäne, ein Leucin-Zipper-Motiv und Transaktivierungs-Aktivität (Habener et al., 1990). Die CRE-Sequenz im P4 Promotor wurde als ein Element beschrieben, das die Initiation der Transkritpion in c-Ha-ras transformierten FREJ4 im Vergleich zu parentalen FR3T3 Zellen, aber auch anderen Ras transformierten Zellen, verstärkt (Perros et al., 1995). Dabei wird ein Unterschied in den CRE-bindenden Proteinen indirekt durch aktiviertes Ras Protein über eine Aktivierung der Proteinkinase C und daraus resultierender Inhibition der Proteinkinase A vermittelt. Dieser Unterschied manifestiert sich in der Bindung eines anderen oder eines veränderten Proteins an das CRE-Element und in einer verstärkten Aktivierung des P4 Promotors in c-Ha-Ras transformierten Zellen. Darüberhinaus vermitteln die CRE-Elemente die Repression des P4 Promotors in kontaktinhibierten Zellen und tragen zur Promotoraktivierung zu Beginn der S-Phase bei (Deleu et al., 1999).

An der "Ets transcription factor-binding site" (EBS) wurde die Bindung eines Mitglieds der Ets-Familie gezeigt. Mitglieder der Ets-Familie sind Transkriptionsfaktoren mit einer konservierten DNA bindenden Domäne aus zwei α -Helices mit basischen Eigenschaften (Wasylyk et al., 1993). Die Transkriptionsfaktoren SP1 und Ets-1 transaktivieren den P4 Promotor synergistisch (Fuks et al., 1996). EBS Motive wurden als Mediatoren in der Promotoraktivierung durch Onkoproteine wie c-Ha-Ras, v-Src und v-Mos gefunden, die eine Ets-DNA-Bindung forcieren (Coffer et al., 1994; Pankov et al., 1994; Wasylyk et al., 1989). In parentalen Ratten Fibroblasten besitzt das EBS-Element untergeordnete Rolle für die Promotoraktivität, während eine Ko-Transfektion mit einem für das Onkogen c-Ha-ras kodierenden Expressionsplasmid zu einer vierfachen Steigerung der Aktivität führte, die zum Teil durch die EBS vermittelt wurde (Fuks et al., 1996).

Die Kombination aus E- und Y-Box, deren Erkennungssequenzen gemeinsame Nukleotide beinhalten, führt zu einer exklusiven Bindung entweder des Transkriptionsfaktors USF an der E-Box oder des Transkriptionsfaktors NF-Y an der Y-Box (Gu et al., 1995). Während Mutationen in der E-Box keinen Effekt auf die Promotorstärke hatten, wurde die Expression durch Mutation in der Y-Box auf 40% reduziert. Eine Beteiligung an der Aktivierung des P4 Promotors in NB-E Zellen, SV40 transformierten Zellen, wurde durch die Y-Box vermittelt (Gu et al., 1995).

Die Bindungsstelle für E2F, einem Zellzyklus-regulierten Transkriptionsfaktor der S-Phase, ist bei den autonomen Parvoviren eine wichtige molekulare Grundlage der Abhängigkeit von der S-Phase bezüglich der Expression und der dadurch bedingten NS1 Protein abhängigen Replikation (Deleu et al., 1999). Während der G₁ Phase des Zellzyklus bindet E2F im Komplex mit p130, einem Mitglied der Retinoblastomfamilie, an die E2F Bindungsstelle (Deleu et al., 1998). In der S-Phase liegen die Mitglieder der Retinoblastomfamilie phosphoryliert vor und entlassen so E2F aus der inaktivierenden Bindung, so daß die E2F Interaktion mit der Sequenz des P4 Promotors aktivierend wirkt. Diese E2F Bindungsstelle ist für die P4 Promotoraktivität essentiell.

Diese Promotorelemente, die EBS zusammen mit der CRE-Sequenz und der Y-Box, sind die transkriptionsregulatorische Grundlage für die verstärkte Akkumulation von NS1 Protein in Ha-Ras oder SV40 transformierten Zellen durch erhöhte P4 Promotoraktivität (Fuks et al., 1996; Gu et al., 1995; Perros et al., 1995).

NS1 besitzt neben der für die Replikation wichtigen Aktivitäten eine Transaktivierungsaktivität auf den P38 Promotor über eine Region, die als Transaktivierungs-responsives Element (tar) bezeichnet wird (Rhode & Richard, 1987). Der P38 Promotor von MVMp und H-1 Virus benötigt für vollständige Aktivität die tar-Region mit einer Bindungsstelle für NS1, eine GC-Box und eine TATA-Box (Rhode & Richard, 1987; Pitluk & Ward, 1991; Lorson et

al., 1998). Für die Transaktivierung des P38 Promotors findet eine direkte Interaktion zwischen NS1 Protein und SP1 statt (Krady et al., 1995).

1.6 Onkotropismus und Onkolyse der autonomen Parvoviren MVMp und H-1 Virus

H-1 Virus vermittelt einen als Onkosuppression bezeichneten Effekt, wobei eine Infektion die Bildung spontaner Tumoren *in vivo* verhindert (Toolan, 1967), aber auch die Bildung von Tumoren, die durch transformierende Viren oder chemische Karzinogene induziert wurden, unterdrückt werden (Toolan & Ledinko, 1968; Bergs, 1969; Toolan et al., 1982). Transplantierte Tumoren werden nach einer H-1 Virusinfektion in ihrem Wachstum verlangsamt oder zerstört, und eine Koloniebildung *in vitro* wird verhindert (Dupressoir et al., 1989). Dieser Effekt der Onkosuppression der autonom replizierenden Parvoviren MVMp bzw. H-1 Virus begründet sich durch deren onkotropen und onkolytischen Eigenschaften, das heißt deren vornehmliche Replikation in transformierten Zellen (Onkotropismus) und der Zerstörung dieser Zellen (Onkolyse).

Eine Transformation von parentalen Zellen mit bestimmten Onkogenen wie c-Ha-ras oder transformierenden Viren wie SV40 macht diese Zellen permissiv für eine lytische Infektion mit H-1 Virus bzw. MVMp (Cornelis et al., 1988a/b; Salome et al., 1989/90), aber nicht jede neoplastische Transformation bewirkt diese Sensitivierung (Salome et al., 1990). Es konnte für H-1 Virus und MVMp gezeigt werden, daß die Lethalität infizierter Zellen mit der Transkriptionsaktivität korreliert (Cornelis et al., 1990). Das NS1 Protein besitzt aufgrund der Zytotoxizität eine zentrale Bedeutung für die Onkolyse (Vanacker & Rommelaere, 1995). Für die Toxizität des NS1 Proteins aus MVMp sind zwei Faktoren ursächlich, nämlich eine gesteigerte Expression von NS1 Protein in transformierten Zellen und eine Verstärkung des toxischen Effektes durch Transformation (van Hille et al., 1989; Mousset et al., 1994). Die Stimulierung der Expression vom P4 Promotor, der die Expression von NS1 Protein kontrolliert, in Ha-Ras oder SV40 transformierten Zellen ist vorangehend beschrieben (siehe 1.5.3 Regulation der Genexpression bei autonomen Parvoviren). Die Regulation der Toxizität von NS1 und die Vermittlung der zytotoxischen Aktivität präferentiell in transformierten Zellen ist noch nicht bis ins Detail geklärt. NS1 wird während einer Infektion phosphoryliert (Cotmore & Tattersall, 1986b), und der Phosphorylierungszustand ist mit einer Aktivitätsänderung dieses multifunktionellen Proteins verbunden (Nüesch et al., 1998a/b). In synchronisierten Zellen konnten Phosphorylierungsmuster an Serin- und Threoninresten verschiedenen Infektionsstadien zugeordnet werden. NS1 Protein wird also posttranslational durch Phosphorylierungen durch die Proteinkinase C Isoformen PKCλ und PKCη modifiziert und so in den Aktivitäten reguliert (Corbau et al., 1999; Nüesch et al., 2003; Lachmann et al.,

2003). Die Toxizität als eine Funktion dieses Proteins kann durch Mutationen an Phosphorylierungsstellen moduliert werden (Daeffler et al., 2003).

1.7 Der Einfluß einer Infektion mit Parvoviren auf den Zellzyklus

Sowohl für AAV-2 als auch für MVMp wurde eine Einfluß einer Infektion auf den Zellzyklus beschrieben. Es besteht ein Unterschied in dem Effekt, den eine Infektion mit infektiösem Virus auf den Zellzyklus ausübt, oder ob inaktivierte Viren oder nur Komponenten der Viren in ihrem Einfluß auf den Zellzyklus untersucht werden.

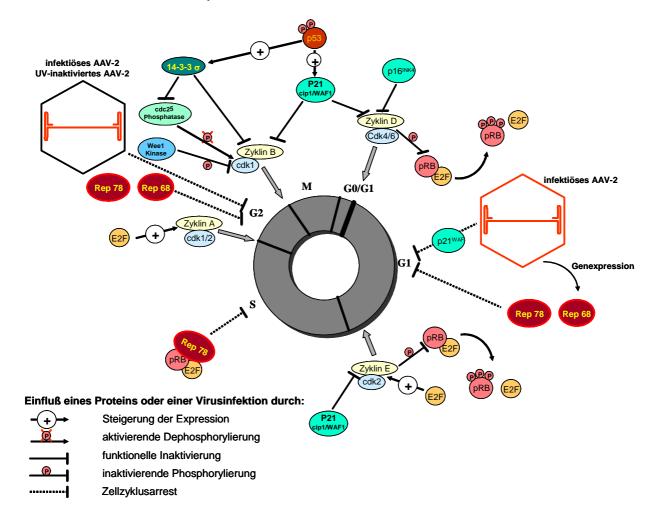


Abb. 8: Der Einfluß einer Infektion mit AAV-2 oder einzelner Komponenten davon auf den Zellzyklus

Eine Infektion mit AAV-2 führt in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu einem Arrest. Dabei üben die einzelnen Komponenten dieses Virus, nämlich die Nichtstrukturproteine Rep78/68 oder die einzelsträngige genomische DNA, unterschiedliche Einflüße auf den Zellzyklus aus. Eine detailliertere Beschreibung dieser Übersichtsskizze ist im Text gegeben.

Im Falle von AAV-2 (Abb.8) wurde beschrieben, daß eine Infektion primäre Zellen im Zellzyklus in G_0/G_1 und in G_2/M arretiert und dieser Arrest durch $p21^{CIP1}$, einem Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen, vermittelt wurde (Bantel-Schaal et al., 1992; Hermanns et al., 1997). Die Aktivierung von $p21^{CIP1}$ führte zu einer Hypophosphorylierung der Proteine der Retinoblastomfamilie pRB, p107 und p130. In dieser Form binden diese Proteine E2F, einen

S-Phase spezifischen Transkriptionsfaktor, und inhibieren so die Transkription von kritischen Genen, die für den Fortlauf des Zellzyklus benötigt werden (Chellappan et al., 1991; Weinberg, 1995). Das Protein p21^{CIP1} besitzt einen regulatorischen Einfluß sowohl auf den G₁/S Übergang als auch den G₂/M Übergang des Zellzyklus (Niculescu et al., 1998). In transformierten Zellen führte eine AAV-2 Infektion zu einer veränderten Proliferation oder einem Wachstumsarrest (Winocour et al., 1988; Bantel-Schaal et al., 1990). In einer Reihe von transformierten Zellinien war eine Infektion mit UV-bestrahlten und dadurch transkriptionell inaktivierten AAV-2 ursächlich für einen Wachstumsarrest in G₂/M (Raj et al., 2001). In Abhängigkeit vom Status des Tumorsuppressor-Proteins p53 dieser Zellen war der Arrest reversibel (p53 wt) oder endete mit dem Absterben der Zellen (p53-/- oder transdominant negatives p53), vermutlich nach einer versuchten Mitose und daraus resultierender chromosomaler Katastrophe. Da in diesen Infektionen keine viralen Proteine exprimiert wurden und Infektionen mit bestrahlten leeren Kapsiden diesen Effekt nicht erzielten, wurde die einzelsträngige virale DNA mit doppelsträngigen terminalen Palindromen als Induktor für die zelluläre Antwort verantwortlich gemacht, wie sie nach einer DNA-Schädigung entsteht. Die Expression der Rep Proteine unabhängig von einer Infektion mit AAV-2 Virionen bewirkt alternative Effekte auf den Zellzyklus. Während die Rep Proteine Rep52/40 keinen Einfluß auf den Zellzyklus ausüben, vermitteln die Rep Proteine Rep78 und Rep68 einen Arrest in verschiedenen Phasen des Zellzyklus (Saudan et al., 2000). Die Anwesenheit von Rep68 Protein führt zu einem Arrest in G₁ und G₂ des Zellzyklus und zu einer Akkumulation der Zellen in G₂/M. Die Expression von Rep78 Protein führt zusätzlich zu einem Arrest in der S-Phase, der durch hypophosphoryliertes pRB vermittelt wird. Rep78 Protein besitzt die Fähigkeit, an E2F-1 zu binden und so den pRB-E2F-1 Proteinkomplex zu stabilisieren (Batchu et al., 2001). Eine direkte Interaktion zwischen Rep Proteinen und pRB findet jedoch nicht statt (Batchu et al., 2002). Weiterhin besitzt Rep78 Protein die Fähigkeit, p53 zu binden und auf diese Art vor einer Degradation durch das Proteasom zu schützen, wie es bei einer Adenovirus Infektion durch das E1B Protein induziert wird (Batchu et al., 1999). Andererseits wurde aber auch die Induktion von Apoptose durch Rep78 Protein durch die Aktivierung der Caspase-3, unabhängig vom p53 Status der Zellen, beschrieben (Schmidt et al., 2000). Die Apoptose fand in diesen Zellen in G₁ und der frühen S-Phase des Zellzyklus statt. Als Domänen, die bei der Induktion der Apoptose durch Rep78 Protein teilhatten, wurden die DNA-Bindungsdomäne und die ATPase/Helikase Domäne durch Mutationsanalysen identifiziert.

In einer Infektion mit MVMp wird in der S-Phase die Zweitstrangsynthese initiiert (Bashir et al., 2000). Diese Zweitstrangsynthese ist abhängig von der Aktivität von Zyklin A und wird durch die zelluläre Polymerase δ vermittelt. Eine Infektion mit MVMp arretiert Zellen vor einer Zellyse in G_1 , in der S-Phase und in G_2 (Op de Beeck et al., 1995/2001) (siehe Abb.9).

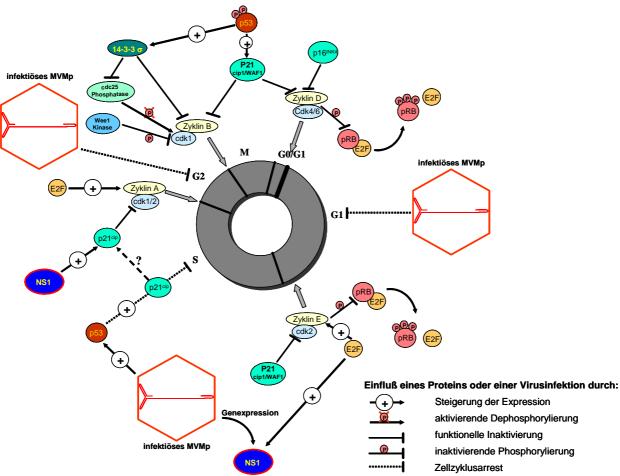


Abb. 9: Der Einfluß einer Infektion mit MVMp oder NS1 Protein auf den Zellzyklus
Eine Infektion mit MVMp führt in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu einem Arrest. Dabei übt das Nichtstrukturprotein NS1 einen differentiellen Einfluß auf den Zellzyklus aus, nämlich einen p21^{CIP} vermittelten Arrest in G₂, gegenüber einer Infektion mit MVMp, die zu einem p53 vermittelten Arrest in S und G₂ führt. Gezeigt sind auch die Einflüße, die E2F auf eine Infektion mit MVMp ausübt durch die Stimulation der Expression von Zyklin A einerseits und der Expression vom P4 Promotor andererseits, die zur Expression von NS1 Protein führt. Eine detailliertere Beschreibung dieser Übersichtsskizze ist im Text gegeben.

Dieser Arrest wird durch p53 und p21^{CIP} vermittelt. p21^{CIP} kann p53-abhängig akkumulieren, wie nach einer γ -Bestrahlung, oder p53-unabhängig durch andere Stimuli wie Zytokine oder Differenzierungsereignisse induziert werden (El-Deiry et al., 1994; MacLeod et al., 1995). Die Akkumulation und inhibitorische Aktivität von p21^{CIP} kann den Zellzyklus in G_1 und auch in G_2 arretieren (Niculescu et al., 1998). Bei einer Infektion mit MVMp wird der Zellzyklusarrest in der S-Phase durch p53 vermittelt, während die Expression von NS1 Protein unabhängig von einer Infektion zu einem p21^{CIP} vermittelten Arrest der Zellen beim G_2 /M Übergang führt (Op de Beeck et al., 2001).

1.8 Gentherapie mit viralen Vektoren

In der viralen Gentherapie wird versucht, die Strategien von Viren auszunutzen, um Fremdgene effizient in Zellen einzuschleusen und dort zu exprimieren. Diese genetisch

veränderten Viren werden daher als virale Vektoren bezeichnet. Die Verwendung von viralen Vektoren kann sehr verschiedene Ziele verfolgen, wie (a) die Expression eines Gens zur Substitution eines defekten, körpereigenen Proteins, (b) die Expression eines Gens zur Vakzinierung gegen Proteine von Pathogenen, (c) die Korrektur eines Gens durch Austausch der mutierten Sequenz gegen die nicht-mutierte Sequenz, ein sogenanntes "Gene Targeting" oder (d) die Expression von Fremdgenen zur Behandlung von Erkrankungen. Diese verschiedenen Therapieziele stellen unterschiedliche Ansprüche an die Eigenschaften der Vektorsysteme. Im Folgenden sollen die etablierten Vektorsysteme vorgestellt werden mit einem besonderen Schwerpunkt für eine Behandlung von Krebserkrankungen mit viralen Vektoren. Dafür werden die Vektorsysteme beschrieben, die sich von Murine Leukemia Virus und Humanem Immundefizienz Virus, Vesicular Stomatitis Virus, Adenovirus, Herpes Simplex Virus und Adeno Assoziiertem Virus ableiten.

Alternativ zur Nutzung von viralen Vektoren wurden auch natürlich vorkommende oder attenuierte Viren für eine Virotherapie gegen Krebserkrankungen beschrieben und verwendet, wie z.B. Newcastle Desease Virus oder Reovirus (Russell et al., 2002; Pecora et al., 2002; Coffey et al., 1998). Humanes Reovirus ist ein doppelsträngiges RNA Virus, das als zellulären Rezeptor Sialinsäure verwendet und somit ein weites Spektrum von Zellen infizieren kann (zur Übersicht siehe Coffey et al., 1998). Normale, nicht transformierte Zellen sind für eine lytische Infektion mit Reoviren nur wenig permissiv, während transformierte Zellen mit aktiviertem Ha-Ras Signaltransduktionsweg effizient lysiert werden (Strong et al., 1998). Somit vermitteln Reoviren in bestimmten transformierten Zellen einen onkolytischen Effekt.

1.8.1 Virale Vektoren in der Gentherapie

Die meisten der retroviralen Vektoren, die in klinischen Tests erprobt werden, basieren auf Murine Leukemia Virus (MLV) (zur Übersicht siehe Robbins & Ghivizzani, 1998; Blesch, 2004). Vektoren, die sich von MLV ableiten, besitzen eine Verpackungskapazität von 8 kb, wenn die kodierenden Sequenzen gag, env und pol entfernt und für eine Vektorproduktion in stehen trans komplementiert werden (Anderson, 1998). Es verschiedene Verpackungszellinien zur Verfügung, mit denen Titer von 10⁶-10⁷ "colony forming units"/ml erzielt werden können (Robbins & Ghivizzani, 1998; Blesch, 2004). Die Verwendung von env Proteinen anderer Viren in Präparationen von MLV Vektoren, wie das Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus, vermittelt einen anderen Tropismus (siehe 1.8.2 Targeting von viralen Vektoren) und stabilisiert diese Vektoren, so daß sie konzentriert werden können (Burns et al., 1993). In Infektionen mit retroviralen Vektoren wird nach der reversen Transkription des viralen Genoms die entstandene dsDNA in die chromosomale DNA

integriert. Dafür benötigen diese Viren und abgeleitete Vektoren den Zusammenbruch der Kernmembran während der Mitose. Retrovirale Vektoren, die sich von MLVs ableiten, können also nur teilungsaktive Zellen infizieren (Miller et al., 1990). Integrierte virale Sequenzen bleiben in den transduzierten Zellen erhalten, doch stellt die Inaktivierung der Genexpression ein Problem für Therapien dar, die eine langfristige Expression benötigen. Ein weiteres Problem in der Verwendung dieser Vektoren besteht in der zufälligen Integration in die chromosomale DNA, wodurch Proto-Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene inaktiviert werden können (Verma & Somia, 1997). Obwohl die Wahrscheinlichkeit für ein solches Ereignis für gering erachtet wurde, entwickelten zwei von zehn Patienten einer klinischen Studie eine T-Zell Leukämie nach einer Gentherapie mit retroviralen Vektoren gegen die X-chromosomal vererbte schwere kombinierte Immundefizienz (SCID) (McCormack et al., 2004).

Das Risiko der Entstehung von replikationskompetenten, Wildtyp-ähnlichen Viren in Vektorproduktionen wurde durch Produktionstechniken minimiert, bei denen die viralen Gensequenzen auf verschiedene Plasmide verteilt wurden und nur geringe Homologien zwischen der Sequenz der Vektoren und der viralen Gene existieren. Weiterhin wurden Vektoren entwickelt, die eine Deletion im 3´-LTR tragen, sogenannte selbst-inaktivierende Vektoren (sin Vektoren) (Yee et al., 1987; Yu et al., 1986).

Eine besondere Gruppe unter den retroviralen Vektoren stellen die Vektoren dar, die sich von Lentiviren, wie z.B. dem Humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) ableiten. Neben den herkömmlichen retroviralen Genen *gag*, *pol* und *env* kodieren Lentiviren zusätzlich für die regulatorischen Proteine Tat und Rev und für die akzessorischen Proteine Vpr, Vpu, Vif und Nef. Für die Produktion von VSV-G pseudotypisierten, lentiviralen sin-Vektoren ist nur Rev Protein zusätzlich in *trans* erforderlich, das den Transport ungespleißter RNA ins Zytoplasma und die effiziente Expression von Gag und Pol Protein bewirkt (Dull et al., 1998). Die revers transkribierte DNA lentiviraler Vektoren kann durch die Kernporen transportiert werden. Daher sind diese Vektoren in ihrer Transduktion nicht auf proliferierende Zellen beschränkt. Lentivirale Vektoren besitzen eine Kapazität von 8 kb für Fremdgene und können mit Titern von 10⁹-10¹⁰ transduzierenden Einheiten pro ml produziert werden (Blesch, 2004)

Vesicular Stomatitis Virus (VSV) ist ein behülltes Virus mit einem RNA Genom (zur Übersicht siehe Lichty et al., 2004). Das virale Genom liegt als 11 kb große, nichtsegmentierte, einzelsträngige RNA mit Negativstrangorientierung vor. Die Replikation findet im Zytoplasma statt. VSV ist ein Pathogen für Nagetiere, Kühe, Schweine und Pferde, aber auch menschliche Zellen können mit VSV infiziert werden. VSV Infektionen verlaufen beim Menschen meist asymptomatisch oder mit milden, erkältungsähnlichen Symptomen. Abgesehen von Gebieten, in denen VSV endemisch ist, wie Georgia/USA und Zentralamerika, ist die Seroprävalenz in der menschlichen Bevölkerung sehr gering. Daher

ist das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern, das die Effizienz einer Therapie mit VSV Vektoren beeinträchtigen könnte, nicht zu erwarten. Die Verpackungskapazität von VSV Vektoren für Fremdgene beträgt 4,5 kb. VSV Vektoren wurden als Vakzinierungsvektoren gegen verschiedene humanpathogene Viren entwickelt, so z.B. gegen Influenza Hämagglutinin-Antigen (HA), Masernvirus HA, HIV Hüllprotein-Antigen, Hepatitis C Antigene und filovirale Glykoprotein-Antigene (Roberts et al., 1998; Schlereth et al., 2000; Rose et al., 2000; Ezelle et al., 2002; Garbutt et al., 2004).

In Infektionen mit VSV wird die zelluläre Translation unterbunden, indem das VSV Matrixprotein mit einem zellulären Kernporenprotein, Nup98, interagiert und den Export von mRNAs ins Zytoplasma verhindert. Dieser Mechanismus ist empfindlich gegenüber Interferon β. Da Tumorzellen häufig unempfindlich gegenüber Interferonbehandlungen sind (Grander et al., 1998), zeigen diese Tumorzellen keine antivirale Antwort und bieten ein gutes intrazelluläres Umfeld für VSV Infektionen. Daher vermittelt VSV in Infektionen von Tumorgewebe einen onkolytischen Effekt. Um diesen Onkotropismus zu verstärken, wurden verschiedene rekombinante VSV Vektoren hergestellt (s. 1.8.2 Targeting von viralen Vektoren).

Adenoviren sind DNA Viren mit einem doppelsträngigen Genom von 36 kbp (zur Übersicht siehe Lai et al., 2002). Adenovirale Kapside sind nicht von einer äußeren Membranhülle umgeben. Die Interaktion von Kapsiden mit zellulären Rezeptoren wird durch hervorstehende Proteinstrukturen vermittelt, den sogenannten "Fiber Knobs". Als zelluläre Rezeptoren dienen der Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR), Heparansulfatglykosaminoglykane und αVβ3/5 Integrine (Bergelson et al., 1997; Dechecchi et al., 2001; Wickham et al., 1993). Adenoviren besitzen ein breites Spektrum infizierbarer Zellen und können sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen infizieren. Durch die Expression früher viraler Genprodukte, E1A und E1B, bewirken Adenoviren den Eintritt ruhender Zellen in die S-Phase des Zellzyklus. Eine produktive Adenovirus Infektion führt zu einem Absterben infizierter Zellen und der Freisetzung von Nachkommenpartikeln. Adenovirale Vektoren leiten sich in der Regel von Adenovirus 2 (Ad2) oder Ad5 ab. Es wurden mehrere Generationen von adenoviralen Vektoren beschrieben (zur Übersicht siehe Green & Seymour, 2002). Die ersten Vektoren enthielten die meisten der viralen Gene und waren in einem Bereich, der die E1 Genregion enthielt, deletiert. Durch die Deletion der E1 Genregion waren diese Vektoren in Zielzellen nicht zu einer DNA Replikation fähig. Um die Verpackungskapazität von Transgenen zu erhöhen, wurde zusätzlich die E3 Genregion deletiert, die in Adenovirusinfektionen nicht essentiell ist. Diese Vektoren hatten eine Verpackungskapazität für Fremdgene von 8 kbp. Die E3 Genregion kodiert für ein Protein, das die antivirale Immunantwort der Zelle moduliert und anti-apoptotische Wirkung besitzt und für ein anderes Protein, das toxische Wirkung besitzt, das "Adenovirus Death Protein"

(ADP). Eine Infektion mit Adenoviren der ersten Generation erzeugt eine starke humorale und zellvermittelte Immunantwort, die einerseits die Zeitdauer der Expression begrenzt und andererseits die maximale tolerierbare Vektordosis limitiert. In der zweiten Generation von adenoviralen Vektoren wurde zusätzlich zu den Bereichen E1 und E3 entweder ein Teil der E4 Genregion deletiert oder eine Mutation in den E2A Genbereich eingeführt. Diese Veränderungen des Genoms führten zu einer verminderten inflammatorischen Antwort, jedoch nicht zu einer verlängerten Transgenexpression. Die Deletion des gesamten kodierenden Bereiches war die konsequente Fortsetzung dieser Strategie und führte zur Bildung der sogenannten enkapsidierten adenoviralen Minichromosomen (EAM) oder "gutless" Vektoren. Obwohl die Produktion dieser Vektoren komplizierter wurde, erbrachten sie Vorteile gegenüber den Vektoren der ersten und der zweiten Generation bezüglich ihrer geringeren Immunogenität, die sogar eine Readministration dieser Vektoren zuläßt. Dieser Fortschritt erlaubt den Gentransfer von langen Gensequenzen mit diese Vektoren.

Für eine Anti-Krebstherapie ist eine Inflammation und die Immunogenität der Adenoviren nicht unbedingt ein Nachteil. So verfolgte die Entwicklung von konditionell replikationskompetenten Adenoviren eine andere Strategie. Die Deletion der Gensequenz des E1B Proteins, z.B. in ONYX-015, führt zum Verlust der Fähigkeit zur Replikation in Zellen, in denen der p53 Signalweg funktionell ist. In Zellen, die eine Deregulation im p53 Signalweg aufweisen, ein Ereignis, das häufig in neoplastisch transformierten Zellen vorkommt, können diese E1B deletierten rekombinanten Adenoviren replizieren und zum Absterben dieser Zellen führen.

Die vollständige oder partielle Deletion des E1A Gens, z.B. in Ad dl312 oder Ad dl922-947, verhindert die Bindung und Inaktivierung der Proteine der pRB Familie. Diese Vektoren sind darum nicht in der Lage, in ruhenden Zellen die DNA-Synthesephase zu initiieren. Für diese konditionell replikationskompetenten Adenovirusvektoren konnte ein onkolytischer Effekt gezeigt werden.

Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) ist ein membranumhülltes Virus mit einem doppelsträngigen DNA Genom von 152 kbp (zur Übersicht siehe Glorioso & Fink, 2004a/b). Das Genom kodiert für 83 offene Leserahmen, wobei für eine Replikation des viralen Genoms 45 offene Leserahmen davon nicht benötigt werden. Die Bindung von HSV an die Zelloberfläche und anschließende Internalisierung wird durch fünf integrale Membranglykoproteine (gB, gC, gD, gH und gL) vermittelt. Dabei bindet gD mit hoher Affinität an die zellulären Rezeptoren "Herpesvirus entry mediator A" (HveA; Mitglied der TNF Rezeptor Familie) und HveC (Zelladhäsionsmolekül). HveC liegt in hoher Konzentration in der Membran von sensorischen Nervenendigungen vor. In primären Infektionen mit HSV können Epithelzellen infiziert werden. Nach der Lyse dieser Zellen können andere Epithelzellen infiziert werden oder sensorische Neurone. Bei einer Infektion von Neuronen

wird das Nukleokapsid im Axon retrograd zum Zellkörper im Ganglion transportiert, wo die virale DNA durch Kernporen in den Kern gelangt (Sodeik et al., 1997). Die virale DNA integriert nicht in die zelluläre DNA, sondern leitet zusammen mit dem Tegumentprotein VP16 einen lytischen Vermehrungszyklus ein oder persistiert episomal (Mellerick et al., 1987). Ein lytischer Vermehrungszyklus von HSV induziert eine zelluläre antivirale Immunantwort, die durch Makrophagen und T-Lymphozyten vermittelt wird durch die Produktion von Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ) (Kodukula et al., 1999). Vektoren, die sich von HSV ableiteten, waren in mindestens einem "immediate early" Gen und gegebenenfalls in den akzessorischen Genen deletiert und daher in der Fähigkeit zur Replikation des viralen Genoms stark beeinträchtigt (zur Übersicht siehe Lou, 2003). Diese Vektoren können bis 40 kbp Fremdgen verpacken. Eine Expression mit diesen Vektoren ist nur transient.

Obgleich HSV Vektoren eine Vielzahl von Zelltypen transduzieren können, bieten sich diese Vektoren durch den natürlichen Neurotropismus und die Immunogenität für eine Behandlung von Krebserkrankungen des zentralen Nervensystems an. In präklinischen und klinischen Studien wurde insbesondere ein Vektor charakterisiert, der als G207 bezeichnet wird. Dieser Vektor enthält eine *lacZ* Geninsertion in dem viralen Gen, das für die Ribonukleotid-Reduktase kodiert (ICP6) und eine 1 kbp-lange Deletion in beiden Kopien des Gens für einen Neurovirulenzfaktor, ICP34.5. Die Ribonukleotid-Reduktase ICP6 ist in proliferierenden Zellen für eine Virusvermehrung nicht essentiell. Die Deletion dieses Gens erzeugt in dem Vektor eine Abhängigkeit von der zellulären Proliferation, eine Eigenschaft neoplastisch transformierter Zellen. In Tumormodellen verhinderte dieser Vektor das Tumorwachstum durch Onkolyse und erzielte eine systemische Immunantwort gegen Tumorzellen durch eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Mineta et al., 1995; Toda et al., 1998/1999/2002). In einer klinischen Phase I Untersuchung bei Patienten mit Tumoren glialen Ursprungs erzeugte dieser Vektor keine Anzeichen einer Encephalitis oder einer Toxizität gegenüber nicht transformierten Gehirnzellen (Markert et al., 2000).

Die Adeno-assoziierten Viren sind bereits eingehend beschrieben worden. Vektoren der Adeno-assoziierten Viren beinhalten keine viralen kodierenden Sequenzen (zur Übersicht siehe Buning et al., 2004). Für die Verpackung der Vektorgenome dienen die flankierenden invertierten terminalen Sequenzwiederholungen. AAV Vektoren bieten so eine Verpackungskapazität von 4,5 kb für Fremdgene. Vektoren des Serotyps 2 nutzen Heparansulfatproteoglykane als primäre zelluläre Rezeptoren und besitzen ein großes Spektrum infizierbarer Zellen. AAV Vektoren können sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen infizieren. Die Abhängigkeit von einem Helfer-Adenovirus zur Replikation und Expression der wt Adeno-assoziierten Viren bleibt bezüglich der Zweitstrangsynthese auch bei den AAV-2 Vektoren bestehen, die jedoch durch die Verwendung einer große Anzahl von

Partikeln für eine effiziente Transduktion von Zielzellen überkommen werden kann. Da AAV Vektoren nur eine humorale, aber keine zellvermittelte Immunantwort induzieren, ist die maximale tolerierbare Partikelanzahl in einem Gentherapieansatz nicht limitierend, sofern das verwendete Transgen keine inflammatorische Antwort hervorruft. Die Produktionen von Vektorpräparationen enthalten keine replikationskompetenten, Wildtyp-ähnlichen Partikel und können mit Titern von bis zu 10¹³ genomhaltigen Einheiten/ml hergestellt werden.

AAV Vektoren vermitteln eine langfristige Expression mit einer langsameren Expressionskinetik bis zum Erreichen der vollen Expressionsstärke, verglichen z.B. mit transient exprimierenden adenoviralen Vektoren. AAV Vektoren besitzen die Fähigkeit zur Integration in das zelluläre Genom, die zwar diese langandauernde Expression bewirken kann, aber grundsätzlich auch die Möglichkeit einer chromosomalen Schädigung mit sich bringt. Allerdings ist eine Integration selten und findet vermutlich an chromosomalen Doppelstrangbrüchen statt, die nicht durch die Vektoren induziert werden (zur Übersicht siehe McCarty et al., 2004). Eine langfristige Expression wird beispielsweise in der Leber hauptsächlich durch episomal vorliegende, zirkularisierte Vektoren erzielt. Diese zirkularisierten Genome können bei der Verwendung verschiedener AAV Vektoren auch durch Heterodimere repräsentiert werden.

Zur Überwindung der geringen Transduktionsrate mit AAV Vektoren, die durch die Zweitstrangsynthese limitiert wird, wurden sogenannte selbstkomplementäre AAV Vektoren (scAAV) entwickelt, die innerhalb des Vektorgenoms komplementär sind in der Art eines langen Palindroms und in der Zielzelle mit sich selbst Basenpaarungen eingehen (McCarty et al., 2001). Diese Vektoren besitzen allerdings nur die Hälfte der Verpackungskapazität für Fremdgene, also etwa 2 kb.

Zur Expression von Fremdgenen, die größer sind als 4,5 kb, wurden sogenannte "Transsplicing" Vektoren entwickelt (Yan et al., 2000). Diese Vektoren enthalten jeweils nur einen Teil des gesamten Gens. Bei einer Koinfektion mit diesen Vektoren wird durch eine Spleißreaktion das vollständige Gen rekonstituiert. Die Effizienz dieser Methode ist jedoch durch die Akkumulation gespleißter mRNAs limitiert (Xu et al., 2004).

AAV Vektoren wurden in prä-klinischen Studien für eine Therapie gegen verschiedene Krebserkrankungen getestet (zur Übersicht siehe Ponnazhagan, 2004). In dem Zusammenhang ist besonders die Möglichkeit der Kombination einer AAV Vektor vermittelten Gentherapie mit bestehenden Therapien wie γ -Bestrahlung oder Chemotherapien interessant (Peng et al., 2000; Kanazawa et al., 2003).

1.8.2 Targeting von viralen Vektoren

Ein Tageting von viralen Vektoren kann auf verschiedenen Ebenen erzielt werden, wie z.B. der Veränderung der Bindung eines Kapsids oder Membranhüllproteins an verschiedene zelluläre Rezeptoren, der Verwendung gewebespezifischer Promotoren zur Expression von Fremdgenen oder auf der Ebene bestimmter intrazellulärer Virus-Zell-Interaktionen.

Im Falle von AAV Vektoren können die Kapside der verschiedenen Serotypen für die Verpackung des Genoms verwendet werden (Grimm et al., 2003b). Die Kapside vermitteln die Interaktion mit unterschiedlichen zellulären Rezeptoren und somit einen veränderten Tropismus. Eine veränderte Interaktion mit zellulären Rezeptoren kann auch durch gezielte Manipulation von Kapsidstrukturen erreicht werden, wie den "Fiber Knobs" bei Adenovirus oder eines "Loops" in der Kapsidproteinsequenz bei AAV-2 (Everts & Curiel, 2004; Girod et al., 1999; Perabo et al., 2003; Müller et al., 2003). Im Falle der behüllten RNA Viren wie VSV, Retroviren und Lentiviren kann das Glykoprotein der Membranhülle, das die Interaktion mit einem zellulären Rezeptor vermittelt, gegen das eines anderen Virus ausgetauscht werden, eine Methode, die als Pseudotypisierung bezeichnet wird. Unter Verwendung dieses Prinzips konnten CD4 pseudotypisierte VSV Vektoren selektiv an HIV-infizierte Zellen binden, da diese Zellen das HIV Protein gp120 in der Zellmembran enthielten (Schubert et al., 1992; Schnell et al., 1997).

Nach der Internalisierung von viralen Vektoren kann eine selektive Expression durch die Verwendung ausgewählter Promotoren erreicht werden (zur Übersicht siehe Nettelbeck et al., 2000). Um eine gewebespezifische Expression zu erreichen, kann ein Promotor für die Expression eines Fremdgens verwendet werden, der in diesem Gewebe selektiv aktiv ist, wie z.B der Promotor für das "myelin basic protein" (MBP) oder "glial fibrillary acidic protein" (GFAP) in Oligodendrozyten und glialen Zellen. In manchen Tumoren ist das Expressionsprofil des Ursprungsgewebes dereguliert. Proteine, die in diesen Tumoren selektiv exprimiert oder überexprimiert werden, sind nicht nur Marker für diese Tumoren, sondern deren Promotoren können für eine tumorspezifische Expression verwendet werden, wie z.B. der "carcinoembrionic antigen" (CEA) Promotor oder der α-Fetoprotein (AFP) Promotor. Eine Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika resultiert oftmals in der Überexpression eines Proteins, das als "multiple drug resistance gene 1" (mdr-1) bezeichnet wird. In der Kombination einer Chemotherapie mit einer Gentherapie unter Verwendung des mdr-1 Promotors kann so die Überexpression dieses Gens zur Expression eines Fremdgens ausgenutzt werden. In vielen Tumoren ist die Proliferationskontrolle durch die Retinoblastomproteine (pRBs) außer Funktion. Als eine Konsequenz daraus sind die Proteine der E2F Proteinfamilie aktiv und wirken als Transkriptionsfaktoren. Die Verwendung von E2F regulierten Promotoren, wie der E2F-1 Promotor und auch der frühe Promotor P4

der autonomen Parvoviren H-1 Virus und MVMp, koppelt die Expression von Fremdgenen an die Proliferation der Zielzellen.

Die konditionell replikationskompetenten Adenoviren (crcAd) ONYX-015 und Ad dl312 sind nicht zu einer Inaktivierung der Proliferationskontrolle durch die Interaktionen mit p53 Protein und pRBs fähig (zur Übersicht siehe Green & Seymour, 2002; Lai et al., 2002; Bell et al., 2003). Diese crcAd nutzen die Virus-Zell-Interaktion für die Selektivität einer Replikation, Expression und eine Lyse derjenigen Zellen, in denen der p53 Signalweg defekt ist oder die Kontrolle durch die pRBs verloren gegangen ist, also für eine Onkolyse. Eine andere Besonderheit von neoplastisch transformierten Zellen ist der Verlust einer zellulären Antwort auf Interferon. Dieser Defekt wird von VSV Vektoren ausgenutzt, die Interferon induzieren (zur Übersicht siehe Giedlin et al., 2003; Lichty et al., 2004). In Zellen, die eine transkriptionelle Antwort auf Interferon zeigen, können sich VSV Vektoren nicht vermehren, so daß deren Replikation, Expression und die Lyse der Zellen auf nicht-responsive Tumorzellen beschränkt bleibt und diese Vektoren onkolytische Aktivität zeigen.

1.9 Ziel der Arbeit

Ein AAV-2 Hybridvektor, der die P4-*ns1*-P38 Kassette des autonom replizierenden Parvovirus H-1 enthält, soll in dieser Arbeit charakterisiert werden bezüglich der Transduktions-eigenschaften, des Tropismus im Vergleich zu dem von H-1 Vektoren und einer verstärkten Expression in Onkoprotein transformierten Zellen.

Vektoren der autonom replizierenden Parvoviren sind in ihrer Transduktion unabhängig von einem Helfervirus, während Vektoren, die sich von dem Dependovirus AAV-2 ableiten, durch den Einfluß einer Adenovirus Koinfektion in ihrer Transduktion stimuliert werden können. Da der parvovirale Hybridvektor im AAV Vektorgenom die H-1 Virus Promotoren nutzt und die regulatorischen NS1/2 Proteine exprimiert, ist eine Charakterisierung der Transduktionseigenschaften für eine Verwendung dieses Hybridvektors eine notwendige Voraussetzung.

Die Kapside der autonom replizierenden Parvoviren H-1 Virus und MVMp binden an sialinsäurehaltige zelluläre Glykoproteine, anders als AAV-2, das Heparansulfat-proteoglykane als primären Rezeptor verwendet. Dieser Unterschied sollte durch ein verändertes Spektrum infizierbarer Zellen reflektiert werden, das den Einsatzbereich für die Verwendung der P4-*ns1*-P38 Kassette erweitert.

Für die autonom replizierenden Parvoviren MVMp und H-1 Virus wurden onkolytische Eigenschaften beschrieben. Die Fähigkeit zur Onkolyse beruht auf einer verstärkten Auflösung von Konkatemeren während der DNA-Replikation, einer Stimulierung der Expression in bestimmten Onkoprotein transformierten Zellen und einer erhöhten Toxizität

1. Einleitung

des multifunktionellen Nichtstrukturproteins NS1. Eine gesteigerte Expression in Onkoprotein transformierten Zellen wird durch den frühen H-1 Virus Promotor P4 vermittelt. Dieser Promotor reguliert auch im Hybridvektor die Expression von NS1 Protein und sollte in diesem Vektor in Onkoprotein transformierten Zellen ebenfalls stimuliert werden. Es gibt bisher keine quantitative Untersuchung *in vivo* über eine erhöhte Expression in transformierten Zellen gegenüber einem vergleichbaren nicht-transformierten Gewebe mithilfe von Vektoren, die sich von den autonomen Parvoviren H-1 Virus oder MVMp ableiten. Der Faktor dieser Stimulierung soll bestimmt werden und mit demjenigen verglichen werden, der mit dem Hybridvektor erzielt wird. Das Maß dieser Stimulation soll Aufschluß über die Einsatzmöglichkeiten des Hybridvektors und auch des von H-1 Virus abgeleiteten Vektors geben.

2. Material

2.1 Biochemisches Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Amersham (Braunschweig)
- Gibco/BRL (Eggenstein)
- Merck (Darmstadt)
- Roth (Karlsruhe)
- Serva (Heidelberg)
- Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

2.1.1.1 Radiochemikalien

Radiochemikalien zur Markierung von Sonden-DNA (α^{32} P-dATP) wurden von der Firma Amersham Pharmacia (Braunschweig) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Enzyme wurden von folgendenden Firmen bezogen:

- Amersham Life Science (Braunschweig)
- Gibco/BRL (Eggenstein)
- New England Biolabs (Schwalbach)
- Pharmacia (Freiburg)
- Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
- Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

2.1.3 Verbrauchslösungen

Denaturierungslösung		Denhardt's 100x	
1,5 M	NaCl	2 %	BSA
0,5 M	NaOH	2 %	Ficoll 400
		2 %	Polyvinylpyrrolidone
Einfriermediur	n eukaryontischer Zellen	2xHBSS	
90 %	FCS	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
10 0/	DMCO	10 mM	VCI

90	%	FCS	1,5	ΜM	Na₂HPO₄
10	%	DMSO	10	mΜ	KCI
			280	mΜ	NaCl
			12	mΜ	_D -Glucose
			50	mΜ	Hepes
					pH 7,06

Hybridisierungslösung (AAV)		Hybridisierungslö	sung (H-1)	
125	mM	Na ₂ HPO ₄	10 x	Denhardt's
125	mM	NaH ₂ PO ₄	3 x	SSC
250	mM	NaCl	1 %	SDS
1	mM	EDTA	5 mM	EDTA
7	%	SDS		
45	%	Formamid		

Kompetenzlösung		Kornberg Lösung A	
100 mM	CaCla	30 %	Δο

100	mM	CaCl ₂	30	%	Acrylamid
14	%	Glycerol	0,15	%	Bis-Acrylamid

Kornberg Lös		Kornberg Lösung C	
18,1 % 0,4 %	Tris SDS	9,05 % Tris 0,4 % SDS	
0,1 70	pH 8,8	pH 6,8	
Lämmli Lösui	na A	Ladepuffer für DNA 6x	
30 %	Acrylamid	0,25 % Bromphenolblau	
0,8 %	Bis-Acrylamid	30 % Glycerol in TAE-Puffer, pH 8,0	١
		iii TAL-Fuller, pri 6,0	'
Ladepuffer fü 100 mM	r Proteine 2x Tris-Cl, pH 6,8	LB-Agar 1 % hydrolysiertes Casein	
2 mM	EDTA	1 % hydrolysiertes Casein 0,5 % Hefeextrakt	J
4 %	SDS	0,5 % NaCl	
20 % 10 %	Glycerol β-Mercaptoethanol	1,5 % Agar	
0,1 %	Bromphenolblau		
D4		D2	
P1 100 μg/m	l RNaseA	P2 200 mM NaOH	
50 mM	Tris-CI, pH 8,0	1 % SDS	
10 mM	EDTA		
Р3		2xProteinase Puffer	
3 M	Kaliumacetat	20 mM Tris-Cl, pH 8	
	pH 5,5	20 mM EDTA 1 % SDS	
QBT 750 mM	NaCl	QC 1 M NaCl	
50 mM	MOPS, pH 7,0	50 mM MOPS, pH 7,0	
15 % 0,15 %	2-Propanol Triton X-100	15 % 2-Propanol	
0,15 /6	111tO11 X-100		
QF	N. O.	Renaturierungspuffer	
1,25 M 50 mM	NaCl Tris-Cl, pH 8,5	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-Cl, pH 7,2	
15 %	2-Propanol	1 mM EDTA	
RIPA		SSC 20x	
9,1 mM	Na₂HPO₄	3 M NaCl	
1,7 mM	NaH₂PO₄	300 mM Natriumcitrat	
150 mM 1 %	NaCl NP40	pH 7,0	
0,5 %	Deoxycholsäure-Natriu	um-	
0.1 %	Salz		
0,1 %	SDS		
TAE	Tria Assat to 11.0.0	TE 10 mM Tria Ol mH 0.0	
40 mM 1 mM	Tris-Acetat, pH 8,0 EDTA	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 1 mM EDTA	
VTE 50 mM	Tris-Cl, pH 8,0	Waschlösung 1 3 x SSC, pH 7,0	
0,5 mM	EDTA	1 % SDS	

Waschlösung 2

0,3 x SSC, pH 7,0 1 % SDS

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Größenmarker

Als Gößenstandard bei DNA Agarose Gelelektrophoresen wurde Marker VII der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Die Größen der Fragmente sind in bp. 8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 710, 492, 359.

Als Größenstandard bei Protein SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen diente eine Mischung aus vier Proteinen: Phosphorylase B (94 kD), Carboanhydrase (66 kD), Ovalbumin (44 kD) und Albumin (30 kD) jeweils in einer Konzentration von 1 μg/μl. Die Proteine wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.2.2 Plasmide

pSL1180 (Pharmacia, Freiburg; EMBL/GenBank # U13865) ist ein allgemeiner Kloniervektor mit einer großen multiplen Klonierungsstelle. Das Plasmid trägt eine für die β-Lactamase kodierende Ampicillin Resistenz und einen ColE1 Replikationsursprung.

pTAV2-0 (Heilbronn et al., 1990) enthält die Sequenz für infektiöse Adeno-assoziierte Viren Serotyp 2 in einem Bluescript-Vektorplasmid pKS+. Das Genom ist durch BgIII-Linker in die BamHI Restriktionsschnittstelle einligiert. Die terminalen Sequenzwiederholungen sind wie im Wildtyp AAV-2 invertiert. Das Plasmid pKS+ trägt das für die β -Lactamase kodierende Ampicillin Resistenzgen.

pTRUF2 (Zolotukhin et al., 1996) trägt eine 3.4 kbp rAAV-Kassette in einem pBluescript(+)-Vektorplasmid. Die rAAV-Kassette enthält zwei Reportergene, hgfp und neo^r , und verschiedene regulatorische Elemente, wie den frühen Promotor / Enhancer aus Cytomegalievirus (CMV), eine Splice Donor / Splice Acceptor Stelle (SD/SA) aus Simian Virus 40 (SV40) und eine Polyadenylierungssequenz (pA₁) aus SV40 für die Termination der hgfp-Transkription. Die regulatorischen Elemente für das Neomycin-Resistenzgen sind der Thymidinkinase-Promotor aus Herpes Simplex Virus (P_{TK}), davor eine Tandemwiederholung des Enhancers aus der Polyoma Virus Mutante PYF441 und zur Termination ein Polyadenylierungssignal des Rinder Wachstumshormons aus pRc/CMV. Diese Sequenzen sind von zwei identischen terminalen Sequenzwiederholungen eingefaßt (ITRs).

phH1Δ1600 (Kestler et al., 1999) ist ein anwendungsorientierter Kloniervektor zur Herstellung rekombinanter H-1 Vektoren. Das Plasmid enthält die Sequenz für die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, sowie die Promotoren P4 und P38. Die Sequenzen für die kapsidbildenden Virusproteine (VPs) sind in 1600 bp deletiert, wobei die terminale Polyadenylierungsstelle erhalten geblieben ist. Eine multiple Klonierungsstelle ist auf den VP2 Transkriptionsstart positioniert. Der Plasmidanteil stammt von pBR322 und trägt eine Ampicillin Resistenz und einen ColE1 Replikationsursprung für die bakterielle Replikation.

pTK103 (Groner et al., 1982) trägt das vollständige Thymidinkinase-Gen aus Herpes Simplex Virus (HSV1-tk) in der PvuII Klonierstelle des Vektors pBR322. Das Plasmid pBR322 enthält das für die β -Lactamase kodierende Ampicillin Resistenzgen und einen CoIE1 Replikationsursprung.

pTRH1-GFP ist das Plasmid für die Herstellung des Hybridvektors, der als Transgen das Reportergen *gfp* enthält. Die Herstellung des Plasmids erfolgte über verschiedene Intermediate.

Aus phH1∆1600 wurde die P4-*ns1*-P38 Kassette durch Verdau mit BssHII und Ndel erhalten. Die BssHII Schnittstelle wurde durch Klenow Polymerase aufgefüllt. Das Fragment wurde in

pSL1180 einligiert, das durch Notl und Ndel Verdau vorbereitet wurde. Die Notl Schnittstelle wurde ebenfalls durch Klenow Polymerase aufgefüllt. Das entstandene Plasmid wurde pSLH1 genannt. Das einligierte Fragment enthielt noch ein Polyadenylierungssignal, das nicht benötigt wurde. Darum wurde es durch Restriktion mit BamHI, das zwei Schnittstellen erkennt, entfernt (pSLH1ΔpA).

Die terminalen Sequenzwiederholungen in den Hybridvektorkonstrukten pTRH1 stammen aus pTRUF2. Alle kodierenden Sequenzen des Vektors pTRUF2 wurden durch Restriktion mit EcoRI und Sall deletiert. Die EcoRI Schnittstelle wurde durch Klenow Polymerase aufgefüllt. Die P4-ns1-P38 Kassette aus pSLH1 Δ pA wurde durch Verdau mit Nrul und Sall ausgeschnitten und zwischen die terminalen Sequenzwiederholungen kloniert zu pTRH1. Wiederum aus pTRUF2 wurde durch NotI Restriktion die *gfp* Sequenz ausgeschnitten und NotI in pTRH1 ligiert zu pTRH1-GFP.

pTRH1-TK ist das Plasmid für die Herstellung des Hybridvektors, der als Transgen die Thymidinkinase aus Herpes Simplex Virus enthält. Die HSV-tk enthält ein eigenes Polyadenylierungssignal. Um die Größe des Vektors gering zu halten wurde das Polyadenylierungssignal aus pTRH1 durch Restriktion mit Sphl und Sall deletiert. Die kohäsiven Enden wurden durch T4 DNA Polymerase enfernt und religiert zu pTRH1ΔpA. Das HSV-tk Gen aus pTK103 wurde durch Doppelverdau mit EcoRl und PpuMl ausgeschnitten und die Enden durch Klenow Polymerase aufgefüllt. Das Plasmid pSL1180 wurde mit Notl linearisiert und die Enden ebenfalls aufgefüllt. Durch die Ligation dieser Fragmente wurde das Plasmid pSLTK erhalten. Um die Länge des letztendlich entstehenden Vektors so gering wie möglich zu halten, wurde pSLTK in der Klonierstelle durch Bcll-Ndel Doppelverdau um 131 bp verkürzt. Die kohäsiven Enden wurden wiederum durch Klenow Polymerase aufgefüllt und das Plasmid religiert zu pSLTK-LCS. Die HSV-tk Sequenz wurde aus pSLTK-LCS durch Restriktion mit Xhol-BamHI erhalten und mit pTRH1ΔpA Xhol-BamHI ligiert zu pTRH1-TK.

pTRH1-hR*luc* ist das Plasmid für die Herstellung des Hybridvektors, der als Reportertransgen die Luciferase aus *Renilla reniformis* enthält. Die Gensequenz für die Luciferase stammt aus phRL-TK (Promega) und wurde Nhel-Notl Restriktion erhalten. Die Nhel Schnittstelle wurde durch Klenow Polymerase aufgefüllt. In dem Plasmid pTRH1-GFP wurde durch Xhol-Notl Restriktion die *gfp* Sequenz deletiert. Die Xhol Schnittstelle wurde durch Klenow Polymerase aufgefüllt und die Fragmente ligiert zu pTRH1-hR*luc*.

pP40-TK ist das Plasmid für die Herstellung des AAV-2 Vektors, der den linken ORF aus AAV-2 enthält und das Transgen HSV-*tk* unter der Kontrolle des P40 Promotors exprimiert. Zur Herstellung des Plasmids wurde pTAV2 mit HindIII und Eco105I verdaut. Es entstehen drei Fragmente, von denen die *rep* Gensequenz mit linkem TR und das Plasmidfragment mit rechtem TR weiterverwendet wurden.

Die HSV-*tk* wurde durch Sall-HindIII Restriktion von pSLTK-LCS erhalten und das kohäsive Sall Ende durch Klenow Polymerase aufgefüllt. Das Plasmidfragment aus pTAV2 wurde mit dem HSV-*tk* Fragment ligiert zu pTRTK.

PTRTK wurde dann mit HindIII linearisiert und mit dem *rep* enthaltende HindIII Fragment aus pTAV2 ligiert zu pP40-TK.

pP40-GFP ist das Plasmid für die Herstellung des AAV-2 Vektors, der den linken ORF aus AAV-2 enthält und das Transgen *gfp* unter der Kontrolle des P40 Promotors exprimiert. Durch Restriktion von pP40-TK mit Xhol und BamHI entstehen drei Fragmente. Das Fragment, das den *rep* Bereich enthält und das Plasmidfragment wurden weiterverwendet. Das Plasmidfragment wurde mit einem Xhol-BgIII *gfp* Fragment aus pTRH1-GFP ligiert zu pTRGFP. In dieses Plasmid wurde durch Restriktion mit Xhol das *rep* Fragment inseriert zu pP40-GFP.

pCMV-TK ist das Plasmid für die Herstellung des AAV-2 Vektors, der die Thymidinkinase aus Herpes Simplex Virus unter der Kontrolle des Promotors / Enhancers aus

Cytomegalievirus (CMV) exprimiert. pCMV-TK ist ein Derivat von pTRUF2, bei dem die *gfp* Sequenz durch Restriktion mit BamHI und deletiert wurde. Die Schnittstellen wurden mit Klenow Polymerase aufgefüllt. Die HSV-*tk* Sequenz wurde durch Restriktion mit Xhol-BamHI aus pSLTK-LCS ausgeschnitten und die Enden durch Klenow Polymerase aufgefüllt. Die Fragmente wurden ligiert zu pCMV-TK.

pCMV-hR*luc* ist das Plasmid zur Herstellung des AAV-2 Vektors, der als Reportertransgen die Luciferase aus *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des CMV Promotors / Enhancers enthält. Die *gfp* Sequenz aus pTRUF2 wurde durch Restriktion mit Xbal und Notl deletiert. Die Xbal Schnittstelle wurde durch Klenow Polymerase aufgefüllt. Die hR*luc* Sequenz wurde durch Nhel und Notl Restriktion aus phRL-TK erhalten. Die Schnittstelle von Nhel wurde durch Klenow Polymerase aufgefüllt und die Fragmente wurden ligiert zu pCMV-hR*luc*.

phH1-GFP ist das Plasmid zur Herstellung des H-1 Vektors, der als Transgen das Reportergen *gfp* enthält. Das Plasmid phH1∆1600 wurde durch Notl linearisiert und mit einem Notl ausgeschnittenen *gfp* Fragment aus pTRUF2 ligiert zu phH1-GFP.

phH1-TK ist das Plasmid zur Herstellung des H-1 Vektors, der als Transgen die HSV-*tk* enthält. Aus dem Plasmid pSLTK-LCS wurde die HSV-*tk* Sequenz durch Xhol-BamHI Restriktion erhalten. Dieses Fragment wurde zwischen die Xhol-BamHI Schnittstellen in phH1Δ1600 inseriert zu phH1-TK.

phH1-hR*luc* ist das Plasmid zur Herstellung des H-1 Vektors, der als Reportertransgen die Luciferase aus *Renilla reniformis* enthält. Aus phH1-GFP wurde nacheinander durch Xhol und Notl Restriktion die *gfp* Sequenz deletiert. Die Xhol Schnittstelle wurde durch Klenow Polymerase aufgefüllt. Die hR*luc* Sequenz wurde durch Nhel und Notl Restriktion aus phRL-TK erhalten. Die Schnittstelle von Nhel wurde durch Klenow Polymerase aufgefüllt und die Fragmente wurden ligiert zu phH1-hR*luc*.

2.2.3 Oligonukleotide

Die zur PCR-Mutagenese verwendeten Oligonukleotide hatten folgende Sequenz:

5'- CAC GTC ACT TAC GTT CAC ATG GTT GGT CAG -3'

5'- CTG ACC AAC CAT GTG AAC GTA AGT GAC GTG -3'

2.2.4 Sonden

Die Sonden zur Hybridisierung mit rekombinanter Vektor DNA sind in Tab.2.1 aufgeführt:

Sonde	Herkunft	Länge
ns1 aus H-1	EcoRI -Xbal Fragment aus phH1∆1600	1000 bp
tk aus HSV-1	HindII Fragment aus pSLTK-LCS	1550 bp
gfp	Notl Fragment aus pTRUF2	731 bp
hR <i>luc</i>	Nsil-Xbal Fragment aus TRH1-hR/uc	728 bp
		Tab.: 1

2.2.5 Bakterienzellen Tab.: 2

E.coli DH5α	nicht im ATCC Verzeichnis; dam ⁺ dcm ⁺
E.coli JM110	GM48str ^r (thr ⁻ leu ⁻ thi ⁻ lacY ⁻ galK ⁻ galT ⁻ ara ⁻ tanA ⁻ tsx ⁻ dam ⁻ dcm ⁻
ATCC # 47013	supE44) ∆lac-proF' traD36 proAB lacl ^q Z∆M15
E.coli Sure®	e14–(McrA–) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96
Stratagene, La Jolla,	relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F´ proAB
CA, UŠA	laclqZ∆M15 Tn10 (Tetr)]
	McrA ⁻ , McrCB ⁻ , McrF ⁻ , Mrr ⁻ , HsdR ⁻ , endA defizient, recB recJdefizient

2.2.6 Eukaryontische Zellinien

Zellinie	Beschreibung
HeLa	Humane HPV18 E6/E7 transformierte Zervix-Karzinom Zellinie
	ATCC # CCL-2 (Rösl et al., 1994)
HeLaRC32	HeLa Subklon, der AAV-2 <i>rep</i> - und <i>cap</i> -Gene trägt (Salvetti et al., 1998)
NB-E	Humane SV40 transformierte Nieren Zellinie (Cornelis et al., 1988)
293T/17	Humane Ad-5 E1A/B und SV40 großes T-Antigen transformierte
	embryonale Nieren Zellinie (Pear et al., 1993)
VH10 parental	Humane nicht immortalisierte Fibroblasten der Haut
VH10 SV40	Subklon von VH10, der durch SV40 transformiert ist (Chen et al.,
	1986)
MRC5 parental	Diploide, humane Fibroblasten Zellinie
MRC5V1	SV40 Large T transformierte MRC5 Zellinie
NHEM	Normale humane endotheliale Melanozyten (PromoCell, Heidelberg)
Bowes Melanoma (HMCB)	Humane Melanoma Zellinie
HaCaT	Immortalisierte humane Keratinocyten (Boukamp et al., 1988)
HaCatT30ras	HaCaT Zellen, die durch aktiviertes Ras Onkoprotein transformiert sind (Boukamp et al., 1990)

Weitere Zellinien in Methoden 3.2.1 Tab.:8 und Ergebnis 4.4.1 Tab.: 9

Tab.: 3

2.2.7 Antikörper

IgG Erstantikörper	Epitopbezeichnung	Herkunft
mc Mouse 9G10	HSV-1 Thymidinkinase	W. Summers, Yale University
mc Mouse 10C11	HSV-1 Thymidinkinase	W. Summers, Yale University
mc Mouse 303.9	C-Terminus AAV-2 Rep	Wistuba et al., 1995
mc Mouse α GFP	GFP	Roche Diagnostics (Mannheim)
mc Rabbit SP8	C-Terminus MVMp NS1	Brockhaus et al.,1996**
IgG Zweitantikörper	·	
Goat anti Mouse-PO*	Mouse IgG	Dianova, Hamburg
Goat anti Rabbit-PO*	Rabbit IgG	Dianova, Hamburg

Tab.: 4

2.3 Kits

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
Gene Clean Kit	Isolierung von DNA Fragmenten aus einem	BIO 101 (Vista, CA,
	Agarose Gel nach Elektrophorese	USA)
Nano Orange®	Qauntifizierung der Gesamtproteinmenge in	Molecular Probes
Protein Quantitation	Gewebeproben	Europe BV (Leiden ;
Kit (N-6666)		Niederlande)
Western Lightning™	Detektion des Peroxidase-konjugierten	PerkinElmer Life
	Sekundärantikörpers im Immunoblot durch	Sciences, Inc.
	Chemoillumineszenz	
Random Primed DNA	Radioaktive Markierung von Sonden DNA mit	Boehringer Mannheim
Labelling Kit	einem Hexanucleotidgemisch als Primer der	(Mannheim)
	Polymerisationsreaktion	

Peroxidase konjugiert dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Frau Dr.N.Salome, Angewandte Tumorvirologie im DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Renilla Luciferase	Detektion der Renella Luciferase Expression	Promega Corporation,
Assay System		(Madison, WI, USA)
QIAGEN Plasmid	Plasmidpräparation im größeren Maßstab	QIAGEN GmbH
Maxi Kit / Mega Kit	(Kapazität 500µg/Säule und 5mg/Säule)	(Hilden)

Tab.: 5

2.4 Geräte und Zubehör

2.4.1 Geräte

2.4.1 Gerate		
Gerät	Technische Bezeichnung	Hersteller
Blotkammer ("Western")	SD1	СТІ
Einfrierbox		BRL
Elektrophorese-Kammern	Mini-/Midigel Apparaturen	CTI
ELISA-Reader	EMax	BioRad
FACScan	FACSort	Becton Dickinson
Fluorometer	VICTOR™	WALLAC Oy, Turku, Finland
	1420 Multilabel Counter	
Fluoreszenzmikroskop	Dialux	Leitz
·	Fotomikroskop	Zeiss
Fotoapparatur Fluoreszenz-	•	
mikroskop	Leitz DM RD	Leica
Fotoapparatur Fluoreszenz	Leica DFC350FX	Leica
Mikroskop		
Gammacell 1000		Atomic Energy of Canada
		Limited, Radiochemical
		Company
Geltrockner		Promega
Hybridisierungsofen	Typ 400 HY-E	Bachofer
HybriDot-Apparatur	HybryDot-Manifold	BRL
Inkubator	Typ B 5061 (EC-CO2)	Heräus
Kühl-/Gefrierschrank	+4°C / -20°C	Liebherr
Rani-7 Genier Schlank	-80°C	Labotec
Lichtmikroskop	CK2	Olympus
Luminometer	Lumat LB9501	Berthold Technologies
Mikrowellengerät	Lumat ED9501	Bosch
Multikanal-pipette	8-Kanal Finnpipette	Labsystems
Multikariai-pipette	12-Kanal Transferpette®-12	Brandt
Poristaltik Pumpo	P-1	Pharmacia
Peristaltik Pumpe		
pH Meter	InoLab pH Level1	InoLab
Pipettierhilfe	R301	Tecnomara
Polaroid Kamera	Land Kamera Typ MPK	Polaroid
Röntgenfilmkassetten	SLA3000 / GS3 / SS34	Kodak
Rotoren für Sorvall-Zentrifuge		Sorvall
Rotor für Ultrazentrifugation	50.2Ti	Beckmann
Schüttler	Rockomat	Tecnomara
Sonifier	Typ 250	Branson
Sorvall Zentrifuge	RC-5C	Sorvall
"Speed-Vac"	Vacuum Concentrator	Bachofer
Spektrophotometer	Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
Sterile Werkbank	UVF 6.15 8	BDK
Stromquelle	EPS500/400 und 600	Pharmacia
Tube Sealer		Beckmann
Ultra Turrax	Ultra-Turrax T8	Ika®-Werke
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K	Beckmann

UV Crosslinker Stratalinker Stratagene **UV** Transilluminator Konrad Benda N90 LW 254nm oder 366nm Zentrifugen für Eppendorf-5415 (Rotor F 48-18-11) Eppendorf Reaktionsgefäße Sigma Heräus 2K15 (Rotor 12145) VarifugeF (Rotor BS4402A) Zentrifugen für Falcon-Kühlzentrifuge ZK 380 Röhrchen Hermle

Tab.: 6

2.4.2 Zubehör

Zi iiz Zuboiioi		
Material	Technische Bezeichnung	Hersteller
Chirurgisches Nahtmaterial	Safil®	Braun
		Aesculap AG & CO. KG
Chromatographie-Säule	Econo-Columns	
	Chromatography Column	
	1,5x20cm; 35ml	BioRad
Eppendorf Reaktionsgefäße	1.5 ml / 2 ml	Eppendorf
Falcon Röhrchen	15 ml / 50 ml	Becton Dickinson
Faltenfilter	Ø 125 mm	Schleicher & Schuell
Filmmaterial	Ektachrom 400	Kodak
	T-Max 400 (s/w)	Kodak
Maxi-Prep Säulen	Tip 500	Qiagen
Mega-Prep Säulen	Tip 5000	Qiagen
Heparin-Sepharose	Hepl-Sepharose	Sigma
Kanüle	27G ³ / ₄ 0,4x19	BD Microlance™3
Neubauer Zählkammer	HBG	Neubauer
Nitrocellulose Membran	Nr. 401196 ; 0.45 Mikron	Schleicher & Schuell
Nitrocellulose Filter	Ø 25 mm	Schleicher & Schuell
Nylonmembran	Gene Screen [™]	DuPont
Polaroid Filme	Typ 667 / 665	Siemens
Probenröhrchen Luminometer		
	5ml; 75x12mm	Sarstedt
Quarzküvette	500 µl	Pharmacia
Röntgenfilme	X-OMAT AR	Kodak / Siemens
Sterilfilter	0.2 μm	Schleicher & Schuell
Spritze 1 ml	Soft-Jekt	Henke Sass Wolf GmbH
Spritze 10 ml	Terumo®-Syringe	Terumo
VivaSpin20	VivaSpin20	
•	Zentrifugalkonzentratoren	VivaScience, Sartorius Group
Whatman Papier	Whatman 3MM	Whatman
Zellkultur Gefäße	Flaschen 75 cm ² / 175 cm ²	Greiner / Nunc
	Schalen Ø 3 / 6 / 10 cm	Greiner
	Platten 24- / 48- / 96-well	Greiner
Zellschaber	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	Costar
Zentrifugenröhrchen für	Polyallomer	
Ultrazentrifugationen	Quick Seal (25x89mm)	Beckmann
•	•	 _

Tab.: 7

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Bakterienkulturen

Bakterien wurden in LB-Medium bei 37°C auf dem Schüttler (180 UpM) kultiviert. Dem Medium wurde je nach Anwendung und Plasmid ein Antibiotikum zur Selektion zugesetzt, entweder Ampicillin 100 μg/ml oder Kanamycin 50 μg/ml. Flüssigkulturen für Plasmidextraktionen wurden 15 bis 20 Stunden auf diese Weise inkubiert.

3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

In dieser Arbeit wurden ausschließlich E.coli Bakterien verwendet, die durch CaCl₂-Lösung kompetent für die Aufnahme von Plasmid DNA gemacht wurden.

Ein Aliquot bestehender $CaCl_2$ -kompetenter Bakterien wurde in einer 100 ml Vorkultur aus LB-Medium ohne Antibiotika angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. 2 ml dieser Vorkultur wurden in 250 ml LB-Medium überimpft und auf gleiche Weise inkubiert bis die Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien die frühlogarithmische Phase erreichte. Diese wurde durch Messung der optischen Dichte der Bakteriensuspension gegen frisches LB-Medium bestimmt. Bei einer $O.D._{560} = 0.5$ wurden die Bakterien 5 Minuten auf Eis abgekühlt und danach 10 Minuten bei 4°C mit 5000 x g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eiskalter MgCl₂ Lösung (100 mM) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen pelletiert. Wiederum wurde das Pellet in $CaCl_2$ Lösung (100 mM) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 5000 x g wurde das Pellet in 10 ml eiskalter Kompetenzlösung (100 mM $CaCl_2$ / 14% Glycerol) resuspendiert und zügig bei 4°C zu 50 μ l oder 200 μ l aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für eine Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und 50 μ l Zellsuspension mit 100 - 500 ng DNA 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zwischenzeitlich wurde durch leichtes Schlagen an das Reaktionsgefäß die Suspension mehrmals durchmischt. Die Zellen wurden für 90 Sekunden einem 42°C Hitzeschock ausgesetzt und danach schnell und vorsichtig für 3 Minuten auf Eis gestellt. 800 μ l vorgewärmtes LB Medium wurde mit dem Transformationsansatz gemischt und in einem sterilen Polypropylengefäß auf dem Schüttler bei 180 UpM für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit sollten transformierte, plasmidhaltige Bakterien mit der Synthese der β -Lactamase begonnen haben, so daß eine Selektion auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/ml) möglich war.

3.1.3 Isolierung von Plasmid DNA

Für Restriktionsanalysen während der Klonierung und später für Transfektionen von eukaryontischen Zellen und Sequenzierungen mußte die in Bakterien amplifizierte Plasmid DNA aus den Bakterien extrahiert werden. Für Restriktionsanalysen sind geringe Mengen an Plasmid DNA ausreichend. Dafür wurde die "Mini Prep" Prozedur gewählt. Für Transfektionen war außer den bedeutend größeren Mengen, die dafür aufgewendet werden mußten, die Reinheit der DNA von besonderer Bedeutung. Zur Präparation von Plasmid DNA im größeren Maßstab wurde die "Maxi-Prep" beziehungsweise "Mega-Prep" mit den Produkten der Firma Qiagen durchgeführt.

3.1.3.1 Isolierung von Plasmid DNA zur Analyse – Mini-Prep

Bakterienkolonien von einer LB-Agarplatte wurden mit einer sterilen Pipettenspitze in 3 ml LB Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum überführt. Nach 12 Stunden Inkubation über Nacht wurde 1,5 ml dieser Bakteriensuspension in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten mit 16500 x g bei 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 300 µl gekühltem P1 Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 300 µl P2 Puffer für 5 Minuten lysiert. Zugabe von 300 µl P3 neutralisiert die Probe. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat für 10 Minuten bei 16500 x g bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in

ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid DNA durch Zugabe von 700 µl Isopropanol (2-Propanol) ausgefällt und in einer Zentrifugation bei 16500 x g für 30 Minuten bei 4°C pelletiert. Anschließend wurde die Plasmid DNA mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert bei 16500 x g bei 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Das Plasmid DNA Pellet wurde nach dem Trocknen in 50 µl TE Puffer, pH 8,0 gelöst.

3.1.3.2 Isolierung von Plasmid DNA in präparativem Maßstab – Maxi-/ Mega-Prep

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid DNA wurden das QIAGEN Plasmid "Maxi-Präparationskit" (500 μ g) beziehungsweise "Mega-Präparationskit" (5 mg) nach Vorschrift verwendet. Das erhaltene Pellet wurde in einem geeigneten Volumen TE Puffer, pH 8,0 gelöst, photometrisch vermessen (s. 3.1.4.1) und in der Regel auf eine Endkonzentration von 1μ g/ml eingestellt.

3.1.4 Analyse von Plasmid DNA

3.1.4.1 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von DNA

Nukleinsäuren absorbieren Licht mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Einige Aminosäuren von Proteinen, hauptsächlich die ringförmig geschlossenen Seitenketten von Tryptophan und Tyrosin, absorbieren Licht und tragen so zu dem Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm bei. In einer photometrische Analyse läßt sich durch den Verdünnungsfaktor der Probe (1:100), Küvettencharakteristika (Schichtdicke von 1 cm) und Probenmaterial (dsDNA) die Konzentration und die Reinheit bestimmen.

Bei 260 nm entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei doppelsträngiger DNA (Plasmid) einer Konzentration von 50 μ g/ml, bei einzelsträngiger DNA (Oligonukleotid) einer Konzentration von 33 μ g/ml. Der Quotient der Absorptionskoeffizienten bei Wellenlängen von 260 bzw. 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Probe. Der Quotient für reine doppelsträngige DNA liegt zwischen 1,8 und 1,9. Verunreinigungen mit Proteinen verringern den Wert des Quotienten, Verunreinigungen mit RNA erhöhen ihn. Der Quotient der Absorptionskoeffizienten $A_{260/280}$ für RNA liegt zwischen 1,9 und 2,0. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit erfolgte in TE Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6).

3.1.4.2 Restriktionsanalyse

Eine Restriktionsanalyse diente der Identifizierung von korrekt ligierten Plasmiden bei einer Klonierung. Dazu wurden 0.5 - $2\mu g$ DNA einer Plasmid "Mini-Prep" mit 5 - 10 Units eines Restriktionsenzyms für 1 - 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Die genauen Bedingungen richteten sich nach den Anforderungen des Enzyms. Der Restriktionsansatz enthält in der Regel Puffer des Herstellers ($10 \times 10^{\circ}$ konzentriert), Plasmid DNA, Restriktionsenzym (10° vol.) und deionisiertes 10° H 10° vol.)

Besonderheiten wie Pufferinkompatibilitäten der Reaktionspuffer bei einem Doppelverdau, Inhibierung des Restriktionsenzyms durch Dam- oder Dcm-Methylierung und abweichender Reaktionstemperatur wurde Rechnung getragen.

3.1.4.3 DNA Gelelektrophorese

Für analytische wie auch für präparative Gelelektrophoresen von DNA Fragmenten wurden 1%ige Agarose Gele verwendet. Agarose wurde mit 1x TAE Puffer auf das entsprechende Volumen aufgefüllt und in der Mikrowelle erhitzt bis die Lösung klar und schlierenfrei war. Nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben und die Agarose in abgedichtete Gelträger gegossen. Für analytische Gele wurden Kämme für kleine Probenvolumina eingesetzt, für präparative Gele entsprechend größere.

Die Elektrophorese wurde in 1x TAE Puffer mit einer elektrischen Feldstärke von 8 V/cm durchgeführt. Die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers diente zum Abschätzen der zurückgelegten Laufstrecke. Das eingegossene Ethidiumbromid interkaliert während des

Gellaufs zwischen die Basen der DNA. So können direkt die DNA Fragmente im UV-Licht bei 254 nm als rötlich fluoreszierende Banden fotografiert und analysiert werden.

Präparative Gele wurden zur Schonung der DNA bei 366 nm fotografiert und die gewünschte Bande rasch mit einem Skalpell ausgeschnitten.

3.1.5 Methoden für die Klonierung von DNA Fragmenten

3.1.5.1 Isolierung von DNA Fragmenten durch Gene Clean

Nach der DNA Gelelektrophorese wurden die Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und abgewogen. 3 Volumen Natriumiodid-Lösung wurden zugesetzt und die Agarose bei 55°C zum Schmelzen gebracht. Die Lösung wurde kurz abgekühlt und eine entsprechende Menge an Glasmilch nach den Angaben des Herstellers zugegeben. Die Menge wurde errechnet aus eingesetzter DNA Menge und anteiliger Größe des ausgeschnittenen Fragments. Die Suspension wurde mindestens 5 Minuten bei RT inkubiert und dabei mehrmals durch Invertieren gemischt. Anschließend wurde die Glasmilch mit assoziierter DNA in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 14000 UpM für ca. 2Sekunden pelletiert und mit der Waschlösung zweimal gewaschen. Der Überstand wurde quantitativ abgesaugt und das Pellet durch den Luftsog leicht getrocknet. In einer Menge an H₂O, die dem Volumen an eingesetzter Glasmilch entsprach, wurde das Pellet gelöst und für 5 Minuten bei 55°C inkubiert, wodurch die DNA wieder von der Glasmilch getrennt wurde und in Lösung ging. Die Glasmilch wurde für 30 Sekunden bei 14000 UpM pelletiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Menge an erhaltener DNA konnte in einer Gelelektrophorese anhand der Markerspuren verglichen und abgeschätzt werden.

3.1.5.2 Dephosphorylierung von DNA Fragmenten

Um bei einer Ligation von zwei Fragmenten die Selbstligation zu vermeiden, wurde eines der Fragmente, i.d.R. das größere Vektorfragment, durch Alkalische Phosphatase aus Shrimps ("SAP" - Amersham USB) dephosphoryliert. Dabei wurde 1 µg DNA in dem mitgelieferten SAP-Puffer (10x) für 1-2 Stunden mit 1 Enzymeinheit bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 20 Minuten inaktiviert und das Fragment direkt weiterverwendet.

3.1.5.3 Auffüllen von 5´-Überhängen ("Klenow-Blunten")

Wenn bei einer Klonierung keine komplementären Restriktionsschnittstellen zur Verfügung standen, wurde eines oder beide Enden eines Fragmentes aufgefüllt und in einer Ligation mit glatten Enden eingesetzt. Bei Schnittstellen mit 5´-Überhängen wurde das Klenow-Fragment zur Polymerisation der komplementären 3´-Enden benutzt.

Die DNA wurde nach einer Restriktion mit 10% des Volumens 3 M Natriumacetat und 2.5 Volumen reinem Ethanol für 30 Minuten bei - 20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA pelletiert durch Zentrifugation bei 14000 UpM in der Eppendorf Tischzentrifuge, danach mit 75% Ethanol gewaschen und in gewünschtem Volumen H₂O resuspendiert.

Zu der DNA wurde Klenow-Puffer (10x), je 33µM dNTP's und 10 Enzymeinheiten Klenow-Polymerase zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Weitere Schritte waren abhängig vom Verwendungszweck des Fragments. Entweder wurde das Fragment nach Inaktivierung der Klenow-Polymerase direkt zur Ligation eingesetzt oder in einer Gelelektrophorese eingesetzt und mittels Gene Clean isoliert.

3.1.5.4 Blunten durch Entfernen von 3´-Überhängen durch T4 DNA Polymerase

Einige Restriktionsenzyme lassen durch ihre Aktivität 3´-Überhänge entstehen, die durch das Klenow-Fragment der E.coli DNA Polymerase nicht aufgefüllt werden können. T4 DNA Polymerase besitzt dagegen 5´→3´-Polymeraseaktivität und 3´→5´-Exonucleaseaktivität. In einem Reaktionsansatz ohne dNTP´s besteht nur Exonucleaseaktivität.

Ein Ansatz enthielt mitgelieferten T4 DNA Polymerase Puffer (10x), T4 DNA Polymerase in ausreichender Menge, z.B. 2-5 Enzymeinheiten/ μ g, Fragment-DNA und H₂O und wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

3.1.5.5 Ligation von DNA Fragmenten

Für die Ligation wurde T4 Ligase verwendet, die im Unterschied zu E.coli DNA-Ligase auch glatte Enden verknüpft. T4 Ligase ist ATP-abhängig.

Für eine Ligation wurden die Fragmente auf einem Agarosegel aufgetragen und die Mengen anhand des Markers abgeschätzt. Wenn möglich wurde das (kleinere) Insert im Überschuß mit dem (größeren) Vektorfragment gemischt. Ideal ist ein molares Verhältnis von 1:5. In einen Ligationsansatz wurden 50 - 200 ng Vektor-DNA und entsprechend 200 - 500 ng Insert-DNA in T4-Ligase Puffer (10x) gemischt und eine Enzymaktivität zugesetzt, die von der Ligationsart abhing. "Blunt"-Ligationen erfordern ca. 50-fach höhere Enzymaktivitäten als Ligationen mit kohäsiven Enden. Ligationsansätze mit kohäsiven Enden wurden über Nacht bei Raumtemperatur, solche mit glatten Enden bei 12°C inkubiert und danach transformiert.

3.1.6 Methoden für den Nachweis von DNA Fragmenten

3.1.6.1 Radioaktive Markierung von Sonden DNA

Eine Markierung von DNA Fragmenten wurde mittels des "Random Primed DNA Labelling Kits" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) weitgehend nach Vorschrift durchgeführt. Dafür wurden 100 ng des DNA Fragments auf 9 μ l mit sterilem Wasser aufgefüllt, für 10 Minuten bei 100°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Auf Eis wurden jeweils 1 μ l der Nucleotide (dATP; dGTP; dTTP) und 2 μ l der Reaktionsmischung ("random Hexanucleotidprimer") zugegeben. Anschließend wurden 5 μ l (=50 μ Ci) α - 32 P-dCTP und 1 μ l Klenow Enzym zupipettiert und in einem vorbereiteten Heizblock für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 150 μ l TE, pH 8,0, zu dem Reaktionsansatz zugegeben und die nicht eingebauten Nukleotide durch Chromatographie mithilfe von "mini quick spin oligo columns" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) von der markierten DNA abgetrennt. Das Eluat, die markierte DNA, wurde 5 Minuten bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zur Hybridisierung eingesetzt.

3.1.6.2 "Southern Blot"

Ein "Southern Blot" dient dem Transfer und Nachweis von DNA Fragmenten, die in einer DNA Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Das Agarosegel wurde zunächst in 1 M HCl ca. 15 Minuten auf dem Schwenker inkubiert, bis die Bromphenolblau-Bande gelblich verfärbt war. Eine Behandlung der DNA mit HCl führt zu einer Depurinierung. Anschließend wird das Agaraosegel in 0,4 M NaOH in gleicher Weise geschwenkt, bis die gelbliche Färbung verschwunden ist. Als Laufpuffer für den Transfer der DNA auf eine Gene Screen Membran diente ebenfalls eine 0,4 M NaOH Lösung. Auf einer Glaswanne wurde eine Glasplatte mit Klebeband fixiert. Whatman Papier wurde so zurechtgeschnitten, daß es über die Glasplatte an beiden Seiten in die Glaswanne reichte. Das Whatman Papier wurde befeuchtet (mit 0,4M NaOH) und mit einer Glaspipette glattgerollt. Auf dieses Whatman Papier wurde das Agarosegel gelegt, darauf eine äguilibrierte Gene Screen Membran (mit 0,4 M NaOH) und darauf wiederum zwei äquilibrierte Whatman Papiere. Darüber wurde viel trockener Zellstoff gelegt und mit ca. 1 Kg beschwert. Die Wanne wurde mit dem Laufpuffer (0,4 M NaOH) befüllt. Es sollte sich ein Sog bilden, der den Puffer aus der Glaswanne durch das Gel in den trockenen Zellstoff saugt und die DNA Fragmente aus dem Gel dabei auf die Gene Screen Membran transferiert. Dieser Aufbau wurde über Nacht beibehalten. Am nächsten Tag wurde der pH Wert der Gene Screen Membran auf einem Whatman Papier, das mit Renaturierungspuffer getränkt war, zweimal je 10 Minuten neutralisiert. In einem UV-Crosslinker (Stratalinker) wurde die DNA kovalent mit der Membran verbunden. Die Membran wurde in einer Hybridisierungsröhre mit 15 ml Hybridisierungslösung (AAV), der eine radioaktiv markierte Sonde (3.1.6.1) zugesetzt wurde, bei 42°C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgenommen und die Membran 2x10 Minuten gewaschen mit Waschlösung 1 bei 42°C. Die Temperatur wurde dann erhöht auf 60°C, bei der die Membran 4-5 mal mit Waschlösung 2 von unspezifisch gebundener Sonden-DNA gereinigt wurde. Anschließend wurde die Membran auf Zellstoff getrocknet und für eine Autoradiographie einem Röntgenfilm exponiert.

3.1.7 PCR-Mutagenese

Eine gezielte Mutagenese innerhalb eines Plasmids, hier die Deletion eines Nukleotids, wurde mithilfe des "QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) nach Vorschrift durchgeführt. Es wurde ein Bereich mit der zu mutierenden Zielsequenz aus pTRH1-GFP in pUC18 (GenBank/EMBL # L09136) umkloniert. In der PCR Mutagenese fand das Annealing der Oligonukleotide (2.2.3) bei 55°C statt. Die Polymerisation bei 68°C wurde in 18 Zyklen für jeweils 12 Minuten durchgeführt. Eine Amplifikation des Plasmids durch die PCR wurde durch eine Gelelektrophorese mit 5 μl des PCR Ansatzes überprüft. Die Korrektheit der erhaltenen Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt. Ein möglichst kleiner Bereich um die mutierte Zielsequenz wurde in pTRH1-GFP rück-kloniert. Durch die Umklonierung vermeidet man unerwünschte Mutationen, die bei einer Amplifikation von DNA in einer PCR auftreten können.

3.1.8 Analyse der Proteinexpression in eukaryontischen Zellen

3.1.8.1 Herstellung der Zellextrakte

Zellextrakte wurden nach Transfektion von Zellen aus \varnothing 6 cm-Zellkulturschalen gewonnen. Die Zellen wurden abgeschabt, zentrifugiert mit 400 x g für 10 Minuten und in 250 μ l 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und darin für 5 Minuten lysiert. Chromosomale DNA wurde durch Beschallung in einem "Sonifier" in einem Wasserbad extern für 20 Sekunden bei 70% Leistung fragmentiert. Der Zellextrakt wurde 3 Minuten bei 100°C aufgekocht. Zellreste wurden kurz in der Eppendorf Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (14000 UpM) pelletiert und 10 - 20 μ l des Überstandes der Probe auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Zellextrakte nach Infektionen wurden von Zellen aus 48-well Zellkulturplatten hergestellt. Die Zellen wurden trypsiniert und zusammen mit dem Mediumsüberstand bei 400 x g für 10 Minuten pelletiert und in 50 μ l RIPA Puffer für 3 Minuten bei RT lysiert. Anschließend wurden die Proben wie beschrieben beschallt. Nach Zugabe von 50 μ l 2x SDS-Probenpuffer wurde der Extrakt aufgekocht und Zellreste abzentrifugiert. Es wurden jeweils 10 μ l des Extraktes auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.1.8.2 SDS-PAGE

Proteine wurden in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese in Mini-Gelen aufgetrennt. Seitlich wurden zwischen die Glasplatten Abstandhalter eingelegt, der untere Rand wurde mit Klebeband abgeklebt und mit heißer 0.5%iger Agarose möglichst dünn abgedichtet. Das Trenngel wurde eingegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Isopropanol abgezogen und die Acrylamidoberfläche mit H₂O gespült. Über das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nach der Polymerisation wurde der Kamm gezogen und die Geltaschen vorsichtig mit H₂O ausgespült. Das Klebeband wurde entfernt, das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebaut und diese mit 1x Tris-Glycin-Laufpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8; 375 mM Glycin; 0,1 % SDS) aufgefüllt. Die vorbereiteten Proben wurden aufgetragen und mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde fortgesetzt, bis die Bromphenolblau-Bande gerade aus dem Gel ausgelaufen war.

15 %igesTrenngel:

2,50 ml Kornberg Lösung A 1,25 ml Kornberg Lösung B 1,20 ml H_2O 33,3 μ l APS 10%ig 3,30 μ l TEMED

5 %iges Sammelgel:

250 μ l Lämmli A 625 μ l Kornberg Lösung C 1,60 ml H₂O 25,0 μ l APS 10%ig 5,0 μ l TEMED

3.1.8.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitocellulose-Membran

Ein Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte im "Semi-Dry"-Elektroblotverfahren. Auf drei Whatman Papiere wurde die Nitrocellulose-Membran aufgelegt und darauf das SDS-Polyacrylamidgel. Über das Gel wurden wiederum drei Whatman Papiere gelegt und die Blotkammer durch Aufsetzen der Kathode geschlossen und für einen guten Kontakt mit ca. 1000 g beschwert. Alle Komponenten dieses Blot-Aufbaus wurden vorher kurz in Western-Blot Transferpuffer (25 mM Tris-HCI , pH 8.0; 192 mM Glycin; 20 % Methanol) equilibriert. Bei 4°C wurde eine konstante Stromstärke von 60 mA (1 mA/cm²) angelegt und für 1 Stunde transferiert. Um zu überprüfen, ob der Transfer erfolgreich war, wurde die Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S Lösung (0.1 % Ponceau S; 1,5 % Trichloracetat; 1,5 % Sulfosalicylsäure; 4,5 % Essigsäure) gefärbt und mit PBS soweit entfärbt, bis Banden sichtbar waren. Die Banden des Protein-Markers wurden mit einem Kugelschreiber markiert, um sie nach der Immunodetektion verwenden zu können.

3.1.8.4 Coomassie-Färbung

In dieser Arbeit wurde eine Coomassie-Färbung nur zum Gegenfärben "geblotteter" SDS-Polyacrylamidgele verwendet.

Das Gel wurde für 20 Minuten in die Coomassie-Färbelösung (20 % Methanol; 7 % Eisessig; 1 % Coomassie-Blau) eingelegt und leicht geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung (20 % Methanol; 7 % Eisessig) geschwenkt, bis Proteinbanden deutlich erkennbar waren und das restliche Gel transparent.

3.1.8.5 Immunodetektion der transferierten Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran wurde diese in Blocklösung (PBS; 0,5% Tween 20; 10% Magermilchpulver) über Nacht bei 4°C geschwenkt. Die Membran wurde kurz in PBS-T (PBS; 0,5% Tween 20) geschwenkt und für mindestens 1 Stunde mit dem Erstantikörper auf dem Schwenker inkubiert. Alle Antikörper wurden in Blocklösung mit der Membran inkubiert. Nach dem 1. Antikörper wurde die Membran 2-3 mal für 5 Minuten mit PBS-T auf dem Schüttler gewaschen. Dann wurde der 2. Antikörper, der mit Peroxidase konjugiert war, 1:2000 in Blocklösung verdünnt und mit der Membran auf dem Schwenker für mindestens 1 Stunde inkubiert. Die Erstantikörper konnten in der Blocklösung mehrmals eingesetzt werden. Dafür wurde der Antikörperlösung 0.01% Natriumazid zugesetzt und bei 4 °C gelagert.

Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend 3 mal für 5 Minuten und danach mindestens 3 mal für 15 Minuten in PBS-T auf dem Schüttler gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels des Western Lightning™ Kits. In der Dunkelkammer wurden Röntgenfilme der Membran je nach Stärke des Signals für unterschiedliche Zeitspannen exponiert (<1 Sekunde bis 5 Minuten).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden in Plastik-Zellkulturflaschen oder -Schalen als adhärente Monolayer kultiviert. Als Medium wurde standardmäßig Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) verwendet, das mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (Stammlösung 10 mg/ml; Sigma) supplementiert wurde. Zellinien, die in anderen Medienzusammensetzungen kultiviert wurden, sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zum Teilen der Zellen wurde das Medium

abgenommen und die Zellen mit vorgewärmter 0.125% Trypsin/EDTA Lösung überschichtet. Eine beginnende Abrundung der Zellen wurde unter dem Mikroskop beobachtet und daraufhin wurde das Trypsin abgenommen. Die Zellkulturflaschen wurden kurzfristig bei 37°C inkubiert und die Zellen dann durch Klopfen gegen die Flasche vom Untergrund getrennt. Die Zellen wurden in 10 ml Medium (175 cm² Flasche) aufgenommen und in geeigneter Menge in neue Flaschen gegeben, oder die Zellen wurden gezählt und mit gewünschter Dichte in andere Zellkulturgefäße ausgesät.

Bezeichnung	Zellkulturmedium
A204	RPMI 1640 (Sigma), 10% FCS, 1% P/S
Calu-6	RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S
PC3	RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S
MCF-7	DMEM, 20% FCS, 1% P/S
MDA-MB-468	RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S
MH3924A	RPMI 1640, 20% FCS, 1% P/S
NHEM	M2 Medium (PromoCell, Heidelberg)

Tab. 8: Zellinien und verwendete Zellkulturmedien

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung von Zellen wurden diese eingefroren. Dazu wurden 1x10⁷ Zellen bei 400 x g sedimentiert und in 500 µl vorgekühltem FCS (4°C) aufgenommen. Diese Suspension wurde mit einem ebenfalls vorgekühlten Einfriermix (80% FCS / 20% DMSO) 1:1 gemischt und in einer vorbereiteten Kühlbox bei -80°C eingefroren. Die Einfrierbox wurde zuvor auf 4 °C gebracht. Im -80°C Gefrierschrank kühlt die Isopropanollösung dieser Box ca. 1°C pro Stunde ab. Nach 3 Tagen wurden die gefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurde ein Aliquot schnell im 37°C Wasserbad angetaut und noch als Eisklumpen in 20 ml vorgewärmtes Medium gegeben. Die Zellen wurden bei 400 x g sedimentiert und in neuem Medium für die Kultivierung aufgenommen.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

10 µl trypsinierter Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Um eine Unterscheidung lebendiger von toten Zellen treffen zu können, wurden die Zellen vorher mit einem gleichen Volumen Trypan-Blau gemischt. Zellen, deren Membranintegrität nicht mehr gegeben ist, werden durch diesen Farbstoff blau gefärbt.

Zellen aus 16 Kleinquadraten wurden ausgezählt. Die Zellzahl wird mit dem Kammerfaktor 10⁴ multipliziert, wodurch man die Zellzahl/ml Zellsuspension erhält.

3.3 Virologische Methoden

3.3.1 Präparation von rekombinanten viralen Vektoren

Zur Präparation von rekombinanten AAV-2 Vektoren wurden 293T Zellen nach der Kalziumphosphat-Methode mit dem jeweiligen Vektorplasmid und einem Verpackungs- und Helferplasmid pDP2 (Grimm et al., 2003b) kotransfiziert. Zur Präparation von rekombinanten H-1 Vektoren wurde das jeweilige Vektorplasmid mit dem Verpackungsplasmid pBK-CMVVP (Kestler et al., 1999) kotransfiziert. Die Transfektionen wurden in der Regel in 15 cm Zellkulturschalen durchgeführt. Dafür wurden 5x10⁶ 293T Zellen pro Zellkulturschale in 20 ml DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für eine AAV-2 Vektorpräparation mit 56 μg pDP2 und 18 μg Vektorplasmid pro Schale transfiziert (56μg pDP2; 18μg Vektorplasmid; 125μl 2,5M CaCl₂; ad 1250μl H₂O; 1250μl 2xHBSS, pH 7,06). Für die Präparation rekombinanter H-1 Vektoren wurden die Zellen mit 60 μg pBK-CMVVP und 30 μg Vektorplasmid pro Schale transfiziert (60μg pBK-CMVVP; 30μg Vektorplasmid; 125μl 2,5M CaCl₂; ad 1250μl H₂O; 1250μl 2xHBSS). In den vorbereiteten CaCl₂-DNA-Mix wurde unter beständigem leichten vortexen langsam die 2xHBSS Lösung zugegeben und für 90 Sekunden stehen lassen. Die Transfektionsmischung wurde dann in eine entsprechende Menge (20 ml pro Schale) gewärmtes Zellkulturmedium

gegeben. Auf diese Art können 5-10 Transfektionsansätze gleichzeitig vorbereitet werden. Zellkulturmedium der Schalen wurde gegen das Zellkulturmedium mit Transfektionsmischung (22,5 ml pro Schale) ausgetauscht und die Zellen wurden für 48 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde danach vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in 1-2ml PBS, pH 7,2, pro Schale resuspendiert. Es folgte eine dreimalige Frier-Tau-Lyse der Zellen bei abwechselnd -80°C und 37°C. Nach der ersten Frier-Tau-Lyse wurden der Zellsuspension 100 Units Benzonase (Sigma) pro ml Volumen zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Benzonase ist eine Endonuklease aus Serratia Marcescens, die hier verwendet wird, um die zelluläre DNA zu fragmentieren und so zu einer verbesserten Freisetzung der rekombinanten Vektorpartikel führt. Das Lysat wurde dann bei 4°C mit 3000 x g für 20 Minuten zentrifugiert um die zellulären Bestandteile abzutrennen.

3.3.2 Reinigung und Konzentration von rekombinanten Vektoren

Die Reinigung und Konzentration der rekombinanten Vektoren wurde nach einem modifizierten Protokoll von Zolotukhin (Zolotukhin et al., 1999) durchgeführt. Das Lysat der Vektorpräparation wurde in einer Dichtestufenzentrifugation mit OptiPrep™ (Sigma, Deisenhofen) konzentriert und gerinigt. OptiPrep ist eine 60%ige lodixanollösung, die mit PBS-MK Puffer (PBS, pH7,2; 2,5mM MgCl₂; 1mM KCL) verdünnt wurde, um andere Konzentrationen zu erhalten. In 40 ml Ultrazentrifugenröhrchen ("QuickSeal" 25x89 mm) wurden Iodixanollösungen mit unterschiedlicher Konzentration unterschichtet (7ml 15% lodixanol + 0,75M NaCl; 5ml 25% lodixanol + Phenolrot; 4ml 40% lodixanol; 4ml 60% lodixanol + Phenolrot). Durch die Anfärbung mit Phenolrot konnten die verschiedenen Schichten eindeutig voneinander unterschieden werden. Das Unterschichten wurde erreicht. indem eine sterile Pasteurpipette in die verjüngte Öffnung auf den Grund des Zentrifugenröhrchens gestellt wurde und die jeweiligen Lösungen durch das Lumen der hindurch langsam untereinandergelegt wurden. Das Pasteurpipette Vektorpräparationen (ca. 20 ml) wurde vorsichtig überschichtet. Die Zentrifugenröhrchen wurden vor der Zentrifugation sorgfältig austariert und mithilfe eines "Tube Sealers" versiegelt. Die Lysate wurden in einem 50.2Ti Rotor in einer Ultrazentrifuge mit 50.000 UpM für 2,5 Stunden zentrifugiert. Die Vektorpartikel sammeln sich in der 40%igen lodixanollösung (ungefärbt) an der Grenze zur 60%igen lodixanollösung (gelbe Färbung). Durch die Anfärbung mit Phenolrot konnten diese Grenzen erkannt werden. Kurz unterhalb der Grenzfläche wurde in das Zentrifugenröhrchen mit einer sterilen Kanüle mit einer 10 ml Spritze eingestochen und ca. 4 ml der lodixanollösung, die die Vektorpartikel enthielt,

Eine weitere Reinigung von AAV-2 Vektorpartikeln wurde gegebenenfalls mithilfe einer Affinitätschromatograpfie mit Heparin-Agarose Typl (Sigma) durchgeführt. Eine Chromatographie-Säule wurde mit 10 ml der Heparin-Agarose Suspension befüllt und mit 70 ml PBS-MK Puffer äquilibriert. Die Vektorpräparation in >40% lodixanol wurde mit PBS-MK Puffer auf das 5-fache Volumen verdünnt und auf die Säule gegeben. Das Säulenmaterial wurde mit 80 ml PBS-MK Puffer gewaschen. Die AAV-2 Vektoren wurden dann mit 15 ml PBS-MK Puffer mit 1 M NaCl (PBS, pH7,2; 2,5mM MgCl₂; 1mM KCL; 1M NaCl) eluiert.

Die Vektorpräparation wurde anschließend durch die Verwendung von VivaSpin20 Zentrifugalkonzentratoren (10.000 MWCO) auf ein Volumen von 1-2 ml konzentriert. Eine Konzentration und Dialyse der Vektorpräparationen konnte mit VivaSpin20 Konzentratoren auch direkt mit den Vektorpräparationen in lodixanol durchgeführt werden. Diese wurden mit PBS-MK verdünnt und durch wiederholtes Auffüllen mit PBS-MK und Konzentration von lodixanol gereinigt.

3.3.3 Titration von AAV-2 Vektorpräparationen- "Replication Dot Blot"

AAV-2 Vektorpräparationen werden in diesem Test auf der Ebene von replikationsfähigen Einheiten in einer Endpunkttitration quantifiziert. Dafür wurden 5 x 10³ HeLa RC32 (Salvetti et al., 1998) in 100 µl in jede Vertiefung einer 96-well Zellkulturschale ausgesät und über

Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Eine zu testende Vektorpräparation wurde mit DMEM / 10%FCS/ P/S geeignet verdünnt, z.B. 10 µl in 1000 µl Gesamtvolumen. Nachdem das Medium in den Vertiefungen A1 und B1 entfernt wurde, wurden 111 µl der verdünnten Vektorsuspension in einer Doppelbestimmung in die Vertiefungen A1/B1 der ersten Spalte gegeben. 11 µl aus diesen Vertiefungen A1/B1 wurden mit einer 8-Kanalpipette in die zweite Spalte pipettiert (A2-H2), gemischt, die Spitzen gewechselt und so fort. Es ergibt sich eine Verdünnungsreihe mit logarithmischen Verdünnungsstufen, wobei die erste in diesem Beispiel einem Titer von 10³ replizierenden Partikeln pro ml Virussuspension entspricht (100 µl einer 10⁻² Verdünnung). Anschließend wurde eine Überinfektion mit Adenovirus Typ 5 durchgeführt. Eine Adenoviruspräparation wurde mit Medium ohne FCS auf 5x10⁵ bis 1x10⁶ Partikel/ml verdünnt und jeweils 100 µl entgegen dem Konzentrationsgefälle der Vektorpräparation in jede Vertiefung pipettiert. Man erhält so eine Ad5 MOI=50-100. Die Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert, bis ein deutlicher zytopathischer Effekt (cpe) erkennbar war.

Danach wurden die Zellen einer Frier-Tau-Lyse unterzogen. In jede Vertiefung wurden dann 150 µl 1,5M NaOH zugegeben. Ein HybriDot Gerät wurde vorbereitet, indem ein PBS getränktes Whatman Papier der richtigen Größe aufgelegt wurde und darauf eine Nylonmembran (Gene Screen) der gleichen Größe, ebenfalls in PBS angefeuchtet. Das Gerät wurde verschraubt und jeweils 150 µl aus jeder Vertiefung der Zellkulturschale wurden Vertiefungen des HybriDot Gerätes überführt. Durch Unterdruck einer Saugstrahlpumpe wurde die Flüssigkeit durch die Membran gesaugt, wobei die DNA an der Membran gebunden wurde. Die Membran wurde vorsichtig aus dem Gerät entnommen und die DNA wurde 2 x 10 Minuten auf einem Whatman Papier, das mit Denaturierungspuffer getränkt war, denaturiert. Anschließend wurde die Membran auf gleiche Weise mit Renaturierungspuffer 2 x 10 Minuten inkubiert. Dann wurde die getrocknete Membran in einem "UV-Crosslinker" (Stratalinker) mit 120 mJ bestrahlt und die DNA so kovalent an die Membran gebunden. Nach einer Hybridisierung mit einer geeigneten ³²P-markierten Sonde, z.B. gegen das Transgen der Vektoren, und einer anschließenden Autoradiographie wurden Spots auf dem Film erkennbar. Die Spots, die bei höheren Verdünnungsstufen erkennbar sind, bedeuten, daß sich die Vektoren in den HeLa RC Zellen repliziert haben und so deren DNA nachweisbar geworden ist. Durch die Anzahl der Spots und den Verdünnungsfaktor der Vektorpräparation kann die Menge der enthaltenen replikationsfähigen Einheiten (ru) in einer Vektorpräparation ermittelt werden.

3.3.4 Titration von rH-1 Vektorpräparationen – "Replication Filter Center Assay"

Für eine Titration von rH-1 Viren wurde eine Infektion in 6 cm Schalen in 400 μ l Infektionsvolumen durchgeführt. Die Viruspräparation wurde in Verdünnungen mit VTE zwischen 10^{-2} - 10^{-6} in jeweils 400 μ l zur Infektion für 1 Stunde eingesetzt. Eine Negativkontrolle nicht-infizierter Zellen wurde mitgeführt. Nach 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und Nitrocellulosefilter mit einem Durchmesser von 25 mm wurden auf die Zellen aufgelegt. Die Filter wurden auf der Rückseite vorsichtig beschriftet und mit PBS befeuchtet. Dann wurden die Filter vorsichtig abgenommen und die anhaftenden Zellen wie oben beschrieben auf Whatman Papier denaturiert, renaturiert und die DNA dann durch UV-Crosslinking kovalent an die Membran gebunden. Hybridisierungslösung (H-1) wurde auf 65°C vorgewärmt und die Filter dann zu dieser Lösung gegeben. Heringssperm DNA oder andere gescherte DNA wurde nach Denaturierung bei 100°C für 5 Minuten zu einer Endkonzentration von 200 μ g/ml zu der Hybridisierungslösung gegeben und die Filter so für 1 Stunde prä-hybridisiert. Nach dieser Zeit wurde die radioaktiv markierte Sonde dazugegeben und die Filter wurden über Nacht bei 65°C hybridisiert.

Die Hybridisierungslösung wurde verworfen und die Filter wurden für 30 Minuten in Waschlösung1 und danach 2x1 Stunde in Waschlösung2 gewaschen. Die Filter wurden auf einem Whatman Papier getrocknet und auf einem anderen, mit einer Frischhaltefolie abgedeckt, in einer Expositionskasette fixiert. Ein Röntgenfilm wurde für 24-48 Stunden den Filtern exponiert. Durch die Anzahl von Schwärzungen auf dem Film zusammen mit der Verdünnung der Vektorpräparation der jeweilig dazugehörigen Filter kann die Menge an replikationsfähigen Vektoren (ru) in der Vektorpräparation bestimmt werden. Dabei muß das

Infektionsvolumen (400µI) und die Filterfläche gegenüber der Fläche der Zellkulturschale berücksichtigt werden.

3.3.5 Titration von rekombinanten Vektoren auf der Ebene der verpackten Genome – "Dot Blot"

Um Vektorpräparationen von rekombinanten AAV-2 Vektoren quantitativ mit denen von rekombinanten H-1 Vektoren vergleichen zu können, wurde die Menge an verpackten Genomen innerhalb einer Vektorpräparation bestimmt. Dafür wurden 10 μl einer gereinigten und konzentrierten Vektorpräparation mit 190 μl PBS und 100 μg DNasel (Roche) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. In 2 x Proteinase Puffer wurde Proteinase K (Roche) zu einer Konzentration von 500 μg/ml gegeben. 200 μl davon wurden zu der Vektorpräparation gegeben und wiederum für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die nun freien Vektorgenome wurden durch Zugabe von 4 μl 3M Natriumacetat, pH7,5, 1000 μl Ethanol und 20 μg Glycogen für mindestens 30 Minuten bei –20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA pellettiert durch Zentrifugation mit 16500 x g bei 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde es in 400 μl 0,4M NaOH, 10 mM EDTA resuspendiert. Diese Lösung wurde 1:10 und 1:100 verdünnt, indem 40 μl des DNA-haltigen Ansatzes mit 360 μl 0,4M NaOH, 10 mM EDTA Lösung gemischt wurden. Diese Ansätze wurden jeweils zweimal für Doppelbestimmungen hergestellt.

Wie beim replikativen Dot Blot (3.3.3) wurden die Proben mithilfe einer HybriDot Apparatur auf eine Gene Screen Membran transferiert, mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert und in einer Autoradiographie detektiert. Dabei wurde die Intensität der Schwärzungen in den verschiedenen Verdünnungen mit einem Standard verglichen. Dieser Standard enthielt Plasmid DNA in verschiedenen Konzentrationen zwischen 1,6 pg bis 25000 pg (25.000 / 5.000 / 1.000 / 200 / 40 / 8 / 1,6 pg). Durch Umrechnung zwischen Molekulargewicht und Molekülanzahl (1nt entspricht 330 g/l; 1Mol enthält 6,023x10²³ Moleküle [Avogadro-Zahl]) ergibt sich z.B. für 5000 pg eines 5000 Basenpaar großen, doppelsträngigen Plasmids eine Menge von 9,125x10⁹ einzelsträngigen Molekülen. Bei einer Berechnung der Menge an genomischen Einheiten pro ml in einer Vektorpräparation muß die anfangs eingesetzte Menge (10µl) und die jeweilige Verdünnung berücksichtigt werden.

3.3.6 Isolierung niedermolekularer DNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung der niedermolekularen DNA aus eukaryontischen Zellen wurde durchgeführt, um die Fähigkeit verschiedenen Zellinien zur Aufnahme der Vektorgenome darzustellen. Dafür wurden die jeweiligen Zellinien für 3 Stunden mit dem AAV-2 Vektor TRUF5 mit einer MOI=100 ru infiziert. Danach wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS Puffer, pH7,2, gewaschen. Die Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin/EDTA (3.2.1) vom Boden abgelöst und in 50 μ I PBS Puffer aufgenommen. Zu der Zellsuspension wurden 50 μ I 2 x Lysepuffer (20 mM Tris, pH 7,4; 20mM EDTA; 1,2% SDS) gegeben, dem zuvor 80 μ g/ml Proteinase K (Roche) zugesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde die zelluläre DNA mithilfe einer kleinen Kanüle (27G³/4) mechanisch geschert. Jeweils 50 μ I dieser Proben wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und in einem "Southern Blot" (3.1.6.2) detektiert.

3.4 Messmethoden

3.4.1 Analyse durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Fluoreszenz der GFP exprimierenden Reporterkonstrukte wurde im FACScan (488 nm Argon Laser; Beckton Dickinson) quantitativ bestimmt. 48 Stunden nach einer Infektion oder Transfektion wurden die Zellen mit 0,125% Typsin/EDTA Llösung behandelt, abgeschabt und bei 2000 UpM pelettiert (Heräus Zentrifuge). Das Pellet wurde einmal mit sterilem PBS gewaschen und in sterilfiltriertem PBS aufgenommen. Die Zellen konnten direkt für eine Messung eingesetzt werden.

In einer Messung wurden in der Regel 10.000 Ereignisse aufgenommen. Die Verstärkung wurde mithilfe nicht-infizierter Zellen eingestellt, um Fremdpartikel oder Zelldebris von den

Zellen abtrennen zu können, wofür "Forward Scatter" (FSC - Größe) gegen "Side Scatter" (SSC - "Granularität"/Streuung) aufgetragen war. Für die Messung der GFP Fluoreszenz wurde die Häufigkeit GFP-fluoreszierender Zellen bei einer bestimmten Intensität in einem Histogramm dargestellt, in dem nicht-infizierte Zellen innerhalb der ersten Dekade dargestellt wurden. Die FACS Datenaufnahme und Analyse wurde mit dem Programm "Cell Quest" durchgeführt. Die Fluoreszenzkanäle wurden nicht kompensiert, da die Fluoreszenz bei nur einer Wellenlänge bestimmt wurde.

3.4.2 "Cell killing" Test

Im "Cell killing" Test wurde die Viabilität von Zellen in einem MTT Test bestimmt. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Sigma) wird in den Mitochondrien von Zellen, deren mitochondriale Memran intakt ist, zu einem violetten Farbstoff Formazan reduziert. Formazan ist in wässriger Umgebung unlöslich. Der Umsatz von MTT zu Formazan dient als Maß für die Anzahl lebendiger Zellen.

Für den "Cell killing" Test wurden 2,5x10³ Zellen in jeder Vertiefung einer 96-well Zellkulturplatte ausgesät und unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen infiziert, wobei die Zellen in den Vertiefungen am Rand der Platte nicht verwendet wurden. Für jeden verwendeten Vektor und Zellinie wurden die Zellen in 30 Vertiefungen infiziert. Nach 48 Stunden wurde Ganciclovir (GCV) in verschiedenen Konzentrationen (0-1000µM) zu den Zellen gegeben. Nicht-infizierte Zellen wurden ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen mit GCV behandelt. Nach 5-tägiger Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurde 100µg MTT in 100µl Zellkulturmedium in jede Vertiefung gegeben und die Zellkulturplatten mit Aluminiumfolie verdunkelt. Die Zellen wurden so für 4 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Der Überstand aus den Vertiefungen wurde dann vorsichtig mit einer Saugstrahlpumpe abgesaugt. Um das Formazanpräzipitat zu lösen wurden 100µl Dimethylsulfoxid (DMSO) in jede Vertiefungen pipettiert und die Platten mit Parafilm abgedichtet. Unter leichtem Schütteln für 1-2 Stunden wurde das Formazan wieder gelöst. Die Proben aus den einzelnen Vertiefungen wurden in eine unbeschichtete 96-well Platte überführt und die optische Dichte der Proben mit einem ELISA-Reader bei 540 nm bestimmt. Dabei wurde eine Vertiefung, in der Regel H12, mit frischem DMSO gefüllt, um eine Messung gegenüber dem Hintergrundswert für das Lösungsmittel zu ermöglichen. In solch einer Platte befanden sich also Proben von nicht-infizierte Zellen, die mit GCV behandelt wurden, sowie Proben von infizierten Zellen die mit GCV behandelt wurden, und es befanden sich Proben von nicht-infizierte Zellen und von infizierten Zellen in der Platte, die nicht mit GCV behandelt wurden. Die gemessenen Werte der optischen Dichte von nichtinfizierten Zellen, die nicht mit GCV behandelt wurden, dienten als Maß für eine 100%ige Viabilität. Die Proben der anderen Zellen wurden damit verglichen und die jeweiligen Viabilitätswerte errechnet.

3.4.3 Quantifizierung der Luciferase-Expression

Die Luciferase aus *Renilla reniformis* verwendet als Substrat Coelenterazin. Die Luciferase Expression durch die verschiedenen Vektoren wurde mithilfe des "Renilla Luciferase Assay System" Kit (Promega) detektiert. 20 µl einer Probe wurden in Probenröhrchen mit 100 µl vorbereitetem Assay Mix vermischt und für 10 Sekunden im Luminometer (Lumat; Berthold Technologies) vermessen. Als Probe diente entweder ein Extrakt von *in vitro* infizierten Zellen oder Lysate von Leber- oder Tumorgeweben. Die Herstellung von *in vitro* Extrakten erfolgte nach den Angaben des Herstellers des verwendeten Kits. Für die Herstellung der Proben aus Leber- und Tumorgeweben wurden ca. 200 mg beziehungsweise 50 mg schwere Stücke in 1 ml Renilla Luciferase Lysepuffer mithilfe eines Ultra Turrax homogenisiert und lysiert. Dieses Lysat wurde direkt zur Quantifizierung der Luciferase-Expression eingesetzt oder bei –80°C gelagert.

Nach einer Bestimmung des Gesamtproteingehalts (3.4.4) in den einzelnen Proben wurden die gemessenen Lichteinheiten damit normalisiert.

Für die Bestimmung der Gesamtexpression wurden 100 µl der jeweiligen Einzelproben eines Tieres miteinander vermischt und in gleicher Weise die Luciferase Expression quantifiziert.

3.4.4 Proteinbestimmung in Gewebeproben

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge in Gewebeproben wurde das "Nano Orange® Protein Quantitation" Kit (Molecular Probes) nach Herstellerangaben verwendet. Die homogenisierten Gewebeproben wurden in den Verdünnungen 1:500; 1:1000 und 1:2000 in Doppelbestimmungen eingesetzt. Für die Messung eines Hintergrundswertes diente Renilla Luciferase Lysepuffer in den gleichen Verdünnungen. In jeder 96-well Platte wurde die Fluoreszenz von Proben mit Rinderserumalbumin Protein (BSA) in Mengen zwischen 39 ng/ml bis 5000 ng/ml bestimmt und so eine Referenzgerade erstellt. Mithilfe der Referenzgeraden und der gemessenen Fluoreszdaten konnten die Mengen an Gesamtprotein in den homogenisierten Gewebeproben bestimmt werden. Die Fluoreszenz der Proben wurden in einem Fluorometer bei 485nm/535nm (Extinktion/Emmission) für 1 Sekunde ermittelt.

3.5 Methodische Beschreibung der *in vivo* Untersuchung zur stimulierten Expression in transformierten Zellen

Die in vivo Untersuchung zur stimulierten Expression in transformierten Zellen wurde in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz vorgenommen. Bei ACI Ratten mit einem Gewicht von 200-250g wurde unter Inhalationsanästhesie mit Ethrane (Enflurane: Abbott's Laboratories) der Bauchraum geöffnet. Dafür wurde zunächst das Bauchfell rasiert und mit ethanolischem Desinfektionsmittel gereinigt. Mit einem ca. 4-5 cm langen Schnitt, der am verlängerten Brustbein der Ratten endete, wurde nacheinander die Haut und anschließend das Bauchfell (Peritoneum) mit einer chirurgischen Schere geöffnet. Mit kleinen Wattetupfern wurde die Leber fixiert und für die Injektion stabilisiert. Mit einer 1 ml Spritze und einer 27gauge Nadel wurden 1x10⁶ MH3924A Zellen in 100 µl in PBS Puffer in die Spitze des Leberlappens A injiziert. Es sollte dabei zu einer räumlich begrenzten Aufhellung des Gewebes kommen. Die Nadel wurde dort für kurze Zeit (30 Sekunden bis 1 Minute) ruhig belassen und anschließend vorsichtig herausgezogen, um einen Rücklauf der Injektion zu vermeiden. Das Bauchfell und die Haut wurden nacheinander mit resorbierbarem Nahtmaterial (Safil®) verschlossen. Innerhalb von 10 Tagen bildete sich ein Tumor. Nach dieser Zeit wurde eine zweite Operation mit gleichem Ablauf vorgenommen. Dabei wurden jeweils 1x10¹¹ genomhaltige Vektoreinheiten in 100 µl Volumen in den Tumor und in einen gut zugänglichen Leberlappen, in der Regel Leberlappen C, injiziert. Ratten, die rekombinante H-1 Vektorpräparationen erhalten hatten, wurden anschließend in einem Isolator unter Unterdruck gehalten. Nach 3 Tagen wurden diese Ratten mit CO2 getötet und die Lebern entnommen. Ratten, denen AAV Vektoren appliziert wurden, wurden 15 Tage nach der zweiten Operation getötet und deren Lebern entnommen. Die Lebern wurden in die einzelnen Leberlappen getrennt und bei -80°C aufbewahrt. Zur Aufarbeitung wurden die Tumoren vom Lebergewebe getrennt. Alle Gewebe wurden gewogen und so zerteilt, daß Tumorstücke ein durchschnittliches Gewicht von 50 mg und Stücke des Lebergewebes ein durchschnittliches Gewicht von 200 mg hatten. Die einzelnen Stücke wurden mit 1 ml Renilla Luciferase Lysepuffer (Promega) in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mithilfe eines Ultra Turrax homogenisiert. Die auf diese Art erhaltenen Proben wurden für die Quantifizierung der Luciferase-Expression (3.4.3) und die Gesamtproteinbestimmung (3.4.4) eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung und schematische Repräsentation des parvoviralen Hybridvektors TRH1

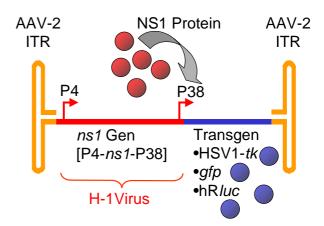
In dieser Arbeit wird ein parvoviraler Hybridvektor untersucht. Dieser Vektor besteht aus Komponenten des autonomen Parvovirus H-1 Virus und dem helferabhängigen AAV-2. Hintergrund der Herstellung des parvoviralen Hybridvektors war die Idee, den P4 Promotor der autonomen Parvoviren H-1 Virus bzw. MVMp zur onkoselektiven Expression in einem AAV-2 Vektor zu verwenden. Die Fragestellung dabei war, ob die Promotoraktivität auch in einem AAV-2 Vektor, wie zuvor durch isolierte Promotorstudien beschrieben, durch den Einfluss von Onkogenprodukten stimuliert wird und somit zu einer onkoselektiven Expression führt.

Die Kombination dieser Kassette aus H-1 Virus mit AAV-2 wurde gewählt, da AAV-2 Vektoren ein breites Spektrum von Zellen infizieren können. Die Produktions- und Reinigungstechniken für AAV-2 Vektoren erlauben die Herstellung reiner Präparationen mit hohen Titern ohne eine Kontamination durch wildtypähnliche Partikel. Diese Vektoren leiten sich von einem nichtpathogenen und nur gering immunogenem Virus ab und sind als Gentherapie Vektoren etabliert.

Wie einleitend beschrieben verwenden die Parvoviren auf genetischer Ebene zwei offene Leserahmen. Bei H-1 Virus und MVMp wird die DNA durch zwei Promotoren transkribiert, den frühen P4 Promotor, der die Expression der Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 treibt und den späteren P38 Promotor, unter dessen Kontrolle die Kapsidproteine VP1 und VP2 exprimiert werden. Dem multifunktionellen Nichtstrukturprotein NS1 werden Eigenschaften zugesprochen, die zur Onkoselektivität des H-1 Virus bzw. MVMp beitragen, so z.B. eine verstärkte Toxizität in transformierten Zellen (Mousset et al., 1994). Ausserdem wird der P38 Promotor selektiv durch NS1 transaktiviert (Koering et al., 1994) und das System aus P4 Promotor, NS1 Protein und P38 Promotor kann als verstärkende Kaskade angesehen

Abb. 10: Parvoviraler Hybridvektor TRH1

Die Abbildung veranschaulicht die angenommene Wirkungsweise des parvoviralen Hybridvektors TRH1. Die für die Verpackung in *cis* notwendigen ITRs von AAV-2 flankieren die P4-*ns1*-P38 Kassette aus H-1 Virus und ein Transgen, z.B. das Thymidinkinase-Gen aus Herpes Simplex Virus 1 (HSV1-*tk*), das Gen für das Grün-Fluoreszenz-Protein (*gfp*) oder das kodonoptimierte Gen der Renilla Luciferase (hR*luc*). Der P4 Promotor, der in transformierten Zellen versärkt aktiv ist, kontrolliert die Expression des Nichtstrukturproteins NS1. Der P38 Promotor, unter dessen Kontrolle das jeweilige Transgen exprimiert wird, wird selektiv durch NS1 Protein transaktiviert.



werden. Aus diesem Grund wurde die gesamte P4-*ns1*-P38 Expressionskassette zwischen die ITRs von AAV-2 eingefügt und unter die Kontrolle des durch NS1 Protein transaktivierbaren P38 Promotors wurde ein Transgen gestellt. Abbildung 10 illustriert die Funktionsweise des parvoviralen Hybridvektors TRH1.

Die Herstellung des Vektors (Abb. 11) erfolgte durch den Austausch der Expressionskassetten des AAV-2 Vektors TRUF2 (Zolotukhin et al.,1996) gegen die P4-*ns1*-P38 Kassette aus dem Vektorplasmid phH1Δ1600 (Kestler et al., 1999). Das Polyadenylierungssignal aus SV40 Virus wurde in dem AAV Vektor TRUF2 erhalten. Zwischen das Polyadenylierungssignal und den P38 Promotor wurden verschiedene Transgene kloniert, wie z.B. die Thymidinkinase aus Herpes Simplex Virus 1 (HSV1-*tk*), das "humanisierte" Grün-Fluoreszenz-Protein (h*gfp*) (Zolotukhin et al., 1996) oder die kodonoptimierte synthetische Renilla-Luciferase "hR*luc*" (Promega).

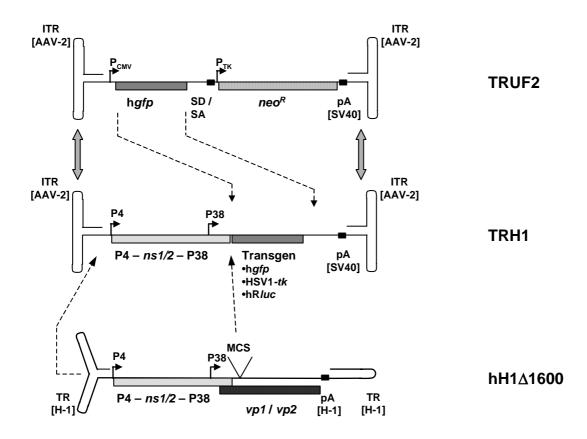


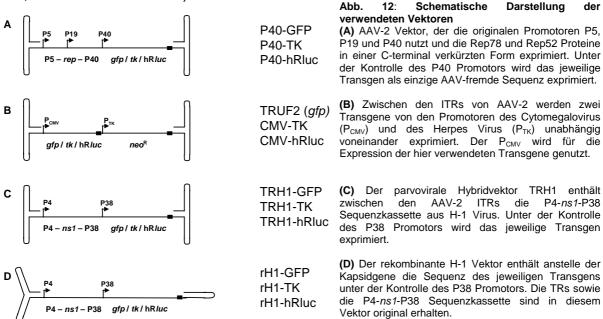
Abb. 11: Übersicht über die Konstruktion des Hybridvektors TRH1

Die P4-*ns1*-P38 Kassette aus phH1∆1600 (Kestler et al.,1999) wurde zwischen die ITRs von AAV-2 kloniert. Dazu wurde die gesamte Sequenz zwischen den ITRs aus pTRUF2 (Zolotukhin et al., 1996) entfernt. Unter die Kontrolle des P38 wurde ein Transgen gestellt, z.B. das humanisierte *gfp* aus TRUF2, das Herpes Simplex Virus 1 Thymidinkinase-Gen (HSV1-*tk*) oder das humanisierte Gen der Renilla Luciferase (hR*luc*). Für Details der Klonierung siehe "Material".

Das h*gfp* wurde in Transduktionsstudien als Reportergen verwendet und wird im Folgenden nur als *gfp* bezeichnet. In Tritium-Ganciclovir (³H-GCV) "Uptake-Versuchen" und in späteren

"Cell-killing Versuchen" wurde die HSV1-*tk* als Suizidgen eingesetzt. In den Tierexperimenten diente hR*luc* als Reportergen.

Die Eigenschaften des so gewonnenen Hybridvektors sollten mit denen des entsprechenden H-1 Vektors und weiteren AAV-2 Vektoren verglichen werden (Abb. 12). Für den H-1 Vektor wurden onkoselektive Eigenschaften beschrieben (Dupont et al., 1994; Gancberg et al., 2000; Dupont et al., 2000; Wetzel et al., 2001; Zeicher et al., 2003; Dupont et al., 2003; Cornelis et al., 2004). Der H-1 Vektor leitet sich von einem Vektorplasmid ab, das in dem offenen Leserahmen, der für die Kapsidproteine kodiert, um 1600 Basenpaare deletiert ist (Kestler et al., 1999). Anstelle des Kapsidgens wurde jeweils das Transgen insertiert (rH1-GFP, rH1-TK oder rH1-hRluc).



Ein rekombinanter H-1 Vektor ist fähig zur Replikation der DNA, verfügt aber nicht mehr über die Kapsidsequenzen und produziert keine Nachkommenviren. Ein anderes, analoges Vektorkonstrukt wurde von AAV-2 abgeleitet (Abb. 12A). Dieser Vektor enthält den linken offenen Leserahmen von AAV-2, der für die Rep Proteine kodiert und für deren Expression die originalen Promotoren P5 und P19 nutzt. Es werden durch diese Vektoren nur die ungespleissten Rep Proteine Rep78 und Rep52 in einer C-terminal verkürzten Form exprimiert (Daten nicht gezeigt). Unter der Kontrolle des P40 Promotors werden die Transgene anstelle der Kapsidgene exprimiert. Diese Vektoren P40-GFP und P40-TK sind ebenfalls prinzipiell replikationskompetent, jedoch verpackungsdefizient. Durch die Verwendung der originalen Promotoren und der Rep Proteine besitzt die Anwesenheit von Adenovirus 5 in einer gleichzeitigen Infektion einen starken Einfluss auf die Expression durch diese Vektoren (s. Einleitung 1.4.3/1.4.5).

Vielfach beinhalten virale Vektoren, die sich von AAV-2 ableiten, ausser den invertierten terminalen Sequenzwiederholungen keine weiteren AAV Sequenzen (Abb. 12B). Ein solcher

Vektor ist TRUF2 (Zolotukhin et al., 1996), ein bicistronischer Expressionsvektor, der von AAV-2 ITRs flankiert wird. Ein Promotor-Enhancer aus Cytomegalievirus (P_{CMV}) kontrolliert die Transkription des *gfp* Gens. Der CMV-Promotor-Enhancer gilt als konstitutiver, starker Promotor. Ein weiteres Gen, das Neomycin Resistenzgen, steht unter der Kontrolle eines Promotors aus Herpes Simplex Virus (P_{TK}). Gegebenenfalls wurde das *gfp* aus TRUF2 gegen die HSV-*tk* (CMV-*tk*) oder hR*luc* (CMV-hR*luc*) ausgetauscht, um die Eigenschaften dieses Vektors mit den entsprechenden Hybridvektoren TRH1-TK oder TRH1-hR*luc* vergleichen zu können. Sowohl der TRUF2 Vektor und abgeleitete Derivate als auch der Hybridvektor enthalten keine *rep* Sequenzen und sind daher nicht zu einer AAV-2 Rep Protein vermittelten Replikation der Vektor-DNA fähig.

4.2 Transduktion in vitro

Die Transgenexpression eines viralen Vektors ist ein entscheidendes Kriterium für den Verwendungsbereich dieses Vektors. Der Hybridvektor TRH1 wurde konstruiert, um Transgene in transformierten Zellen zu exprimieren. AAV Vektoren werden als Gentherapievektoren in verschiedenen Gebieten untersucht. Die Verwendung von AAV-2 Vektoren zur Behandlung von Tumorerkrankungen ist dabei aber eher unterrepräsentiert (Ponnazhagan et al., 2004), vermutlich aufgrund seiner Transduktionseigenschaften. Die Transduktionseigenschaften von AAV-2 Vektoren können jedoch vielfältig moduliert werden durch die Verpackung der Vektorgenome in Kapside anderer Genotypen (Grimm, 2002), durch die Modifikation des AAV-2 Kapsids (Girod et al., 1999; Müller et al. 2003), durch die Verwendung von selbstkomplementären Vektoren (McCarty et al., 2001) oder durch verschiedene stimulierende Einflüsse. Als stimulierende Einflüsse auf Adeno-assoziierte Viren und davon abgeleitete Vektoren wurden Koinfektionen mit Adenovirus (Fisher et al. 1996b; Ferrari et al., 1996), Herpes- oder Vacciniavirus (Schlehofer et al., 1986) beschrieben, sowie die Behandlung der zu infizierenden Zellen mit Cemikalien wie Hydroxyharnstoff, Etoposid (Russel et al., 1995) oder Tyrphostin (Mah et al., 1998) oder durch Gamma- oder UV-Bestrahlung (Alexander et al., 1996; Yakobson et al., 1989). Mit Ausnahme der Helferviren und von Tyrphostin, das die EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase inhibiert, können diese stimulierenden Einflüsse unter dem Begriff des genotoxischen Stress zusammengefasst werden (Yalkinoglu et al., 1988).

Die Transduktionseigenschaften des Hybridvektors TRH1 sollten daher mit denen anderer AAV-2 Vektoren in Abhängigkeit von bekannten expressionssteigernden Stimuli verglichen werden, um den Vektor zu charakterisieren und mögliche Kombinationen mit Medikamenten zu untersuchen, die in einer Tumortherapie eingesetzt werden können.

4.2.1 Der Einfluß von Adenovirus 5 als Helfervirus auf die Transduktion der AAV-2 Vektoren

Vorläufige Transduktionsstudien hatten ergeben, dass die Transduktion von HeLa Zellen durch den Hybridvektor TRH1 in Abwesenheit von Adenovirus 5 als Helfervirus effizienter war, verglichen mit der durch TRUF5. Es sollte daher zunächst untersucht werden, in welcher Weise die Transduktion durch den Hybridvektor durch Koinfektion mit Adenovirus 5 gesteigert werden kann. In dieser Analyse wurden HeLa Zellen durch die drei AAV-2 Vektoren P40-GFP, TRUF5 und TRH1-GFP (Abb. 12A-C) mit verschiedenen MOIs infiziert, entweder in Abwesenheit oder in einer Koinfektion mit Adenovirus 5 mit einer konstanten MOI von 10. Der prozentuale Anteil der GFP exprimierenden Zellen wurde 48 Stunden danach in einer FACS Analyse bestimmt und als Maß zur Bestimmung der Transduktion verwendet (Abb. 13A).

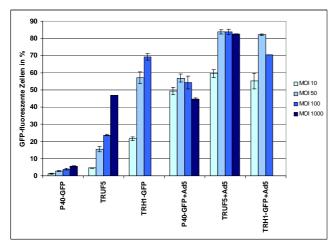


Abb. 13 A: Transduktion von HeLa Zellen mit verschiedenen AAV Vektoren in Abhängigkeit von einer Adenovirus Koinfektion

HeLa Zellen wurden durch die Vektoren P40-GFP, TRUF5 oder TRH1-GFP mit den angegebenen MOIs infiziert und gegebenenfalls mit Adenovirus5 (MOI 10) koinfiziert. 48 Stunden danach wurden von mindestens 5000 Zellen in einer FACS Analyse der Anteil der GFP-fluoreszenten Zellen bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung durch eine Bestimmung in Dreifachwerten. Bei hohen MOIs war eine Bestimmung in Dreifachwerten nicht immer möglich (TRUF5 +/-Ad, MOI 1000; TRH1+Ad, MOI 100), so daß nur eine Einfachbestimmung durchgeführt wurde.

In Abwesenheit von Adenovirus 5 erzielte der Vektor P40-GFP nur sehr geringe Transduktionsraten zwischen 1% (MOI 10 ru) und fast 6% bei einer MOI von 1000 (ru). Der Vektor TRUF5, der das *gfp* unter der Kontrolle des CMV Promotors / Enhancers exprimiert, erzielte bei einer MOI von 10 (ru) auf HeLa Zellen eine Transduktion von 4,5%, die abhängig von der eingesetzten MOI gesteigert werden konnte auf eine Transduktionsrate von 47% bei einer eingesetzten MOI von 1000 (ru). Der Hybridvektor transduzierte bei einer MOI von 10 (ru) 22% der HeLa Zellen. Eine Erhöhung der MOI führte hier ebenso zu einer Steigerung der Transduktionsrate bis auf 69% GFP exprimierender Zellen bei einer MOI von 100 (ru). In einer Koinfektion von P40-GFP und Adenovirus 5, jeweils mit einer MOI von 10, exprimierten 49% der Zellen GFP Protein. Durch eine Erhöhung der MOI des AAV Vektors P40-GFP ließ sich der Anteil der GFP exprimierenden Zellen nur noch wenig steigern auf 56% bei einer MOI von 50 (ru). Die Transduktionsrate sank sogar leicht ab, wenn die MOI des AAV Vektors P40-GFP weiter gesteigert wurde auf 100 (ru) oder 1000 (ru). Rep Proteine besitzen die Fähigkeit, die Replikation von Adenovirus zu inhibieren und ein kritischer,

wechselseitiger Einfluss der MOIs von Adenovirus 2 und AAV-2 wt auf die Expression der Kapsidproteine von AAV-2, anstelle derer in diesem Vektor P40-GFP das *gfp* inseriert wurde, ist beschrieben (Weger et al, 1997).

Bei einer Koinfektion von TRUF5 (MOI 10 ru) und Adenovirus 5 (MOI 10) wurde eine Transduktionsrate von 59% GFP exprimierender Zellen erzielt. Diese ließ sich durch eine Erhöhung der MOI auf 50 (ru) des AAV Vektors TRUF5 auf fast 84% steigern. Eine weitere Erhöhung der AAV MOI führte nicht zu einer Steigerung der Transduktionsraten durch TRUF5.

In einer Koinfektion des Hybridvektors TRH1-GFP (MOI 10 ru) mit Adenovirus 5 (MOI 10) wurde der Anteil der GFP exprimierenden HeLa Zellen auf 55% bestimmt. In einer Koinfektion mit einer MOI 50 (ru) des Hybridvektors exprimierten 82% der Zellen das GFP. Eine Erhöhung der TRH1-GFP MOI auf 100 (ru) führte zu einer verminderten Transduktionsrate von 70%. Das NS1 Protein besitzt wie die Rep Proteine die Fähigkeit, heterologe Promotoren zu beeinflussen (Legendre et al., 1994) und könnte einen Einfluss auf die Expression des Adenovirusgenoms ausüben. Vermutlich ist jedoch die Zytotoxizität des NS1 Proteins gemeinsam mit der lytischen Eigenschaft von Adenovirus 5 die Ursache für eine verminderte Transduktionsrate bei einer hohen MOI von TRH1-GFP.

Die AAV Vektoren, die hier verglichen werden, wurden in denselben MOIs eingesetzt, aber sie erzielten unterschiedliche Transduktionsraten. Die Bestimmung des Titers erfolgte durch eine "replikative Dot Blot Titration" (s. Methoden 3.3.3), durch die replikations- und verpackungsfähige virale Einheiten in Anwesenheit von Adenovirus 5 und Rep- und Cap Proteinen bestimmt werden. Die maximal erzielten Transduktionsraten in Anwesenheit von Adenovirus 5 gleichen sich bei den Vektoren TRUF5 und TRH1-GFP. Dennoch besitzen diese Vektoren in Abwesenheit von Adenovirus 5 eine unterschiedliche Fähigkeit zur Transduktion von HeLa Zellen, wobei der Hybridvektor effizienter transduziert als TRUF5, der wiederum bei gleicher MOI HeLa Zellen besser transduziert als P40-GFP.

Koinfektionen der AAV Vektoren mit Adenovirus 5 führten bei allen Vektoren zu einer Steigerung der Anzahl exprimierender Zellen, verglichen mit den Transduktionsraten in Abwesenheit von Adenovirus 5 (Abb. 13B).

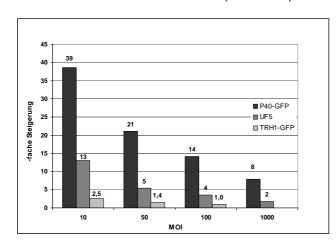


Abb. 13 B: Steigerung der Transduktion durch Adenovirus 5 Koinfektion

Darstellung der Steigerung der Transduktion der verschiedenen AAV-2 Vektoren durch den Einfluß einer Adenovirus 5 Koinfektion in Abhängigkeit von der eingesetzten MOI der Vektoren.

Die Steigerung der Transduktion durch den Einfluß von Adenovirus 5 nimmt mit zunehmender MOI der AAV Vektoren ab. Während die Transduktionsraten in Abwesenheit von Adenovirus 5 mit steigender MOI der AAV Vektoren zunehmen, erreicht die Transduktion bei allen AAV Vektoren einen maximalen Wert in einer Koinfektion des AAV Vektors mit einer MOI von 50 (ru) und Adenovirus 5. Abhängig auch von der Fähigkeit des jeweiligen Vektors zur Transduktion in Abwesenheit von Adenovirus unterscheiden sich die Werte eines unterstützenden Einflusses durch Helfervirusfunktionen, der jedoch für alle Vektortypen besteht.

4.2.2 Der Einfluß genotoxischer Agenzien auf die Transduktion durch die AAV-2 Vektoren

Für die Charakterisierung der Transduktionseigenschaften dieses Hybridvektors, der erwartungsgemäß in transformierten Zellen verstärkt exprimieren soll, ist es besonders interessant, den Einfluß von genotoxischen Agenzien zu untersuchen, die bereits zur Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Eine große Gruppe von werden, Medikamenten, die zur Chemotherapie eingesetzt die alkylierenden Chemotherapeutika, erzielen ihre toxische Wirkung in prolifierierenden Zellen durch intraund intermolekulare Vernetzung der zellulären DNA. UV- und γ-Bestrahlung von Zellen führt ebenfalls zur Schädigung der zellulären DNA durch die Bildung von Basendimeren und DNA-Strangbrüchen.

4.2.3 Transduktionssteigerung durch γ-Bestrahlung

 γ -Bestrahlung ist eine vielfach angewandte Methode zur Tumorbehandlung, z.B. bei chirurgisch unzugänglichen Tumoren. Ein Einfluß von γ -Bestrahlung auf die Transduktion von AAV-2 Vektoren *in vitro* und *in vivo* wurde beschrieben und auf eine Beschleunigung der Zweitstrangsynthese zurückgeführt (Peng et al., 2000; Kanazawa et al., 2001; Kanazawa et al., 2003). Um den Einfluß von γ -Bestrahlung auf die Transduktion durch die verschiedenen Vektoren zu quantifizieren, wurde zunächst die Viabilität von HeLa Zellen nach unterschiedlichen Strahlungsdosen durch Cäsium-137 in einem Zell-Viabilitätstest (MTT Test) bestimmt. Gleichzeitig wurde in einem Vorversuch der Einfluß der Bestrahlung auf die Transduktion durch TRUF5 in Einfachwerten ermittelt (Abb. 14A). Die halblethale Dosis von 50 Gray (Gy) wurde für die Untersuchung der Wirkung von γ -Bestrahlung auf die Transduktion durch die AAV Vektoren verwendet, da hier die höchste Transduktion erzielt werden konnte.

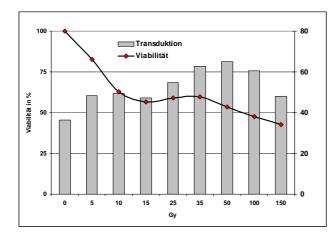
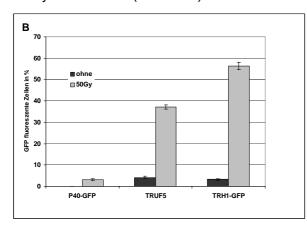


Abb. 14 A: Viabilität und Transduktion von HeLa Zellen nach Bestrahlung mit ¹³⁷Cs

HeLa Zellen wurden in 3 cm Zellkulturschalen in einem "Gammacell 1000" unterschiedlichen Strahlungsdosen zwischen 5 und 150 Gray (Gy) ausgesetzt. Die Viabilität der Zellen wurde 48 Stunden danach in einem Viabilitätstest (MTT Test) bestimmt (schwarze Linie). Parallel dazu wurden ebenso bestrahlte Zellen mit TRUF5 mit einer MOI von 100 (ru) infiziert und die Anzahl GFP-fluoreszenter Zellen in einer FACS Analyse bestimmt (graue Balken). Der höchste Anteil GFP-fluoreszenter Zellen wird nach einer nahezu halblethalen Bestrahlung mit 50 Gy erzielt.

Für den Vergleich der Transduktionseigenschaften der Vektoren wurden HeLa Zellen in 3 cm Zellkulturschalen bestrahlt und direkt im Anschluß mit einer MOI von 10 (ru) mit den AAV Vektoren P40-GFP, TRUF5 und TRH1-GFP infiziert oder ohne vorherige Bestrahlung infiziert. Nach 48 Stunden wurde der Anteil GFP-fluoreszenter Zellen durch eine FACS Analyse bestimmt (Abb. 14B).



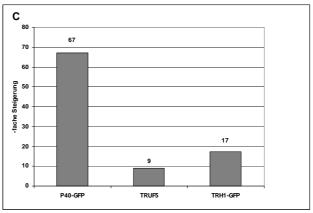


Abb.14B/C: Vergleich der Transduktion der verschiedenen Vektoren in Abhängigkeit von einer γ-Bestrahlung
(B) Transduktion von HeLa Zellen durch die AAV-2 Vektoren P40-GFP, TRUF5 und TRH1-GFP (MOI 10 ru) in Abhängigkeit von einer γ-Bestrahlung (50 Gy). Die Fehlerbalken repräsentieren Dreifachwerte.
(C) Darstellung der Steigerung der Transduktion durch eine vorherige γ-Bestrahlung der HeLa Zellen mit 50 Gy. Die Zahlen

über den Balken geben die -fache Steigerung an.

Eine Transduktion durch den Vektor P40-GFP war ohne Bestrahlung nicht messbar (0,05%). In einer Infektion nach γ -Bestrahlung exprimierten 3% der Zellen GFP. Die Vektoren TRUF5 und TRH1-GFP transduzierten 4% beziehungsweise 3% der Zellen ohne vorherige Bestrahlung. Nach Bestrahlung konnten bei 37% beziehungsweise 56% der Zellen GFP Expression gemessen werden. Die nicht erhöhte Basistransduktion des Hybridvektors TRH1-GFP gegenüber dem Vektor TRUF5 ist vermutlich auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen, denen möglicherweise die Passagenzahl der Zellen oder der Zustand der Vektorpräparation durch häufiges Einfrieren und Auftauen zugrunde liegt.

Durch die nahezu nicht messbare Transduktion durch den Vektor P40-GFP ergibt sich ein sehr hoher Steigerungsfaktor von 67 (Abb. 14C). Durch eine vorhergehende γ -Bestrahlung

konnte unter diesen Bedingungen die Transduktion durch den herkömmlichen Vektor TRUF5 9-fach, die des Hybridvektors TRH1-GFP 17-fach gesteigert werden. Diese Stimulation ist vergleichbar mit der durch Adenovirus 5 Koinfektion.

4.2.4 Transduktionssteigerung durch UV-Bestrahlung

UV-Bestrahlung führt ebenfalls zu einer Steigerung der Transduktion von AAV-2 Vektoren. Ein Mechanismus für diese Steigerung ist nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass Elemente des zellulären DNA-Reparatursystems daran beteiligt sind, die ausgehend von der einzelsträngigen Vektor DNA zur Bildung zirkulärer "Head-to-Tail" Intermediate führen. Diese zirkulären Intermediate unterscheiden sich von den replikativen Formen, die in einer Koinfektion mit Adenovirus beobachtet werden (Sanlioglu et al., 1999; Sanlioglu et al., 2000). Um die Dosis für eine UV-Bestrahlung zu ermitteln, wurden HeLa Zellen unterschiedlichen Strahlungsdosen ausgesetzt zwischen 0 und 100 J/m². Dafür wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und mit PBS gewaschen. Die Flüssigkeit wurde möglichst vollständig abgegossen, um eine homogene Bestrahlung zu gewährleisten. Nach 48 Stunden wurde die Viabilität der Zellen bestimmt (Abb. 15A) und die daraus resultierende halblethale Dosis von 25 J/m² wurde für den folgenden Transduktionsvergleich der Vektoren

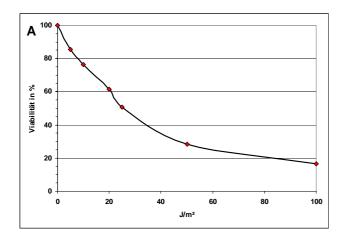
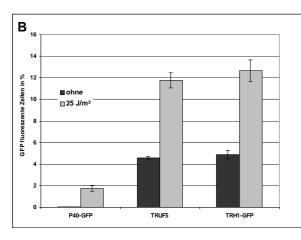


Abb. 15 A: Viabilität von HeLa Zellen nach Bestrahlung mit UV-Licht

HeLa Zellen wurden in 3 cm Schalen in einem Stratalinker mit unterschiedlichen Strahlungsdosen mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. 48 Stunden danach wurde die Viabilität durch einen MTT Test bestimmt. Durch eine Bestrahlung mit 25 J/m² sterben 50% der Zellen ab.

verwendet. Um den Einfluß von UV-Bestrahlung auf die Transduktion der AAV Vektoren zu vergleichen, wurden HeLa Zellen in 3 cm Zellkulturschalen wie beschrieben bestrahlt und direkt im Anschluß mit einer MOI von 10 (ru) infiziert oder ohne vorherige Bestrahlung infiziert. Der Anteil GFP exprimierender Zellen in Abhängigkeit von UV-Bestrahlung ist in Abb. 15B gezeigt.



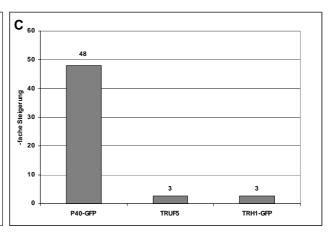


Abb. 15B/C: Der Einfluß von UV-Bestrahlung auf die Transduktion der verschiedenen AAV-2 Vektoren
(B) HeLa Zellen wurden in 3 cm Zellkulturschalen in einem Stratalinker mit UV-Licht (254 nm) mit 25J/m² bestrahlt und anschließend mit den AAV Vektoren P40-GFP, TRUF5 oder TRH1-GFP mit einer MOI von 10 (ru) infiziert oder ohne vorherige Bestrahlung infiziert. Nach 48 Stunden wurde in einer FACS Analyse der Anteil GFP fluoreszenter Zellen bestimmt. Die dunkelgrauen Balken zeigen die Basistransduktion der Vektoren, die hellgrauen stellen die Transduktion von bestrahlten Zellen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren Dreifachwerte.

(C) Darstellung der Steigerung der Transduktion durch vorherige UV-Bestrahlung. Die Zahlen über den Balken geben die –fache Steigerung an.

Eine Basistransduktion durch P40-GFP war nahezu nicht messbar (0,04%). Nach Bestrahlung exprimierten 1,8% der Zellen GFP. Die Vektoren TRUF5 und TRH1-GFP transduzierten fast 5% der Zellen. Eine vorherige Bestrahlung führte zu einer Transduktion von 12% beziehungsweise 13% der Zellen. Das entspricht einer 3-fachen Steigerung der Transduktion durch die Vektoren TRUF5 und TRH1-GFP durch eine vorherige UV-Bestrahlung der Zellen mit 25 J/m² (Abb. 15C). Sanlioglu et al. finden bei einem vergleichbaren Experiment eine 4-5-fache Steigerung der Transduktion durch einen AAV-2 Vektor in Fibroblasten (Sanlioglu et al., 2000).

Der Wert einer 48-fachen Steigerung der Transduktion von P40-GFP durch UV-Bestrahlung ist vermutlich durch die sehr geringe Basistransduktion mit einem hohen Fehler behaftet. Eine Steigerung der Transduktion durch vorherige UV-Bestrahlung der Zellen um den Faktor 3 ist ein deutlich geringerer Effekt als man ihn durch γ -Bestrahlung erzielen konnte. Ausserdem ist in einer therapeutischen Anwendung eine Bestrahlung durch UV-Licht eher oberflächlich möglich, während γ -Bestrahlung eine mögliche Perspektive für eine kombinierte Therapie aus Gentherapie mit AAV Vektoren und γ -Bestrahlung bietet.

4.2.5 Der Einfluß von Cisplatin, Mitomycin und Carmustine (BCNU) auf die Transduktion von AAV-Vektoren

Im Gegensatz zum Einfluß der Bestrahlung von Zielzellen ist der Einfluß der Chemotherapeutika Cisplatin, Mitomycin und Carmustine (BCNU) auf die Transduktion mit AAV-2 Vektoren nicht untersucht. Cisplatin ist ein zytostatisch wirksamer, anorganischer Schwermetallkomplex. Platin bildet Addukte mit der zellulären DNA durch die Interaktion mit

N-7 von Guanin oder Adenin, insbesondere an d(pGpG) Sequenzen und führt so zu einer Vernetzung desselben DNA Stranges (Zwelling, 1986). Mitomycin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylantien. Diese vernetzen die zelluläre DNA in verschiedenen Strängen, aber auch die Alkylierung von zellulären Membranen könnte zu ihrer toxischen Wirkung beitragen (Connors,1986; Hartigh et al., 1986). Carmustine (BCNU) ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Nitrosoharnstoffe, die zu Vernetzungen zwischen den zellulären DNA Strängen über das O-6 von Guanin führen.

Eine Wirkungsdosis von Mitomycin und Cisplatin wurde in einem MTT Test ermittelt (Abb. 16A).

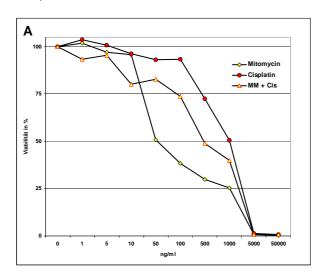
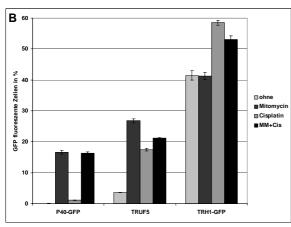


Abb. 16 A: Viabilität von HeLa Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Medikamente Mitomycin oder Cisplatin.

HeLa Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mitomycin, Cisplatin oder einer Kombination von beiden in gleichen Gewichtsanteilen (MM+Cis) für 48 Stunden inkubiert. Die Viabilität wurde in einem MTT Test bestimmt.

Dafür wurden HeLa Zellen mit steigenden Konzentrationen dieser Medikamente für 48 Stunden inkubiert. Bei der Kombination beider Medikamente wurden gleiche Gewichtsanteile eingesetzt. Mitomycin wurde für die Untersuchung des Einflusses auf die Transduktion von AAV Vektoren in einer Konzentration von 250 ng/ml eingesetzt und Cisplatin mit der halblethalen Dosis von 1 µg/ml. Für die Kombination beider Medikamente wurde eine Konzentration von jeweils 125 ng/ml gewählt. In einem Vorexperiment wurde untersucht, ob die Behandlung der Zellen mit den Medikamenten für 4 Stunden gegenüber 48 Stunden einen Einfluß auf die Viabilität der Zellen besitzt. In der Dosiswirkung zeigten sich dabei keine Unterschiede. Daher wurden die folgenden Infektionen gleichzeitig mit der Zugabe der Medikamente durchgeführt. Abbildung 07 B zeigt die Transduktion von HeLa Zellen durch die verschiedenen AAV-2 Vektoren (MOI 10 ru) und den Einfluß der Medikamente Mitomycin und Cisplatin darauf. Ohne eine Stimulation ist durch den Vektor P40-GFP wiederum nahezu keine Transduktion messbar (0,06%). Die Anwesenheit von Mitomycin in einer Infektion führt bei diesem Vektor zu einer Transduktion von über 16% der HeLa Zellen. Cisplatin hat auf die Transduktion durch diesen Vektor nur einen geringen Einfluß (1% GFP exprimierende Zellen). Die Transduktion von TRUF5 läßt sich von 3,6% auf fast 27% steigern durch die Anwesenheit von Mitomycin in der Infektion. Auch auf die Transduktion durch diesen Vektor



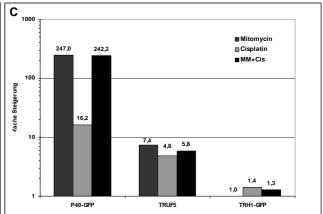


Abb. 16B/C: Der Einfluß von Mitomycin und Cisplatin auf die Transduktion von AAV-2 Vektoren
Abb. 07 B zeigt die Transduktion von HeLa Zellen durch die Vektoren P40-GFP, TRUF5 oder TRH1-GFP (jeweils MOI 10 ru) in
Abwesenheit von Medikamenten ("ohne"; hellgraue Balken), in Anwesenheit von 250 ng/ml Mitomycin (dunkelgrau), in
Anwesenheit von 1 µg/ml Cisplatin (mittelgrau) oder in einer Kombination von jeweils 125 ng/ml Mitomycin und Cisplatin
("MM+Cis"; schwarze Balken). Die Fehlerbalken repräsentieren Dreifachwerte.
Abb. 07 C stellt die erzielten Steigerungen der Transduktion durch eine Behandlung der Zellen mit Mitomycin (dunkelgrau) oder

Cisplatin (hellgrau) oder in einer Kombination von beiden ("MM+Cis"; schwarze Balken) dar.

hat Cisplatin einen geringeren Einfluß (17%) als Mitomycin. TRH1-GFP zeigt in diesem Experiment eine hohe Basistransduktion von 41% der Zellen, die sich durch die Anwesenheit von Mitomycin nicht steigern läßt, allerdings aber durch die Anwesenheit von Cisplatin (58%).

In einer Kombination beider Medikamente wird die Transduktion der Vektoren stimuliert. Dabei vermittelt die Anwesenheit von 125 ng/ml Mitomycin vermutlich den Effekt auf die Vektoren P40-GFP und TRUF5, während die Anwesenheit von 125 ng/ml Cisplatin zu einer Steigerung der Transduktion von TRH1-GFP führt. Der vermittelte Effekt der Medikamente auf die Transduktion ist dosisabhängig, wie zuvor auch schon in der Kombination einer Infektion von AAV-2 Vektoren mit Bestrahlung beobachtet. Abbildung 16C stellt die Werte der Steigerung der Transduktionen in diesem Experiment zusammen. Durch die hohen Werte einer über 240-fachen Stimulierung durch Mitomycin für den Vektor P40-GFP ist die Darstellung logarithmisch. Auch hier ist durch die geringe Basistransduktion für diese Werte eine Variabilität wahrscheinlich. Die Transduktion von TRUF5 wird durch die Anwesenheit von Mitomycin 7-fach, durch die von Cisplatin 5-fach gesteigert. Diese Stimulierung ist vergleichbar mit der durch γ -Bestrahlung. Durch die hohe Basistransduktion von TRH1-GFP liegt der Wert für eine Steigerung durch Cisplatin in diesem Experiment nur bei 1,4-fach, wohingegen Mitomycin keinen Einfluß auf die Transduktion von TRH1-GFP besitzt.

Das unterschiedliche Potential von Mitomycin gegenüber Cisplatin zur Unterstützung einer Transduktion von AAV Vektoren deutet darauf hin, daß die Anwesenheit der Medikamente diesen Effekt auf unterschiedliche Weise vermitteln. Mitomycin und Cisplatin verursachen unterschiedliche Schädigungen in der zellulären DNA, die unterschiedliche Reparaturmechanismen erfordern.

BCNU als ein weiteres angewandtes Medikament zur Therapie von malignen Gliomen wurde in einer Konzentration von 20µg/ml eingesetzt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde in diesem Fall die Angabe der Dosierungsanleitung verwendet. HeLa Zellen wurden wie oben beschrieben infiziert und die Transduktion in Abhängigkeit von einer Behandlung mit BCNU bestimmt (Abb. 17A).

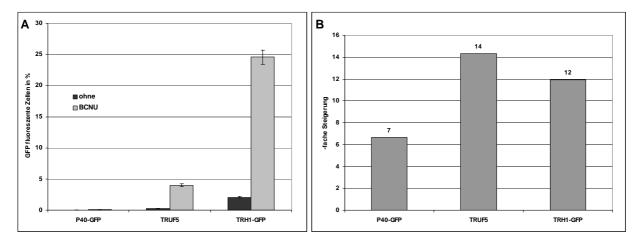


Abb. 17A/B: Der Einfluß von BCNU auf die Transduktion durch die verschiedenen AAV-2 Vektoren
(A)Transduktion von HeLa Zellen mit P40-GFP, TRUF5 oder TRH1-GFP (MOI 10 ru) in Abhängigkeit von der Anwesenheit von BCNU (20µg/ml). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.
(B)Darstellung der Steigerung der Transduktion der verschiedenen Vektoren durch Behandlung der Zellen mit BCNU. Die Zahlen über den Balken geben die –fache Steigerung an.

Die Anwesenheit von BCNU führt nicht zu einer effizienten Transduktion von P40-GFP, während die Transduktion durch TRUF5 14-fach gesteigert werden kann und die von TRH1-GFP 12-fach (Abb. 17B).

Zusammenfassend besitzen offensichtlich verschiedene Medikamente so wie eine γ -Bestrahlung der Zielzellen die Fähigkeit, die Transduktion von AAV Vektoren zu steigern und zwar ähnlich stark, wie sie durch Koinfektion mit einem Helfervirus (Ad5) gesteigert wird. Dabei verhält sich der Hybridvektor nicht grundsätzlich anders als die Vergleichsvektoren. Obwohl bei der Behandlung mit Mitomycin und Cisplatin einige medikamentenspezifische Unterschiede sichtbar wurden, scheint der ermittelte Wert der Steigerung durch eine Zusatzbehandlung wesentlich von der basalen Transduktion abzuhängen. Ebenso wie in einer möglichen Kombinationstherapie aus AAV vermitteltem Gentransfer und γ -Bestrahlung bietet die Kombination aus AAV vermitteltem Gentransfer in einer Kombination mit ausgewählten Chemotherapeutika eine interessante Perspektive für einen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Tumoren.

4.3 Vergleich der Stärke der Expression nach Transfektion

Um die Expression der Vektoren unabhängig von der Einzelstrangkonversion zu vergleichen, wurden 293 T Zellen in 6 cm Zellkulturschalen mit jeweils 5 µg der Vektorplasmide pP40-GFP, pTRUF2, pTRH1-GFP und phH1-GFP transfiziert. Der Anteil der transfizierten Zellen und die Fluoreszenz-Intensität auf der Ebene einzelner Zellen wurde in einer FACS Analyse bestimmt (Abb. 18).

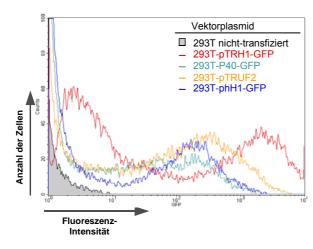
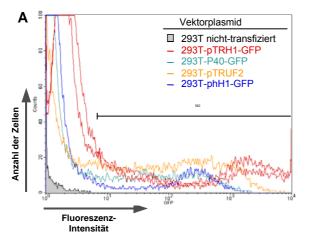


Abb. 18: Die Fluoreszenz-Intensität als Maß der Stärke der Expression auf der Ebene einzelner Zellen

293T Zellen wurden mit den verschiedenen Plasmiden pTRH1-GFP (rot), pP40-GFP (hellblau), pTRUF2 (gelb) und phH1-GFP (blau) transfiziert. Nach 48 Stunden wurde in einer FACS Analyse der Anteil exprimierender Zellen und deren Fluoreszenz-Intensität bestimmt. Die Abbildung zeigt die übereinandergelegten Histogramme der FACS Analyse.

Der Anteil fluoreszenter Zellen nach den Transfektionen mit den verschiedenen Plasmiden ist untereinander vergleichbar. Der größere Anteil der pTRH1-GFP transfizierten Zellen zeigt dabei eine GFP Fluoreszenz mit höherer Intensität, verglichen mit den Transfektionen mit den anderen Plasmiden. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden die Transfektionen wiederholt, wobei zwei verschiedene Präparationen des Plasmides pTRH1-GFP verwendet wurden (Abb. 19A). Gleichzeitig wurde ein Immunoblot gegen GFP durchgeführt (Abb. 19B).



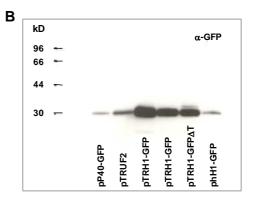


Abb. 19 A/B: Vergleich der Stärke der Expression auf der Ebene der Einzelzellexpression und der Gesamtexpression durch FACS Analyse und Immunoblot

Abbildung 19 A zeigt eine Wiederholung des Experiments von Abbildung 18. Abbildung 19B vergleicht die GFP Expression in denselben Proben durch eine Immunodetektion gegen GFP (α GFP). Die Proben sind auf die Gesamtproteinmenge normalisiert. Die Intensität der Banden wird so nur durch die Stärke der Expression und die Anzahl exprimierender Zellen beeinflusst.

In Abbildung 19A sind die Transfektionseffizienzen zwischen den einzelnen Transfektionen unterschiedlicher als in Abbildung 18. Es bestätigte sich dennoch, daß der größte Anteil der pTRH1-GFP transfizierten Zellen eine höhere Fluoreszenz-Intensität zeigte als die Zellen, die durch die anderen GFP-kodierenden Vektorplasmide transfiziert wurden. In beiden FACS Analysen scheint in den Transfektionen mit dem Plasmid pTRH1-GFP die nicht-fluoreszente Zellpopulation eine Fluoreszenz-Intensität zu besitzen, die sich von der nicht-transfizierten Kontrollpopulation unterscheidet. Dieser Effekt ist in einer schwächeren Form auch bei den Transfektionen mit den anderen Plasmiden zu beobachten und kann möglicherweise durch freies GFP aus lysierten Zellen erklärt werden, das extrazellulär mit den Zellmembranen assoziiert. Solch ein Effekt wurde bei Infektionen mit nicht-gereinigten Vektorpräparationen als Pseudotransduktion beschrieben (Alexander et al., 1997).

Abbildung 19B vergleicht die Menge an GFP in einem Immunoblot. Die Proben wurden dafür auf eine gleiche Menge an Gesamtprotein abgeglichen. Die Stärke des Signals entspricht also der Stärke der Gesamtexpression, wobei für die Auswertung des Immunoblots die Transfektionseffizienz berücksichtigt werden muß. Die GFP Expression ist am Stärksten in der ersten Transfektion mit pTRH1-GFP und etwas geringer in der zweiten Transfektion. Dieser Unterschied beruht vermutlich auf der etwas geringeren Effizienz dieser Transfektion. Die GFP-Expression von den Plasmiden pP40-GFP, pTRUF2 und phH1-GFP war deutlich geringer als die von pTRH1-GFP. Dieser Unterschied läßt sich nicht ausschließlich durch eine geringere Transfektionseffizienz begründen. Die Kassette P4-ns1-P38 zeigte eine sehr starke Transgenexpression in durch NS1 Protein dem replikationsdefizienten Vektorhintergrund von pTRH1-GFP und exprimierte dort das Transgen GFP sogar stärker als im ursprünglichen, replikationskompetenten Vektorhintergrund von phH1-GFP.

Es wurde der Versuch unternommen, dem Vektor TRH1-GFP die Fähigkeit zur Replikation durch NS1 Protein zu vermitteln, in der Annahme, daß eine größere Menge an Vektor-DNA zu einer Verstärkung der Expression führen würde (für eine detailliertere Beschreibung siehe Anhang 7.1). Dieser Vektor enthält den inaktiven Teil des Replikationsursprungs von MVMp. Durch die Deletion eines Nukleotids im Replikationsursprung (pTRH1-GFPΔT) konnte erreicht werden, daß der Vektor durch NS1 Protein vermittelt replizierte. Allerdings fand eine solche Replikation in HeLa Zellen nur mit einer hohen MOI (200 ru) und in Anwesenheit von Adenovirus 5 statt. Da eine Verstärkung der Expression durch diesen Vektor nicht erreicht wurde, wurde dieser Vektor nicht weiter verwandt.

4.4 Erstellung eines Profils infizierbarer Tumorzellinien durch die Vektoren rH1-GFP und TRH1-GFP

Die Vektoren TRH1-GFP und rH1-GFP beinhalten und exprimieren das Transgen GFP von der selben Genkassette P4-*ns1*-P38-*gfp*. Sie unterscheiden sich jedoch durch die flankierenden Sequenzen. Das sind im Falle von AAV-2 die ITRs und im Falle von H-1 die TRs (siehe Abbildung 12C und D). Ein weiterer Unterschied dieser Vektoren besteht in dem jeweiligen Kapsid von AAV-2 bzw. H-1 Virus, die an unterschiedliche zelluläre Rezeptoren binden. Daher kann man erwarten, daß verschiedene Zelltypen von den beiden Vektoren mit unterschiedlicher Effizienz transduziert werden. Da die Expressionskassette zu einer tumorspezifischen Genexpression führen sollte, wurden verschiedene Tumorzellinien unterschiedlicher Gewebe mit beiden Vektoren infiziert. Die AAV Vektoren P40-GFP und TRUF5, die in Tumorzellen jeweils geringere Transduktionen zeigten als der Hybridvektor, wurden nicht in den Vergleich mit einbezogen.

4.4.1 Das Spektrum infizierbarer Zellen unterscheidet und ergänzt sich

Für die Erstellung eines Spektrums infizierbarer Zellen wurden humane transformierte Zellinien von der Tumorbank des DKFZ Heidelberg mit unterschiedlicher Tumorklassifizierung und unterschiedlichem Gewebeursprung verwendet. Bei gleicher Charakteristik von verschiedenen Zellinien wurde aufgrund der Verfügbarkeit ausgewählt. Das primäre Anliegen des Experiments war der direkte Vergleich der Infizierbarkeit durch einen rekombinanten H-1 Vektor gegenüber einem AAV-2 Vektor, dem Hybridvektor TRH1-GFP.

Bezeichnung	Tumorart / Gewebeherkunft	Referenznummern
HeLa	Zervix-Adenokarzinom / Zervix	TZB # 810015 / ATCC: CCL-2
A204	Rhabdomyosarkom / Muskel	TZB # 610019 / ATCC: HTB-82
Calu-6	Lungenkarzinom / Lunge	TZB # 810119 / ATCC: HTB-56
DU-145	Prostatakarzinom / Metastase Gehirn	TZB # 610022 / ATCC: HTB-81
PC3	Prostata-Adenokarzinom(GIV) / n.b.	TZB # 630153 / ATCC: kein Eintrag
MCF-7	Mamma-Adenokarzinom / Mamma	TZB # 610030 / ATCC: kein Eintrag
MDA-MB-468	Mamma-Adenokarzinom / Mamma	TZB # 630248 / ATCC: kein Eintrag
H4	Neurogliom / Gehirn	TZB # 610025 / ATCC: HTB-148
SK-N-MC	Neuroblastom / Metastase Gehirn	TZB # 610035 / ATCC: HTB-10
TE 671	Medulloblastom / Gehirn	TZB # 610040 / ATCC: kein Eintrag
U-87MG	Glioblastom-Astrocytom(GIII) / Gehirn	TZB # 630176 / ATCC: HTB-14

Tabelle 9: Zusammenstellung der verwendeten humanen Tumorzellinien für den Vergleich der Infizierbarkeit durch rH1-GFP bzw. TRH1-GFP

Die TZB # ist die Referenznummer der Tumorbank im DKFZ Heidelberg. Gegebenenfalls ist dahinter die American Tissue Culture Collection (ATCC) Referenznummer angegeben. DKFZ Intranet-Adresse der Tumorsteckbriefe: http://info/abtd0100/vitidxde.htm

Für den Vergleich der Infizierbarkeit wurden die Vektorpräparationen auf ihren Gehalt an verpackten Genomen titriert. Dieser Art der Titration ist unabhängig von einer Referenzzellinie (s. Methoden 3.3.5). Die Zellen wurden in 24-Loch Platten ausgesät und mit einer MOI von 10⁵ genomhaltigen Partikeln pro Zelle infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fotografiert und der Anteil fluoreszenter Zellen in einer FACS Analyse bestimmt (Abb. 20). Abbildung 20A gibt einen visuellen Eindruck von der Effizienz der Transduktion. Die Bilder auf der linken Seite sind Durchlichtaufnahmen (DL) der jeweiligen Zellinie nach einer Infektion mit dem Hybridvektor TRH1-GFP (links oben) und dem Vektor rH1-GFP (links unten). Jeweils rechts daneben sind die GFP-fluoreszenten Zellen (FL) derselben Ausschnitte gezeigt. Erwartungsgemäß führt eine Infektion von HeLa Zellen zu einer guten Transduktion durch beide Vektoren. Diese Infektion zeigt das Potential der Vektoren auf und gibt eine qualitative Vergleichsmöglichkeit zur Beurteilung der Infizierbarkeit der anderen verwendeten Zellinien.

In den Durchlichtaufnahmen sind abgerundete Zellen zu erkennen, die in der Fluoreszenzaufnahme häufig GFP-fluoreszent sind. Dieser Effekt ist in den Infektionen beider Vekoren zu erkennen, er ist jedoch deutlicher ausgeprägt in der Infektion von HeLa Zellen mit rH1-GFP und ist vermutlich auf die cytotoxische Aktivität von NS1 Protein zurückzuführen. Abbildung 20B zeigt die FACS Analysen der Infektionen mit TRH1-GFP (grüne Linie) und rH1-GFP (rote Linie) gegenüber nichtinfizierten Zellen (schwarze Linie, grau gefüllt), die grafisch übereinandergelegt wurden. In einer Infektion von HeLa Zellen mit rH1-GFP zeigt das Histogramm eine Anzahl von Zellen mit hoher Fluoreszenzintensität unter dem Markerbereich 1 (M1) und auch eine Anzahl von Zellen, die sich in ihrer Fluoreszenzintensität deutlich von nicht transduzierten Zellen unterscheiden, die aber im Bereich der Autofluoreszenz der HeLa Zellen unter dem Markerbereich 2 liegen. Hier wurde die Anzahl der Zellen unter den Bereichen M1 und M2 als Anteil transduzierter Zellen gewertet. Dabei wurde aber der Anteil der nicht infizierten HeLa Zellen unter dem Markerbereich 2 von diesen Werten subtrahiert. HeLa Zellen wurden so zu 52% bzw. 76% von den Vektoren TRH1-GFP bzw. rH1-GFP transduziert. In gleicher Weise wurde bei den Zellinien MDA-MB 468 und U-87MG verfahren. Bei allen anderen Zellinien diente der Markerbereich 1 zur Auswertung der Transduktion.

4. Ergebnisse

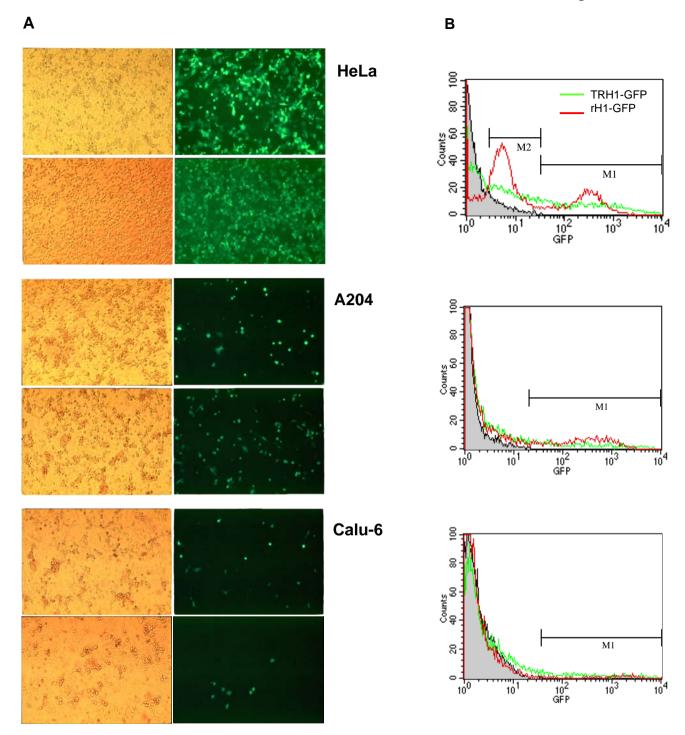
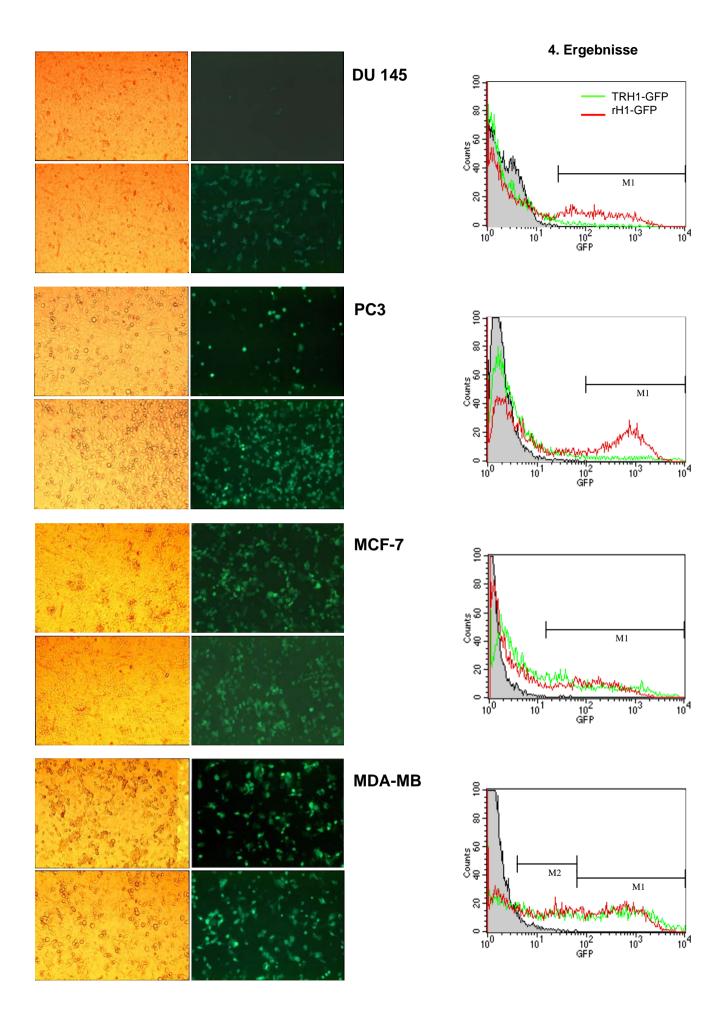


Abb. 20A/B: Vergleich der Infizierbarkeit verschiedener Tumorzellinien durch die Vektoren TRH1-GFP und rH1-GFP

(A) zeigt die Zellmorphologie als mikroskopische Durchlichtfotografie der angegebenen Zellinie nach 48-stündiger Infektion mit dem rekombinanten AAV Hybridvektor TRH1-GFP (links oben) oder dem rekombinanten H-1 Vektor (links unten). Die Aufnahmen jeweils rechts davon sind Fluoreszenzaufnahmen desselben Ausschnittes. GFP exprimierende Zellen sind durch die grüne Fluoreszenz zu erkennen.

(B) zeigt die FACS Analysen als Overlay-Darstellungen von nicht-infizierten Zellen der jeweiligen Zellinie (grau ausgefüllt) und Zellen, die durch den Hybridvektor TRH1-GFP (grüne Linie) bzw. rH1-GFP (rote Linie) infiziert wurden. In den Overlay-Darstellungen ist der Markerbereich angegeben (M1), der für die Analyse verwendet wurde.



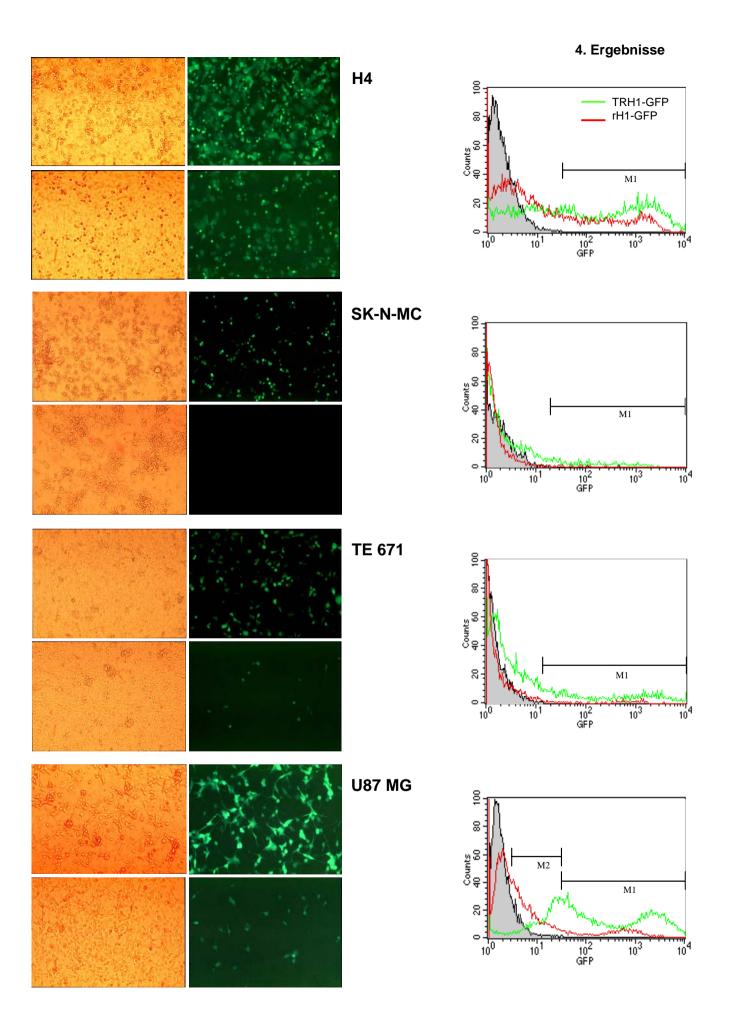


Abbildung 21 faßt die Transduktionsraten der Vektoren in den verschiedenen Tumorzellinien in einem Balkendiagramm zusammen. Aufgrund der hohen Transduktionsraten fallen die Zellinien U-87MG (Glioblastom) und MDA-MB (Mamma-Adenokarzinom) auf. Während die Anzahl der exprimierenden Zellen bei der Mamma-Adenokarzinomzellinie MDA-MB-468 nach Infektion durch die Vektoren sehr ähnlich ist (60% GFP-positive Zellen), wie auch bei der anderen Mamma-Adenokarzinomzellinie MCF-7 (20–30%), ist die Glioblastomzellinie U-87MG sehr viel besser durch den Hybridvektor TRH1-GFP infizierbar (86% vs. 35%). Ebenso sind die Zellinien H4 (Neurogliom) und TE 671 (Medulloblastom) deutlich besser durch TRH1-GFP infizierbar als durch rH1-GFP. Genau umgekehrt verhält es sich bei den Zellinien DU-145 (Prostatakarzinom), PC3 (Prostata-Adenokarzinom), A204 (Rhabdomyosarkom) und auch bei HeLa Zellen (Zervixkarzinom). Die Zellinien Calu-6 (Lungenkarzinom) und SK-N-MC (Neuroblastom) sind überhaupt nur durch TRH1-GFP gering infizierbar (4%).

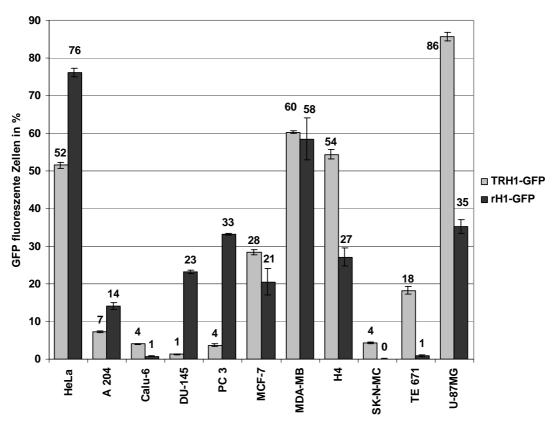


Abb. 21: Infizierbarkeit verschiedener Tumorzellinien durch TRH1-GFP und rH1-GFPDie Abbildung zeigt in einem Balkendiagramm den Vergleich der Transduktion (in %) der humanen Tumorzellinien durch die Vektoren TRH1-GFP (hellgrau) oder rH1-GFP (dunkelgrau). Die Zellen wurden mit einer MOI von 10⁵ genomischen Einheiten in einer Dreifachbestimmung infiziert und 48 Stunden danach wurde durch eine FACS Analyse der Anteil GFP fluoreszenter Zellen (%GFP) bestimmt. Der Anteil GFP fluoreszenter Zellen ist in Zahlen über den jeweiligen Balken angegeben.

Die Zellinien sind also in unterschiedlichem Maße durch die verwendeten Vektoren infizierbar. Bei einigen Zellinien könnten beide Vektoren für einen Gentransfer

genutzt werden, während andere Zellinien präferentiell durch einen Vektortyp infiziert werden. Auch wenn die Auswahl dieser Zellinien nicht repräsentativ ist, zeichnet sich eine Tendenz ab, in der das rekombinante AAV-2 TRH1-GFP ein großes Potential für einen Gentransfer in humane Zellen mit dem Ursprung aus Hirngewebe besitzt und ebenso wie der rekombinante H-1 Vektor rH1-GFP Mamma-Karzinomzellen effizient transduzieren kann. Prostatagewebe scheint nur wenig permissiv zu sein für einen Gentransfer durch den AAV Vektor, viel mehr aber für einen Gentransfer durch rH1-GFP. Diese Vektoren können sich also ergänzen in dem Spektrum infizierbarer Zellen. Durch die Möglichkeit einer Verwendung von Kapsiden der verschiedenen AAV Genotypen AAV1 und AAV3-8 kann das Spektrum des Hybridvektors TRH1-GFP noch erweitert werden.

4.4.2 Vergleichende Transduktion glialer Zellinien

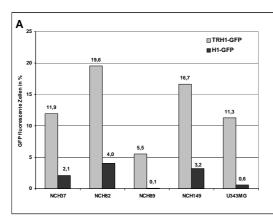
Aus dem Vergleich verschiedener humaner Tumorzellinien ist die Tendenz deutlich geworden, daß die Zellinien U-87MG (Glioblastom), H4 (Neurogliom) und TE671 (Medulloblastom) durch den Hybridvektor TRH1-GFP gut infizierbar waren und durch diesen AAV Vektor höhere Transduktionsraten erzielt werden konnten als durch den rekombinanten H-1 Vektor. Daher wurden weitere gliale Zellinien in der Transduktion durch diese Vektoren verglichen. Diese NCH Zellinien stammen aus unbehandelten humanen Tumoren und wurden freundlicherweise von Dr. Geletneky zur Verfügung gestellt.

Name	Klassifizierung	p53 Status *	
NCH 37	Gliosarkom ("low passage culture")	mut	
NCH 82	Glioblastom ("low passage culture")	wt	
NCH 89	Glioblastom ("low passage culture")	mut	
NCH 149	Glioblastom ("low passage culture")	mut	
U-343 MG	Glioblastom (etablierte Zellinie)	mut	

Tabelle 10 listet die verwendeten humanen glialen Tumorzellen auf, die in der Transduktion mit rH1-GFP und TRH1-GFP verglichen werden sollen. Siehe als Referenz für diese Zellinien Herrero Y Calle et al., Int.J.Cancer: 109, 76-84 (2004) und Herold-Mende et al., Lab Invest: 79, 1573-82 (1999)

Sie wurden wie im vorangegangenen Zellinienvergleich mit einer MOI von 10⁵ genomhaltigen Partikeln pro Zelle infiziert und die Transduktion wurde nach 48 Stunden im FACS bestimmt. Abbildung 22A zeigt die Transduktion durch die Vektoren TRH1-GFP beziehungsweise rH1-GFP im Vergleich. Alle verwendeten glialen Tumorzellinien waren unter diesen Bedingungen 5-50 -fach besser mit TRH1-GFP infizierbar (Abb. 22B).

^{*} Der p53 Status wurde von D. Weiss bestimmt (persönliche Mitteilung)



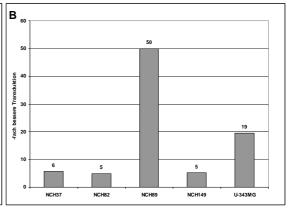


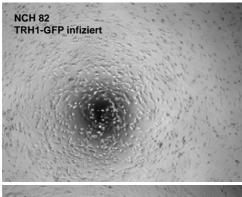
Abb 22A/B: Vergleich der Transduktion von glialen Tumorzellinien

- (A) Die Transduktion der verschiedenen Zellinien nach einer Infektion mit TRH1-GFP (hellgrau) oder rH1-GFP (dunkelgrau) mit einer MOI von 10⁵ genomhaltigen Partikeln pro Zelle ist vergleichend dargestellt. Diese Daten wurden aus einer Infektion gewonnen.
- (B) Höhere Transduktion der glialen Tumorzellinien durch TRH1-GFP gegenüber rH1-GFP Die Werte für den Vergleich der Transduktion (Abb.16A) sind die Grundlage für diese Darstellung



Abb. 23: Morphologie und Transduktion von NCH82 Zellen

Die Aufnahmen vermitteln einen visuellen Eindruck von der Morphologie (Durchlichtaufnahmen) und der Transduktion (Fluoreszenz Aufnahmen) von NCH 82 Zellen. Links oben sind NCH82 Zellen ohne Behandlung (nicht infiziert) gezeigt. In der Mitte sind NCH82 Zellen 48 Stunden nach Beginn einer Infektion mit TRH1-GFP oder unten rH1-GFP mit jeweils 10⁵ genomhaltigen Partikeln pro Zelle dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einer digitalen Kamera (Leitz DMRD; Leica) gemacht und sind als s/w Bilder gezeigt.





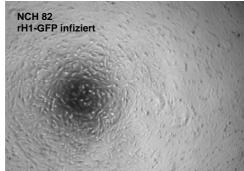




Abbildung 23 zeigt am Beispiel von NCH82 Zellen die Transduktion der Vektoren TRH1-GFP und rH1-GFP als GFP Expression und den Einfluß der Infektionen auf die Zellmorphologie.

Nicht infizierte NCH82 Zellen zeigen eine kompakte und spindelförmige Morphologie, von denen nur ein geringer Teil der Zellen nicht adhärent und abgerundet erscheint. Nach einer Infektion durch TRH1-GFP erscheint nur noch ein Teil der Zellen mit dieser Morphologie, während viele Zellen nur noch teilweise adhärent und amorph erscheinen und die Dichte der Zellkultur insgesamt reduziert ist. Eine Infektion mit rH1-GFP hat einen geringeren Effekt auf die Morphologie von NCH82 Zellen, vermutlich aufgrund der viel geringeren Transduktion.

4.4.3 Der Einfluß der Infektion durch den Hybridvektor TRH1-GFP auf den Zellzyklus der glialen Tumorzellen

Verschiedene Veröffentlichungen beschäftigten sich mit einem Einfluß einer Parvovirus Infektion auf den Zellzyklus der jeweiligen Zellen. Dabei wurde versucht, den Einfluß der Kapside von dem der Proteinexpression oder der Replikation zu unterscheiden (Raj et al., 2001) und den Einfluß der einzelnen AAV-2 Rep-Proteine (Saudan et al., 2000) oder des MVMp NS1 Proteins (op de Beeck et al., 2001) auf den Fortlauf des Zellzyklus zu untersuchen. Nach MVMp und AAV-2 Infektionen wurden Arretierungen in den verschiedenen Phasen G₁, S und G₂ des Zellzyklus beschrieben und eine Beteiligung von pRB, p53 und p21^{CIP1} an den Effekten dieser Infektionen wurden gezeigt (s. Einleitung 1.7). Es sollte nun untersucht werden, wie eine Infektion des Hybridvektors sich auf den Fortlauf des Zellzyklus auswirkt. Dafür wurden die NCH Zellinien NCH37, NCH82, NCH89 und NCH149 und Zellinie U-343MG mit 10⁵ genomhaltigen Partikeln pro Zelle infiziert. Nach 48 Stunden wurden parallel die Transduktionen und die Zellzyklusverteilungen in FACS Analysen bestimmt (Abb. 24). Dabei wurde deutlich, daß die Effizienz der Transduktion der Zellinien mit dem Vektor TRH1-GFP, also der GFP Expression, mit einem Einfluß auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus korreliert. In den effizient transduzierten Zellinien NCH 82 und NCH 149 ist der Anteil der Zellen mit 2n stark reduziert gegenüber nicht infizierten Zellen, während der Anteil der Zellen mit 4n erhöht ist und im Falle der NCH82 Zellen auch der Anteil der Zellen in S-Phase erhöht ist. Trotz geringerer Transduktion von nur 12,6 % der Zellen bei NCH 89 Zellen ist der Effekt auf den Zellzyklus sehr deutlich. Diese Akkumulation von Zellen mit 4n deutet auf einen Block in G₂/M hin. Indirekt können Parvoviren einen Effekt auf den Zellzyklus ausüben, da sie einzelsträngige DNA in den Kern der Zellen bringen und so einen

DNA Reparaturmechanismus induzieren könnten, z.B. über ATM Protein (Raj et al., 2001). Da der Effekt auf den Zellzyklus mit der Effizienz der GFP Expression und damit notwendigerweise der NS1 Expression verbunden zu sein scheint, wird der Block vermutlich durch NS1 Protein vermittelt. Das ist in Übereinstimmung mit dem Befund, daß NS1 Protein Zellen in G₂ arretieren kann (op de Beeck et al., 2001).

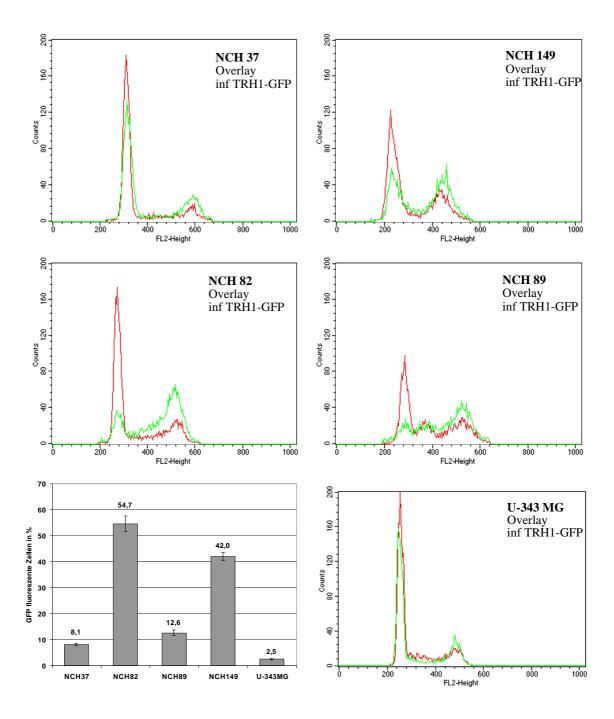


Abb. 24: Zellzyklusanalyse glialer Tumorzellinien nach einer Infektion mit TRH1-GFPDie Zellinien NCH 37, NCH 82, NCH89, NCH149 und U-343MG wurden mit TRH1-GFP mit einer MOI von 10⁵ genomischen Einheiten pro Zelle infiziert. Nach 48 Stunden wurde die Transduktion der verschiedenen Zellinien in Dreifachwerten bestimmt (links unten). Parallel dazu wurde ein Zellzyklusprofil der Zellen ohne Infektion (rote Linie) oder nach einer Infektion (grüne Linie) erstellt. Die FACS Histogramme dieser Analysen wurden grafisch übereinandergelegt (Overlay).

4.5 Vergleich der Expression in normalen gegenüber transformierten Zellinien

Durch eine gesteigerte oder selektive Expression in Tumorzellen können zytotoxische Proteine oder Suizidgenprodukte wie die HSV-1 Thymidinkinase in der Kombination mit Ganciclovir ihre Wirkung in den Tumorzellen entfalten, während das umgebende nichttransformierte Gewebe geschont wird. Durch die Herstellung des parvoviralen Hybridvektors sollte die Präferenz für eine Expression in transformierten Zellen der autonomen Parvoviren MVMp beziehungsweise H-1 Virus auf einen AAV Vektor übertragen werden. In vivo Experimente mit wt MVMp hatten gezeigt, dass durch eine Infektion von transformierten Zellen die Bildung von Tumoren durch diese Zellen verhindert wird und dass etablierte Tumoren durch eine Infektion zurückgebildet werden konnten (zur Übersicht s. Rommelaere und Cornelis, 1991; Cornelis et al., 2004). Diese Tumorpräferenz wird durch die Regulation der Aktivität des frühen P4 Promotors und der regulierten zytotoxischen Aktivität des NS1 Proteins erklärt. Der P4 Promotor der autonomen Parvoviren enthält verschiedene Promotorelemente, wie die E-Box, die Y-Box, die Creb-responsiven Elemente, die Ets-Bindungsstelle und die G-Box. Diese Elemente wurden getrennt voneinander untersucht und ihr Einfluß auf die Aktivität des Promotors, auch in Abhängigkeit von Onkogenprodukten, bestimmt (siehe Einleitung 1.5.3). Dupont und seine Mitarbeiter beschrieben eine onkoselektive Expression in vitro durch Vektoren, die sich von MVMp ableiteten und so die gesamte P4-ns1-P38 Kassette nutzten (Dupont et al., 2000). Um eine stimulierte oder selektive Expression des Hybridvektors in transformierten Zellen zu untersuchen, wurden Zellpaare von nicht-transformierten und transformierten Zellen verwendet (Tab.11). Direkte Zellpaare sind für diese Fragestellung besonders interessant. weil transformationsunabhängige Parameter, die eine Infektion beeinflussen können, möglichst nicht verändert sein sollten. Allerdings sind direkte Zellpaare selten und sie müssen, um hier verwendbar zu sein, durch Parvoviren infizierbar sein.

Namen	Transformiert	Direktes	Referenz	Zelltyp
	durch	Zellpaar		
VH10p vs. VH10 SV40	SV40 T-Antigen	ja		Fibroblasten
	(ori [-])		Chen et al., 1986	(Haut)
MRC5p vs. MRC5V1	SV40	ja	ECACC # 97112601	Fibroblasten
			ECACC # 85042501	(Lunge)
¹ NHEM vs. ² Bowes	Kultiviert aus	nein	¹ Promocell Heidelberg	Melanocyten
Melanoma (HMCB)	Melanom		² ATCC # CRL-9607	
HaCaT vs. HaCaT T30ras	Aktiviertes Ras	Ja	Boukamp et al., 1988	Keratinocyten
			Boukamp et al., 1990	

Tabelle 11: Zusammenstellung der verwendeten Zellinien für die Untersuchung der präferentiellen Expression in transformierten Zellen gegenüber (vs.) nicht-transformierten, parentalen (p) Zellinien. ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures): ATCC (American Tissue Culture Collection)

Die Transduktion der AAV-2 Vektoren P40-GFP, TRUF5 und TRH1-GFP wurde auf den Zellinien VH10p gegenüber (vs.) VH10SV40, MRC5p vs. MRC5V1, NHEM vs. Bowes Melanoma (HMCB) und HaCaT vs. HaCaT T30*ras* verglichen. Da die verschiedenen AAV Vektoren, die in HeLa Zellen getestet wurden, eine unterschiedliche Fähigkeit zur Transduktion besitzen, wurden für diese Experimente unterschiedliche MOIs für die verschiedenen Vektoren eingesetzt, um eine nachweisbare Expression zu gewährleisten. Die Infektionen wurden mit dem Vektor P40-GFP mit einer MOI von 2000 ru, mit dem Vektor TRUF5 mit einer MOI von 200 ru und mit dem Hybridvektor TRH1-GFP mit einer MOI von 20 ru pro Zelle durchgeführt. In Abbildung 25 sind die Transduktionsraten der Vektoren, gemessen durch FACS Analyse, unter diesen Bedingungen auf den verschiedenen Zellinien zusammengestellt.

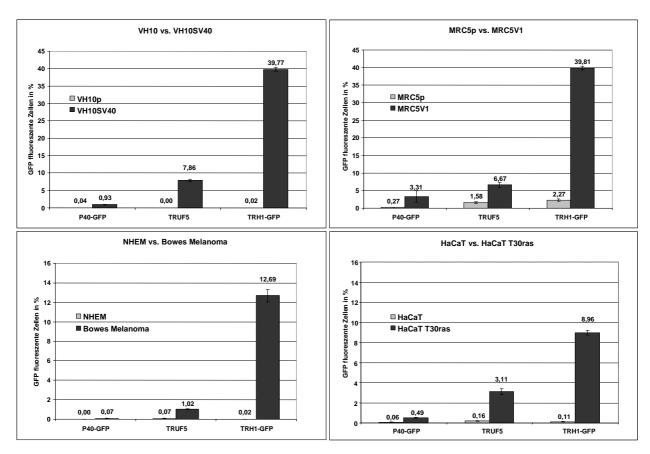


Abb. 25: Transduktion im Zellpaarvergleich
Die Transduktionsraten durch eine Infektion mit den Vektoren P40-GFP (MOI 2000 ru), TRUF5 (MOI 200 ru) und TRH1-GFP
(MOI 20 ru) auf den Zellpaaren sind als Anteil GFP exprimierender Zellen zusammengestellt. Die Transduktion der normalen,
parentalen Zellinie (hellgrau) ist derjenigen der transformierten Zellinie (dunkelgrau) durch denselben Vektor gegenübergestellt.
Die Transduktionen wurden in einer FACS Analyse mit je 5000 Zellen bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren Dreifachwerte.

Die Expression von GFP ist in parentalen VH10p Zellen fast nicht messbar. Die transformierte Zellinie VH10SV40 wird durch die Vektoren in unterschiedlichem Maße transduziert. Sehr ähnlich verhält es sich auch für die anderen verwendeten Zellinien, obwohl

die erzielten Transduktionen sehr unterschiedlich sind. In allen Fällen transduzierten die verwendeten Vektoren die transformierten Zellinien sehr viel besser.

Für eine funktionelle Untersuchung wurden die jeweiligen Derivate der AAV-2 Vektoren eingesetzt, die die HSV1 Thymidinkinase exprimieren (s. Abbildung 12A-C). Die HSV1-*tk* dient in diesen Vektoren als Suizidgen in der Kombination mit Ganciclovir (GCV). GCV ist ein Nukleotidanalogon, das durch die HSV1-TK initial phosphoryliert wird. Di- und tri-Phosphorylierungen von GCV-Monophosphat werden von zellulären Kinasen durchgeführt. Phosphoryliertes GCV ist ein selektiver Inhibitor der zellulären DNA-Polymerase δ und führt durch Einbau in die zelluläre DNA während der Replikation zu Kettenabbrüchen und schließlich zum Zelltod (zur Übersicht s. Morris et al., 1999). Das Suizidgensystem aus HSV1-TK und GCV vermittelt einen sogenannten "Bystander Effekt", der vermutlich auf der Ausbreitung von phosphoryliertem GCV durch die "Gap junctions" beruht. Die parentalen und transformierten Zellinien wurden durch die verschiedenen HSV1-*tk* exprimierenden Vektoren infiziert und nach der Zugabe von GCV wurde die Viabilität der Zellen durch einen MTT Test bestimmt. Der Ablauf dieses "Cell Killing Tests" ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt.

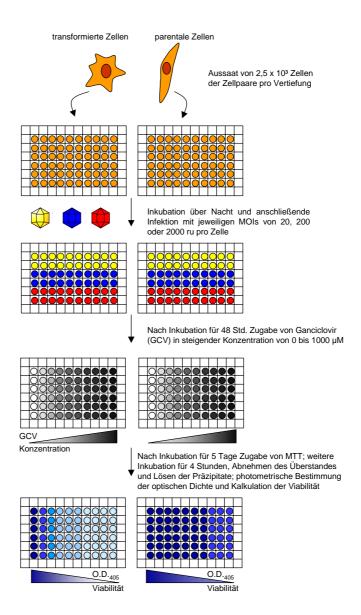


Abb. 26: Schematische Übersicht über den Ablauf des "Cell Killing Tests"

Die Zellen der parentalen und der transformierten Zellinien wurden separat in 96-Lochplatten ausgesät und am darauffolgenden Tag mit den Vektoren P40-TK (MOI 2000 ru), CMV-TK (MOI 2000 ru) und TRH1-TK (MOI 20 ru) infiziert. Nach zweitägiger Inkubation wurde GCV in steigender Konzentration zugegeben. Nach fünftägiger Inkubation wurde MTT (100 μg / Vertiefung) für 4 Stunden zu den Zellen gegeben. Durch die enzymatische Spaltung von MTT durch eine mitochondriale Dehydrogenase entsteht ein in wässrigem Medium unlösliches, violettes Formazan Präzipitat, das in Dimethylsufoxid (DMSO) oder 2-Propanol gelöst wurde. Die optische Dichte dieser Lösung wurde dann photometrisch (540 nm) bestimmt. Durch den Vergleich mit unbehandelten Zellen wurde die Viabilität errechnet (s. Methoden). Abbildung 27 vergleicht den Einfluß, den die Infektionen mit den HSV1-*tk* exprimierenden AAV-2 Vektoren in der Kombination mit GCV auf die parentalen Zellinien

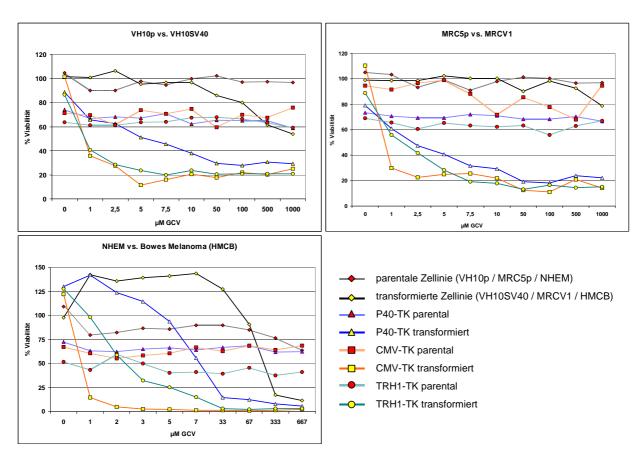


Abb. 27: "Cell Killing Test" mit drei Zellpaaren von transformierten und nicht-transformierten Zellen Die Zellen der Zellpaare VH10p vs. VH10 SV40, MRC5p vs. MRC5V1 und NHEM vs. Bowes Melanoma (HMCB) wurden durch die Vektoren P40-TK (MOI 2000 ru), CMV-TK (MOI 2000 ru) oder TRH1-TK (MOI 20 ru) infiziert. Nach Zugabe von GCV wurde die Viabilität der Zellen durch einen MTT Test ermittelt. Der toxische Einfluß der steigenden Konzentrationen von GCV in Abwesenheit der HSV1-tk ist durch nicht-infizierte Zellen gezeigt (schwarze Linie), den parentalen Zellen (roter Diamant) und den transformierten Zellen (gelber Diamant). Die Viabilität der parentalen Zellen und der transformierten Zellen wird verglichen nach Infektionen mit den verschiedenen Vektoren und in Abhängigkeit von der Konzentration von GCV (siehe Text). Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte aus Dreifachwerten.

gegenüber den transformierten Zellinien ausüben. Die parentalen Zellinien VH10p, MRC5p und NHEM Zellen sind weitgehend unempfindlich gegenüber GCV bis zu den höchsten Konzentrationen. Die transformierten Zellinien zeigen eine Verringerung der Viabilität ab 30 µM bei Bowes Melanoma Zellen und ab 50 µM GCV bei VH10SV40 Zellen. MRC5V1 Zellen

besitzen eine größere Toleranz gegenüber GCV. Nach einer Infektion der transformierten Zellinien mit den HSV1-tk exprimierenden Vektoren und der Zugabe von GCV nimmt die Viabilität in allen Fällen in Abhängigkeit von der GCV Konzentration ab. Eine Infektion mit dem Vektor CMV-TK mit einer MOI von 200 ru pro Zelle vermindert die Viabilität der transformierten Zellen drastisch in Anwesenheit von nur 1 – 7,5 µM GCV. Diese Wirkung wird in einer Infektion durch TRH1-TK mit einer MOI von 20 ru pro Zelle in Anwesenheit von Konzentrationen ab 7,5 µM erreicht. Die Wirkkonzentration von GCV in einer Infektion mit P40-TK lag zwischen 10 – 50 μM GCV. Die parentalen Zellinien wurden nach einer Infektion mit den verschiedenen Vektoren nicht durch die Zugabe von GCV abgetötet. Allerdings war die Viabilität dieser Zellen insgesamt geringer, verglichen mit der von nicht-infizierten Zellen. Da kein GCV bedingtes Absterben der parentalen Zellen erkennbar war, ist die Verminderung der Viabilitätswerte vermutlich auf ein verlangsamtes Wachstum der Zellen zurückzuführen, das durch die Infektion mit den AAV-2 Vektoren hervorgerufen wurde. HaCaT und HaCaT T30ras Zellen konnten in diesem Test nach Infektionen mit den verschiedenen Vektoren nicht GCV-abhängig abgetötet werden (Daten nicht gezeigt). In den Ras-transformierten Zellen wird Connexin 43, welches die "Gap junctions" bildet, nicht mehr exprimiert (Fitzgerald et al., 1994). Da die AAV Vektoren diese Zellen nicht sehr gut transduzieren, sind die "Gap junctions" als Voraussetzung für den "Bystander Effekt" wichtig für ein effizientes und messbares Absterben der Zellen, da die nicht-infizierten Zellen durch ihr Wachstum den Effekt des Abtötens überwachsen.

Für Vektoren, die sich von MVMp ableiten, ist eine onkoselektive Expression beschrieben worden (Dupont et al., 2000). Ähnlich wie hier wurden dafür die Transduktion eines GFP exprimierenden MVMp Vektors in Tumorzellinien und normalen Zellinien verglichen. Ebenso wurden die Viabilitätswerte der Zellen nach Infektionen mit einem HSV1-tk exprimierenden Vektor nach Zugabe von GCV verglichen. Allerdings wurde dort nicht versucht, die onkoselektive Eigenschaft der MVMp Vektoren mit solchen Vektoren zu vergleichen, die diese Eigenschaft nicht besitzen sollten. Dieser Versuch wurde hier durch die Verwendung des Vektors CMV-TK unternommen. Dieser Vektor exprimierte allerdings in diesem Experiment in transformierten Zellen sehr viel besser als in parentalen Zellen und er verhielt sich daher bezüglich einer selektiven Expression in transformierten Zellen grundsätzlich genauso wie der Hybridvektor TRH1-TK.

4.5.1 Vergleich der Internalisierung von AAV-2 Vektoren in Zellen der verwendeten Zellpaare

Aufgrund der eingangs dargestellten Arbeitshypothese wurde davon ausgegangen, daß der Effekt einer gesteigerten Expression in transformierten Zellen auf die Aktivität des Promotors

zurückgeführt werden kann. Um auszuschließen, daß eine geringere Rezeptorbindung und Internalisation der AAV-2 Vektoren in die nicht-transformierten Zellen diesen Effekt vermittelt, wurden die Zellinien in der Fähigkeit zur Vektoraufnahme verglichen (Abb. 28). Dafür wurden

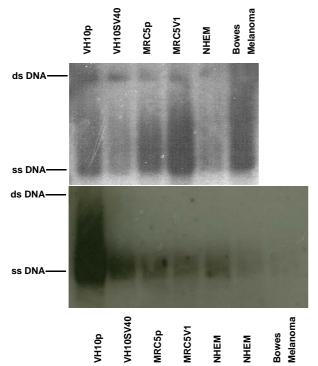


Abb. 28: Internalisierung des AAV-2 Vektors TRUF5 in die Zellpaare

Die Zellen der Zellpaare VH10p / VH10SV40, MRC5 / MRC5V1 und NHEM / Bowes Melanoma wurden mit TRUF5 (100 ru) infiziert. Nach 3 Stunden wurde die niedermolekulare DNA aus diesen Zellen extrahiert und in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA auf eine GeneScreen Membran wurde die Vektor DNA durch Hybridisierung mit einer ³²P-gfp-Sonde detektiert ("Southern Blot"). Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die relativen Mengen der detektierten Vektor DNA aus den Zellinien unterschieden sich innerhalb dieser Experimente. Es wurde nur ein konstanter Volumenanteil der extrahierten, niedermolekularen DNA aufgetragen. Die enthaltene zelluläre DNA in den Proben wurde mit einer Kanüle geschert, aber die Proben waren dennoch viskös und die Vektor DNA war möglicherweise nicht homogen verteilt, so daß beim Pipettieren keine repräsentativen Mengen entnommen werden konnten.

die Zellinien mit TRUF5 mit einer MOI von 100 ru pro Zelle infiziert und nach dreistündiger Inkubation wurde die niedermolekulare DNA aus diesen Zellen extrahiert. Die Hybridisierung der aufgetrennten und geblotteten DNA zeigte, daß alle Zellinien in der Lage waren, AAV-2 Kapside aufzunehmen. Im oberen Blot sind außer der Einzelstrang DNA auch Banden auf Höhe der Doppelstrang DNA zu erkennen, sowie eine breite Verteilung der DNA zwischen Einzelstrang und Doppelstrang. Diese Banden sind vermutlich Zusammenlagerung der Vektor DNA-Einzelstränge zu erklären. Diese ds DNA Banden sind im unteren Blot nicht zu erkennen. Hier wurden zwei Spuren mit der extrahierten DNA aus NHEM Zellen geladen. Diese Banden zeigten einen Unterschied in der Intensität. Ein Mengenunterschied wird auch in einem Vergleich der sich entsprechenden Spuren in den beiden Blots deutlich und verhindert so eine quantitative Aussage. Diese Mengenunterschiede beruhen vermutlich darauf, daß die Proben viskös waren und die niedermolekulare Vektor DNA nicht homogen in diesen Proben verteilt war. Dennoch wird deutlich, daß eine ungleichmäßige Internalisation von AAV-2 Vektoren in die Zellinien der Zellpaare nicht als Ursache für die sehr viel stärkere Expression in transformierten Zellen in den Transduktionsversuchen (Abb. 25) und das TK/GCV vermittelte, selektive Absterben in den "Cell Killing Versuchen" (Abb. 27) gelten kann.

4.6 Vergleich der Expression der verschiedenen Vektoren *in vivo* in Leberzelltumoren gegenüber der in normalem Leberparenchym

Der "Cell Killing Test" und die Bestimmung der Transduktion im Vergleich der Zellpaare (nicht-transformierte vs. transformierte Zellen) zeigte unerwartet, daß alle verwendeten AAV-2 Vektoren verstärkt in transformierten Zellen exprimierten. Allerdings unterschieden sie sich in ihrer Expressionsstärke. Die Expressionseigenschaften des Hybridvektors sollten daher *in vivo* einerseits mit denen des CMV Promotor-Enhancer tragenden AAV-2 Vektors und andererseits mit denen des rekombinanten H-1 Vektors verglichen werden. Dafür wurde ein Ratten-Tiermodell etabliert, bei dem durch die Injektion von Ratten-Leberkarzinomzellen (MH3924A) ein Lebertumor gebildet wird. Als Reporter-Transgen wurde die kodonoptimierte Renilla-Luciferase "hRluc" (Promega) verwendet, da sich in mehreren Vorversuchen die Verwendung der HSV1-*tk* (in Kombination mit ¹²⁵I-FIAU) und das *gfp*-Reportergen in diesem Experiment als untauglich erwiesen hatte. Für die *in vivo* Infektionen wurden die Titer der Vektorpräparationen auf eine Menge von 10¹² genomischen Partikeln pro ml Virussuspension eingestellt und in einer Titration direkt verglichen (Abb. 29).



CMV-hRluc TRH1-hRluc rH1-hRluc

Abb. 29: Vergleich der Titer der Vektorpräparationen

Die Titration von genomischen Partikel in Vektorpräparationen ist in den "Methoden" beschrieben. Die Titer der Vektorpräparationen, die für das *in vivo* Experiment und für den Vergleich der Infizierbarkeit der MH3924A Zellen (Abb. 22) verwendet wurden, wurden hier direkt verglichen. Als Sonde wurde ein ³²P-hRluc Fragment vewendet.

In einem Vorexperiment wurde die Infizierbarkeit der MH3924A Zellen durch die verschiedenen Vektoren CMV-hRluc, TRH1-hRluc und rH1-hRluc (Abb. 12B-D) mit verschiedenen MOIs getestet (Abb. 30).

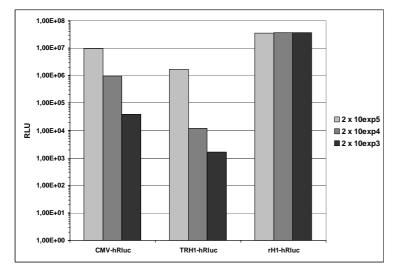
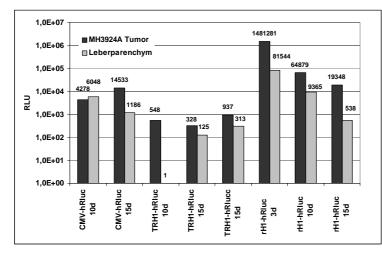


Abb. 30: Infizierbarkeit der Leberkarzinomzellinie MH3924A mit den verschiedenen parvoviralen Vektoren

MH3924A Zellen wurden mit unterschiedlichen MOIs von 2x10⁵ , 2x10⁴ und 2x10³ genomhaltigen Partikeln mit den Vektoren CMV-hRluc, TRH1-hRluc und rH1-hRluc infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Lichtreaktion (RLU) von 20 µl Lysat mit 100 µl "Assay Buffer" (Promega) wurde im Luminometer gemessen. Die Werte für rH1-hRluc lagen außerhalb des Meßbereiches und fallen daher nicht mit geringerer eingesetzter MOI ab

Die Vektoren transduzierten die MH3924A Zellen unterschiedlich gut. Der Vektor rH1-hRluc, der sich von dem Ratten-Parvovirus H-1 Virus ableitet, exprimierte sehr stark in diesen Zellen. Die gemessenen Lichteinheiten sind nach Infektion mit rH1-hRluc mit einer MOI von 2x10³ genomischen Partikeln pro Zelle noch außerhalb des Meßbereiches des Luminometers und nehmen daher scheinbar nicht mit der eingesetzten MOI ab. Es wurde nicht versucht, einen genauen RLU-Wert zu ermitteln, da diese Zellen offensichtlich permissiv sind für die Infektion mit rH1-hRluc. Nach Infektion mit den AAV-2 Vektoren CMVhRluc und TRH1-hRluc nehmen die gemessenen Lichteinheiten bei geringerer eingesetzter MOI ab. Dabei wird nach einer Infektion mit CMV-hRluc eine 10 - 100 fach stärkere Biolumineszenz gemessen, verglichen mit den Werten nach einer Infektion mit TRH1-hRluc. Abbildung 31 (nächste Seite) veranschaulicht schematisch den Ablauf des in vivo Experiments. Die Ratten wurden mit Ethrane (Enflurane; Abbott Lab.) narkotisiert und unter Inhalationsnarkose operiert. In einem Volumen von 50 µl wurden 1x10⁶ MH3924A Zellen in RPMI Medium langsam in die Spitze des Leberlappens A injiziert. Dabei sollte es zu einer räumlich begrenzten Aufhellung des Gewebes kommen. Die Kanüle wurde dann vorsichtig zurückgezogen, um einen Rücklauf der Zellsuspension zu vermeiden, da die Ratten sonst eine Karzinose im Bauchraum entwickeln (Daten nicht gezeigt). In dem Zeitraum von 10 Tagen bildete sich in der Leber ein solider Tumor, der gelegentlich im Zentrum eine nekrotische Zyste enthielt. Nach 10 Tagen wurden 10¹¹ genomische Partikel in 100 µl Virussuspension (PBS-MK) in den Tumor injiziert. Zum Vergleich mit der Expression in Normalgewebe wurden 100 µl Virussuspension in einen anderen Leberlappen desselben Tieres, in den Leberlappen B oder C, injiziert, abhängig von der Zugänglichkeit einer dieser Lappen. In einem Vorexperiment wurde die Expressionskinetik der Vektoren in vivo untersucht (Abb 32). rAAV Vektoren exprimierten erwartungsgemäß zeitverzögert verglichen



der Renilla-Luciferase Expression der verschiedenen parvoviralen Vektoren
Acht Ratten wurden MH3924A Tumoren gesetzt und nach 10 Tagen mit den angegebenen Vektoren CMV-hRluc, TRH1-hRluc und rH1-hRluc mit einer Menge von

Abb. 32: In vivo Vorexperiment zur Kinetik

gesetzt un hach 10 Tagen mit den angegebenen Vektoren CMV-hRluc, TRH1-hRluc und rH1-hRluc mit einer Menge von 10¹¹ genomhaltigen Partikeln jeweils im Tumor und im Leberparenchym infiziert. Die Leberentnahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten 3 Tage (3d), 10 Tage (10d) oder 15 Tage (15d) nach der Infektion. Für die Auswertung wurden, anders als in den folgenden Experimenten, die Luciferase-Expression in den einzelnen Gewebeproben gemessen und ein Hintergrundswert festgelegt. Die Werte wurden dann addiert. Die Werte sind gegen den Proteingehalt normalisiert.

mit rH1 Vektoren. Die Leberentnahme der rH1-hRluc infizierten Tiere erfolgte daher 3 Tage nach der Infektion, am Tag 13 nach der Zellinjektion. Die anderen Tiere sollten aufgrund der Tumorlast nicht länger als 25 Tage nach der Zellinjektion gehalten werden. Die Lebern der rAAV infizierten Ratten wurden somit am Tag 25 entnommen (Abb. 33).

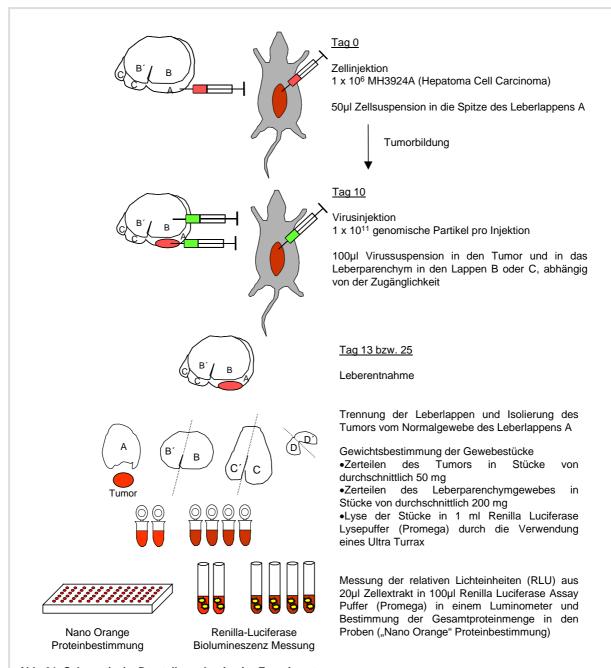


Abb. 31: Schematische Darstellung des in vivo Experiments

Eine detailliertere Beschreibung des Ablaufes und der Analyse des in vivo Experiments ist im Text gegeben.

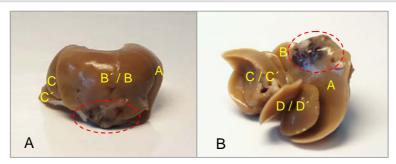


Abb. 33: Rattenleber mit Tumor

(A) Frontansicht einer entnommenen und perfundierten (4% Paraformaldehyd in PBS) Rattenleber 25 Tage nach Zellinjektion (MH3924A) in den Leberlappen A. Der entstandene Tumor ist rot-gestrichelt umkreist. Die Leberlappen sind durch Buchstaben gekennzeichnet.

(B) Rückseitige Ansicht derselben Leber wie in (A). Aus dieser Sicht sind die beiden kleinen Leberlappen D und D´zu erkennen. Der Tumor ist lokal begrenzt in der Spitze des Leberlappens A (rot-gestrichelt umkreist). Die dunklen Verfärbungen zeigen zystische und nekrotische Bereiche an.

Die Lebern wurden in die einzelnen Leberlappen A, B, B', C, C', D und D' getrennt. Aus dem Lappen A wurde der Tumor isoliert und alle Gewebe wurden bis zur Analyse der Expression zuerst in Flüssigstickstoff schnell tiefgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Tumoren wurden in Stücke von durchschnittlich 50 mg aufgeteilt und in 1 ml Lysepuffer (Promega) mithilfe eines Ultra Turrax zerkleinert. Die Leberparenchym-Gewebe wurden in durchschnittlich 200 mg große Stücke zerteilt und ebenso lysiert. Anschließend wurde mit jeder Probe eine Biolumineszenz-Messung und mit ausgewählten Proben beziehungsweise Probenmischungen ("gepoolte" Proben) eine "Nano Orange"-Proteinbestimmung (Invitrogen) durchgeführt. Die Biolumineszenz-Werte wurden dann auf die Gesamtproteinmenge abgeglichen. Für die Auswertung der Expressionsdaten sind zwei verschiedene Darstellungen gezeigt. Abbildung 34 vergleicht die maximale Expression in einer Probe des Tumors mit der maximalen Expression aus dem Parenchym. Diese Werte sind um die Durchschnittswerte einer Kontrolle bereinigt. Für diese Kontrolle wurde in einem Tier ein Tumor gesetzt, jedoch ohne anschließende Infektion. Diese Leber wurde 25 Tage nach Zellinjektion entnommen

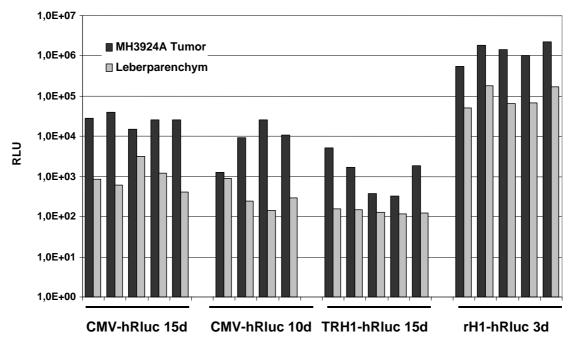
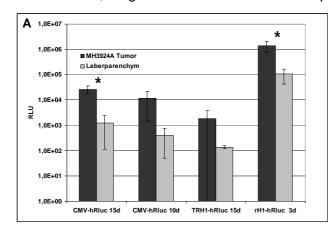


Abb. 34: Vergleich der maximalen Expression im Tumor vs. Leberparenchym nach Infektion durch die verschiedenen Vektoren

Die maximale Expression in einem Gewebestück des Tumors (dunkelgrau) wurde mit der aus dem Leberparenchym desselben Tieres (hellgrau) als Lichteinheiten pro mg Protein ("Relative Light Units" - RLU) verglichen. Nach Infektion mit dem Vektor CMV-hRluc wurden die Leberentnahmen an zwei Zeitpunkten durchgeführt, 15 Tage (15d) beziehungsweise 10 Tage (10d) nach Infektion. Die Lebern der TRH1-hRluc infizierten Tiere wurden 15 Tage (15d) nach der Infektion entnommen und die der rH1-hRluc infizierten Tiere 3 Tage (3d) nach der Infektion. Diese zeitversetzte Leberentnahme ergab sich aus einem Vorexperiment zur Bestimmung der *in vivo* Expressionskinetik der verschiedenen Vektoren (Daten nicht gezeigt).

und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die Balken in Abbildung 34 repräsentieren die Messungen der relativen Lichteinheiten im Tumor und im Leberparenchym-

Gewebe der einzelnen Tiere. Jeder Vektor wurde 5 Tieren appliziert, mit Ausnahme des Vektors CMV-hRluc in der Gruppe der Tiere, denen 10 Tage nach der Infektion die Leber entnommen wurde (n=4). Durch diese Gruppe sollte eine mögliche Inaktivierung des CMV Promotors im Leberparenchym kontrolliert werden, die eine verstärkte Expression im Tumor vortäuschen würde. Ein Hinweis auf diese Möglichkeit hatte sich aus dem Vorexperiment zur *in vivo* Kinetik der Vektoren ergeben (Abb. 32). In allen Fällen war die maximale Expression in den Tumoren höher als die maximale Expression in Leberparenchym-Gewebe. Die Stärke der Expression verteilte sich wie in dem Vorexperiment zur Infizierbarkeit von MH3924A Zellen durch die verschiedenen Vektoren (Abb. 30). In Abbildung 35A sind diese Werte zu Mittelwerten zusammengefaßt. Abbildung 35B stellt dar, um welchen Faktor die maximale Expression der verschiedenen Vektoren im Tumorgewebe stärker ist, verglichen mit der maximalen Expression im Leberparenchym.



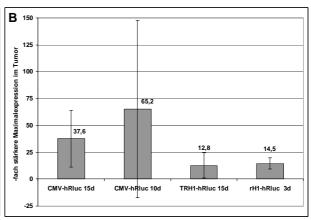


Abb. 35A/B: Vergleich der mittleren maximalen Expression im Tumor vs. Leberparenchym (A) Die Werte aus Abb. 26 sind zu Mittelwerten zusammengefaßt. Die Standardabweichung bezieht sich auf die dort gezeigten Einzelwerte mit n=5 bzw. n=4 für CMV-hRluc 10d (zweiseitiger Students T-Test: CMV-hRluc 15d P=0,0045; CMV-hRluc 10d P=0,1202; TRH1-hRluc P=0,1127; rH1-hRluc P=0,0089) * statistisch signifikant P < 0,05 (B) Bestimmung der erhöhten maximalen Expression im Tumor vs. Leberparenchym Der Faktor einer verstärkten Maximalexpression im Tumor gegenüber der Expression in Leberparenchym wurde aus den Einzelwerten errechnet und als Mittelwert dargestellt (n=5 bzw. n=4 für CMV-hRluc 10d)

Der Vektor CMV-hRluc exprimierte 15 Tage nach der Infektion in den Tumoren 37-fach stärker als im Leberparenchym (P=0,0045), wobei allerdings eine beachtenswerte Standardabweichung mit diesem Wert verbunden ist. Der Vektor rH1-hRluc exprimierte 14,5-fach stärker in Tumorgewebe (P=0,0089). Der Hybridvektor TRH1-hRluc exprimierte uneinheitlich stark in den Tumoren der verschiedenen Tiere, jedoch nur sehr gering im Leberparenchym. Für diesen Vektor wurde eine fast 13-fach stärkere maximale Expression im Tumor bestimmt als im Parenchym (P=0,1127). Die große Standardabweichung für diesen Wert ist durch die uneinheitliche Expression im Tumor begründet. Es gibt aus diesen Werten keinen Hinweis auf eine Inaktivierung des CMV Promotors im Parenchym innerhalb der 15 Tage. Die maximale Expression durch den Vektor CMV-hRluc ist nach 10 Tagen im

Tumor 65-fach höher als im Parenchym (P=0,1202). Dabei reflektiert die außerordentlich große Standardabweichung die Variabilität der Expression in den einzelnen Tieren nach 10 Tagen sowohl im Tumor als auch im Parenchym.

In Abbildung 36 wird die Gesamtexpression im Tumor mit der des Parenchyms verglichen. Dafür wurden die Werte der relativen Lichteinheiten aller Proben des Tumors von jeweils einem Tier addiert und ebenso die RLU aller Proben des Leberparenchyms. Die Werte, die in Proben einer nicht-infizierten Kontrolleber gemessen wurden, wurden als Hintergrundswert davon subtrahiert.

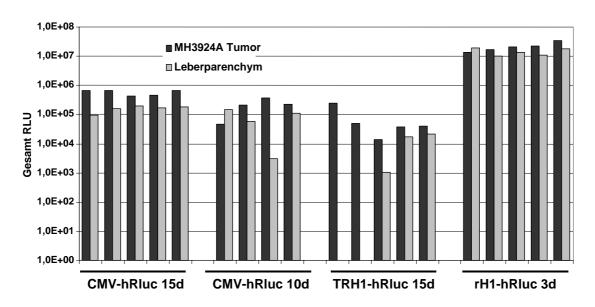


Abb. 36: Vergleich der Gesamtexpression im Tumor vs. Leberparenchym nach Infektionen durch die verschiedenen Vektoren

Die relativen Lichteinheiten aller Tumorproben jeweils eines Tieres wurden addiert. Die relativen Lichteinheiten eines nicht infizierten Tumors wurden bestimmt und als Kontrollwert von den Werten der infizierten Tumoren subtrahiert (dunkelgraue Balken). Ebenso wurden die relativen Lichteinheiten der Parenchymproben addiert und um den entsprechenden Kontrollwert bereinigt (hellgraue Balken).

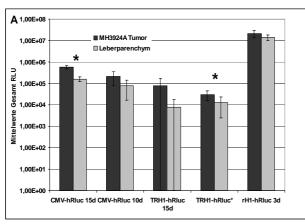
Durch die Bereinigung der Werte durch eine/n nicht-infizierte/n Kontrolleber/-tumor kann bei zwei Ratten aus der Gruppe der TRH1-hRluc infizierten Tiere keine Expression im Leberparenchym gemessen werden. In einer statistischen Auswertung (Abb. 37) dieser Gruppe ergibt sich dadurch rechnerisch ein hoher Faktor einer verstärkten Expression im Tumor vs. Leberparenchym, aber auch eine große Standardabweichung. In Abbildung 37A sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen dargestellt und in Abbildung 37B ist der jeweilige Faktor gezeigt, um den die Expression im Tumor stärker ist als im Parenchym. Es wurde eine neue Gruppe

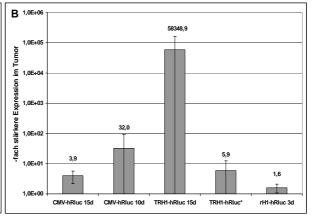
Abb. 37A/B (s.nächste Seite): Vergleich der mittleren Gesamtexpression im Tumor vs. Leberparenchym

(A) Mittelwerte der in Abb. 28 dargestellten Gruppen. Die neu eingeführte Gruppe TRH1-hRluc* berücksichtigt nur die Werte der Tiere, bei denen im Tumor und im Parenchym eine Expression gemessen werden konnte. (zweiseitiger Students T-Test: CMV-hRluc 15d P=0,0021; CMV-hRluc 10d P=0,2587; TRH1-hRluc 15d P=0,1908; TRH1-GFP* P=0,0200 rH1-hRluc 3d P=0,1281) * statistisch signifikant P<0,05

⁽B) Bestimmung des Faktors einer erhöhten Gesamtexpression im Tumor vs. Leberparenchym

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der einzelnen Faktoren innerhalb je einer Gruppe, um den die Gesamtexpression im Tumor höher ist als im Leberparenchym. (*n*=5; CMV-hRluc 10d *n*=4; TRH1-hRluc* *n*=3)





eingeführt, TRH1-hRluc*, in der nur die Werte der 3 Tiere berücksichtigt wurden, bei denen eine Expression sowohl im Tumor als auch im Parenchym gemessen werden konnte.

Eine Darstellung der gemessenen Gesamt-Expressionen in Mittelwerten zeigt, daß bei allen verwendeten Vektoren die Expression im Tumor stärker ist als im Parenchym. Bei nur zwei Tieren aus der Gruppe "CMV-hRluc 10d" und "rH1-hRluc 3d" wurde eine größere Gesamtexpression im Parenchym gemessen als im Tumor. Der Faktor, um den die Gesamt-Expression im Tumor stärker ist als im Parenchym, hat für rH1-hRluc einen Wert von 1,6 (P=0,1281), während die Vektoren CMV-hRluc und TRH1-hRluc* nach 15 Tagen 4-fach (P=0,0021) beziehungsweise 6-fach stärker (P=0,0200) im Tumor exprimieren.

Die Darstellungen der maximalen Expression und der Gesamt-Expression ergeben übereinstimmend, daß alle verwendeten Vektortypen in diesem Tiermodell stärker im Tumor exprimieren als im Leberparenchym. Dabei ist der Faktor, um den die Expression im Tumor stärker ist, abhängig von der Darstellungsweise. Es kann hier keine stärkere Onkopräferenz für die Vektoren rH1-hRluc und TRH1-hRluc, die die P4-ns1-P38 Kassette beinhalten, festgestellt werden gegenüber dem Vektor CMV-hRluc. Eine 13-37-fach stärkere maximale Expression im Tumor durch diese Vektoren birgt jedoch einen therapeutischen Nutzen.

5. Diskussion

5.1 Der Hybridvektor TRH1-GFP besitzt die Eigenschaften eines AAV-2 Vektors mit verstärkter Basistransduktion

Der vorliegenden Arbeit lag die Idee zugrunde, mit der Konstruktion eines Hybridvektors in der Kombination von AAV-2 mit dem autonomen Parvovirus H-1 einen AAV-2 Vektor mit veränderten, spezifischen Transduktionseigenschaften zu schaffen. Die Transduktionseigenschaften eines parvoviralen Vektors werden bestimmt durch seine Rezeptorbindungseigenschaften, den intrazellulären Transport des Genoms zum Zellkern, die Einzelstrangkonversion die Promotoreigenschaften des Vektors. Während nicht zu erwarten war, daß die Rezeptorbindungseigenschaften und der intrazelluläre Transport durch Inkorporation der von H-1 Virus abgeleiteten P4-ns1-P38 Kassette beeinflußt wurde. war die Einzelstrangkonversion möglicherweise neben den Promotoraktivitäten im Hybridvektor gegenüber den herkömmlichen AAV-2 Vektoren verändert worden.

Als Mechanismus für die Einzelstrangkonversion eines AAV-2 Vektorgenoms werden zwei Möglichkeiten diskutiert. In AAV Virionen werden die Vektorgenome in beiden Polaritäten verpackt. In Abwesenheit von Adenovirus Helferfunktionen können die komplementären Vektorgenome miteinander hybridisieren und so eine doppelsträngige DNA bilden (Nakai et al., 2000). Alternativ dazu kann der komplementäre Strang durch Neusynthese gebildet werden, die sogenannte Zweitstrangsynthese. Die autonom replizierenden Parvoviren H-1 Virus und MVMp verpacken vornehmlich das Genom mit Negativpolarität, so daß dort die Zweitstrangsynthese der einzige Mechanismus zur Bildung von doppelsträngigen Genomen ist.

Die Zweitstrangsynthese wurde als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Transduktion von Zellen mit AAV-2 beschrieben. Diese kann durch die Anwesenheit von Adenovirus 100–1000–fach stimuliert werden kann (Fisher et al., 1996b; Ferrari et al., 1996). Die ITRs eines AAV-2 Vektors enthalten das D-Sequenzelement und somit die Bindungsstelle für das ursprünglich als "singlestrand D-sequence binding protein" ("ssD-BP") bezeichnete zelluläre Protein. Es wurde später als FKBP52 identifiziert. Die Bindung dieses Proteins an das ITR von AAV-2 wird dafür verantwortlich gemacht, die Zweitstrangsynthese von AAV-2 und abgeleiteten Vektoren zu verhindern und so die Transduktion zu limitieren (Qing et al., 1997/2001). Die D-Sequenz des AAV-2 ITRs kann jedoch nicht deletiert werden, um dieser Limitation zu entgehen, da sie eine für die Replikation und Verpackung in *cis*

notwendige Sequenz ist (Wang et al.,1996/1997). Die Bindung des FKBP52 Proteins an das D-Sequenzelement wird durch dessen Phosphorylierungszustand reguliert. Phosphorylierungen an Tyrosinresten durch die zelluläre **EGF-Rezeptor** Tyrosinkinase führen zu einer verstärkten Bindung des Proteins an die D-Sequenz und somit zur Inhibition der Zweitstrangsynthese (Mah et al., 1998). Infolge einer Adenovirus Infektion liegen die FKBP52 Proteine in der Zelle hauptsächlich nichtphosphoryliert vor und binden daher nicht an die D-Sequenz des AAV-2 ITRs, so daß die Einzelstrangkonversion des AAV-2 Vektorgenoms stattfinden kann (Qing et al., 1997). Erwartungsgemäß wirkte die Anwesenheit von Adenovirus in Koinfektionen mit den AAV-2 Vektoren stimulierend auf deren Transduktionen, einschließlich der des Hybridvektors (Kap. 4.2.1). Der Hybridvektor verhält sich also bezüglich der Transduktionseigenschaften grundsätzlich wie ein reiner AAV Vektor, obwohl die Hälfte des linken TRs von H-1 Virus in dem Konstrukt enthalten ist (siehe Kap. 4.1 Abb. 11). Dieser H-1 Virus Anteil schließt sich an das ITR von AAV-2 an und liegt im Kapsid einzelsträngig vor, da in den Produktionen der AAV Vektoren die Replikation, Verpackung und die Nickase-Aktivität durch die AAV-2 Rep Proteine vermittelt werden. Für die Zweitstrangsynthese des Hybridvektors kann nur das AAV ITR das freie 3'-OH Ende zur Kettenverlängerung zur Verfügung stellen, so daß eine Einzelstrangkonversion von dem 3'-TR Anteil aus H-1 Virus nicht initiiert werden kann. Der Einfluß eines "Helfer"-Adenovirus auf die Transduktion mit dem Hybridvektor bleibt daher prinzipiell erhalten. Da für eine Verpackung von Vektorgenomen in AAV Kapside die AAV ITRs inklusive der D-Sequenz in cis notwendig sind, war es bei der Konstruktion des Hybridvektors nicht möglich, das gesamte H-1 Virus 3'-TR und die damit verbundene "Helfer-Virus" unabhängige Zweitstrangsynthese der autonom replizierenden Parvoviren zu nutzen.

Die Verwendung der P4-*ns1*-P38 Kassette bewirkte aber in Abwesenheit von Adenovirus eine verstärkte Basistransduktion des Hybridvektors TRH1-GFP, d.h. einen prozentual höheren Anteil GFP-exprimierender Zellen als in Infektionen mit Vektoren, bei denen die Expression durch einen CMV Promotor-Enhancer oder die AAV eigenen Promotoren P5 und P40 kontrolliert weden (Kap. 4.2.1). Bei einer Verwendung gleicher AAV-2 Kapside und gleicher MOIs stellt sich die Frage, warum sich die Transduktionen verschiedener AAV Vektoren unterscheiden. Die verwendeten MOIs für die Transduktionsstudien beruhen auf Angaben replikativer Titer, die in Anwesenheit von "Helfer"-Adenovirus gewonnen wurden. In einem Vergleich der GFP-Expression unter der Kontrolle verschiedener Promotoren nach Transfektionen erwies sich die P4-*ns1*-P38 Kassette im AAV Vektor als effiziente Promotor-Transaktivatorkombination. Das Transgen GFP wurde stärker exprimiert

als durch den CMV Promotor-Enhancer (Kap. 4.3). Diese verstärkte Expression könnte bewirken, daß in einer Infektion mit dem Hybridvektor mehr GFP-exprimierende Zellen detektiert werden können, während die Expression von anderen Promotoren für eine Detektion durch eine FACS Analyse in einem Anteil der Zellen nicht ausreicht, d.h. die beobachteten Transduktionsunterschiede beruhen vermutlich auf unterschiedlichen Promotoraktivitäten. Vor dem Hintergrund einer limitierten Transduktion von AAV Vektoren stellt der Hybridvektor so ein nützliches Element für die effizientere Transduktion permissiver Zellinien dar. Für die Erklärung einer verstärkten Expression als Ursache der höheren Basistransduktion durch den Hybridvektor spricht eine oftmals gemachte Beobachtung in FACS-Analysen: in Infektionen mit dem AAV-2 Vektor TRUF5 bildete sich eine Zell-Subpopulation, die sich in der Fluoreszenzintensität nur geringfügig, im Bereich der Autofluoreszenz, von nicht-infizierten Zellen unterschied. Diese Zell-Subpopulation konnte durch eine FACS Analyse jedoch nicht eindeutig von den nicht-infizierten Zellen getrennt werden.

Alternativ zu der Erklärung, daß die erhöhte Basistransduktion des Hybridvektors auf einer verstärkten Expression beruht, könnte man einen Effekt des NS1 Proteins auf die Transduktion vermuten. NS1 Protein besitzt zytotoxische Eigenschaften und in dessen Anwesenheit konnten Einzelstrangbrüche in der zellulären DNA nachgewiesen werden, die als Induktoren für p53 und des damit verbundenen Signalweges dienen können (Op De Beeck et al., 1997). Somit vermittelt NS1 Protein genotoxischen Stress, der stimulierend auf die Transduktion wirken könnte. Die Transduktion von AAV-2 Vektoren kann durch verschiedene Behandlungen stimuliert werden, deren Gemeinsamkeit in der Vermittlung von genotoxischem Stress auf die Zelle liegt (Alexander et al., 1994; Russell et al., 1995). Die Fähigkeit von NS1 Protein zur Stimulation der Transduktion von AAV Vektoren ist nicht untersucht, aber es erscheint aus genanntem Grund wahrscheinlich und sollte experimentell überprüft werden. Da für die Expression des NS1 Proteins eine doppelsträngige DNA vorausgesetzt werden muß, kann man sich im Falle einer Infektion mit dem Hybridvektor diese Stimulation der Transduktion durch NS1 Protein als eine Art autokatalytischer Steigerung der Transduktion vorstellen. Die Hypothese einer Stimulation der Transduktion von AAV Vektoren durch NS1 Protein erscheint interessant für gentherapeutische Ansätze, bei denen in Koinfektionen zwei AAV Vektoren oder ein AAV Vektor mit einem H-1 Vektor kombiniert werden, von denen jeweils einer der Vektoren das NS1 Protein exprimiert.

Die unerwünschte Eigenschaft einer limitierten Transduktion mithilfe von AAV-2 Vektoren könnte aber in der Anti-Krebstherapie überwunden werden durch eine

Kombination mit bestehenden Therapien, die als erwünschte Nebenwirkung eine Stimulation der Transduktion mit AAV Vektoren bewirken. So wurden neben einer bereits beschriebenen Kombination eines AAV Vektor-vermittelten Gentransfers mit γ-Bestrahlung (Peng et al., 2000; Kanazawa et al., 2003) auch die Chemotherapeutika Mitomycin, Cisplatin und Carmustine (BCNU) als Kombinationsmöglichkeiten identifiziert (Kap. 4.2.2-5). Dabei ist insbesondere BCNU interessant, das zur Therapie von Gehirntumorerkrankungen eingesetzt wird. Aus dem Vergleich der Infizierbarkeit verschiedener Tumorzellinien erwiesen sich Zellen mit dem Ursprung aus Gehirngewebe schon in Abwesenheit stimulierender Einflüsse als permissiv für eine Transduktion mit dem AAV-2 Hybridvektor (Kap. 4.4). Abgesehen von einer chirurgischen Entfernung sind Strahlentherapien und Chemotherapien mit Cisplatin oder BCNU aktuelle Behandlungsformen von verschiedenen Gehirntumoren (zur Übersicht s. Castro et al., 2003). AAV-2 Vektoren transduzieren in vivo (in der Maus oder der Ratte) vorwiegend neuronale Zellen und keine primären glialen Zellen. Es zeigte sich aber im Rahmen dieser Arbeit, daß verschiedene Gehirntumorzellinien und auch solche mit dem Ursprung in glialen Zellen (Neurogliom H4, Medulloblastom TE671, Glioblastom U-87MG und NCH82/89/149) effizient transduziert werden (vergleiche dazu 5.2). Aufgrund dieser Beobachtungen und der Kombinierbarkeit mit bestehenden Therapien bietet sich die Verwendung des Hybridvektors mit einem geeigneten Transgen für einen Kombinationstherapie-Ansatz gegen Glioblastome oder Medulloblastome an. Infektionen mit AAV-2 und ausgewählte chemotherapeutische Behandlungen

Infektionen mit AAV-2 und ausgewählte chemotherapeutische Behandlungen scheinen darüberhinaus einen wechselseitigen Einfluß aufeinander zu besitzen und dabei synergistisch zu wirken. So sensitiviert eine AAV-2 Infektion verschiedene Tumorzellinien gegenüber den zur Chemotherapie verwendeten Medikamenten Cisplatin, Etoposid und Doxorubicin (Hilgenberg et al., 1999; Duverger et al., 2002; Schwarzbach et al., 2002) und führt zu einer Verminderung der unerwünschten Nebenwirkungen in einer 5-Fluorouracil Therapie (Eisold et al., 2002). Obgleich diese Wechselwirkungen für Infektionen mit AAV-2 wt beschrieben wurden, scheint das AAV-2 Kapsid zumindest teilweise diese Effekte zu vermitteln (Duverger et al., 2002), vermutlich in der Kombination mit der genomischen DNA, die als Einzelstrang in die Zelle gelangt. Beides ist in AAV-2 Vektoren vorhanden. Sie sollten somit zum gleichen Ergebnis führen wie AAV-2 wt.

5.2 Die Verwendung eines AAV Kapsids erweitert und ergänzt das Spektrum infizierbarer Zellen

AAV-2 Vektoren besitzen ein breites Spektrum infizierbarer Zellen. Der Primärrezeptor für die Internalisation von AAV-2 Virionen ist das Heparansulfat-Proteoglykan (Summerford et al., 1998) und als sekundäre Rezeptoren dienen das αVβ5 Integrin und der FGF-Rezeptor (Summerford et al., 1999; Qing et al., 1999). Die zellulären Rezeptoren für die Internalisation von MVMp und H-1 Virus sind nicht bekannt, aber eine Bindung und Internalisation dieser Virionen kann durch eine Behandlung der Zellen mit Neuraminidase verhindert werden, so daß angenommen wird, daß die Rezeptoren Glykoproteine sind, die Sialinsäure enthalten (Tullis et al., 1993). Aufgrund der Verwendung verschiedener Rezeptoren durch die Parvoviren AAV-2 beziehungsweise H-1 Virus sollte sich das Spektrum der mit dem Hybridvektor infizierbaren Zellen gegenüber dem mit H-1 Vektor infizierbaren Zellen unterscheiden. Erwartungsgemäß variierte so auch die Permissivität der in dieser Arbeit verwendeten Tumorzellinien für eine Transduktion mit den jeweiligen Vektoren TRH1-GFP beziehungsweise rH1-GFP (Kap. 4.4). Die Konstruktion des Hybridvektors TRH1-GFP stellt somit eine sinnvolle Ergänzung zu den Vektoren der autonom replizierenden Parvoviren dar. Darüberhinaus können die Kapside der anderen AAV-Serotypen AAV1 und AAV3-8 zur Präparation dieses Vektors eingesetzt werden, die sich wiederum in ihrer Fähigkeit zur Transduktion verschiedener Zelltypen von der von AAV-2 unterscheiden (Grimm et al., 2003a/b). So kann durch die Wahl des Kapsids bereits eine zell- beziehungsweise gewebetypische Präferenz für die Transduktion des Vektors erzielt werden. Darüberhinaus sind Möglichkeiten für Modifikationen im AAV-2 Kapsid entwickelt worden, die zu einem veränderten Tropismus führen, sogenannte "Retargeting" Strategien. Die Insertion eines Peptidmotivs (L14) in die Kapsidsequenz von AAV-2 verlieh diesen Viren in vitro einen veränderten Tropismus durch die Interaktion der RGD Sequenz innerhalb von L14 mit einem zellulären Integrin als Rezeptor (Girod et al., 1999). Die Insertion eines Peptides, das durch Phage Display als spezifisch für venöse endotheliale Zellen identifiziert wurde, in das Kapsid von AAV-2, bewirkte in vivo bei einer systemischen Applikation ein "Retargeting" dieser Vektoren in venöse endotheliale Zellen (White et al., 2004). In einem anderen Ansatz konnte durch eine Insertion von Zufallssequenzen in das Kapsidgen von AAV-2 und anschließender Selektion dieser Kapsidgenbibliothek in ausgewählten Zellinien spezifisch eine Infizierbarkeit von schlecht oder nicht infizierbaren Zellen erzielt werden (Perabo et al., 2003; Müller et al., 2003). Diese "Retargeting" Strategien beruhen auf Modifikationen des AAV-2 Kapsids und können grundsätzlich für Präparationen des Hybridvektors verwendet werden und so auf der Ebene der Kapsidbindung und Aufnahme in die Zelle für eine zelltypische Präferenz der Transduktion sorgen.

In *in vitro* Transduktionsversuchen primärer humaner Zellen erwiesen sich proliferierende Skelettmuskelzellen, Glattmuskelzellen und Zellen der Retina als permissiv für eine Transduktion mit AAV-2 Vektoren (Rohr et al., 2002; Grimm et al., 2003a). In einzelnen Fällen wurde für Keratinozyten, Herzmuskelzellen, Chondrozyten, Zellen der Bandscheibe, endotheliale Zellen und bronchiale epitheliale Zellen eine effiziente Transduktion mit AAV-2 Vektoren beschrieben (Braun-Falco et al., 1999; Rohr et al., 2002; Grimm et al., 2003a). Widersprüchliche Beobachtungen wurden bezüglich der Möglichkeit zur Transduktion von hämatopoietischen Stammzellen mit AAV-2 Vektoren gemacht (zur Übersicht siehe Srivastava, 2002).

In Untersuchungen zum AAV-2 Tropismus in vivo erwiesen sich verschiedene Gewebe als permissiv für eine Transduktion durch AAV-2 Vektoren, dabei insbesondere Skelettmuskelzellen (zur Übersicht s. Herzog, 2004), Herzmuskelzellen (zur Übersicht s. Chu et al., 2004) und Neurone in verschiedenen Hirnarealen (zur Übersicht s. Tenenbaum et al., 2004). Das AAV-2 Kapsid vermittelt allerdings einen ausgeprägten Lebertropismus, so daß bei einer intravenösen Injektion von AAV-2 Vektoren in eine Maus der größte Teil der Vektorgenome in den Hepatozyten und den Kupfferschen Zellen der Leber akkumuliert, wobei jedoch nur 5 % der infizierten Hepatozyten das Transgen exprimieren (Ponnazhagan et al., 1997; Miao et al., 2000). In den Studien zum Tropismus von AAV-2 im zentralen Nervensystem konnten verschiedene anatomisch unterscheidbare Bereiche wie das Striatum. Hippocampus, Substantia Nigra, Globus Pallidus und Capsula Interna mit sehr unterschiedlicher Effizienz und Expressionskinetik transduziert werden (zur Übersicht s. Tenenbaum et al., 2004). Dabei wurden in der Capsula Interna gliale Zellen transduziert (Tenenbaum et al., 2000) und im Hippocampus von Mäusen konnte durch die Verwendung des GFAP-Promotors selektiv in Astrocyten exprimiert werden (Feng et al., 2004), wohingegen in den anderen Arealen neuronale Zellen infiziert wurden (McCown et al., 1996; Klein et al., 1998; Bartlett et al., 1998). Diese Untersuchungen beziehen sich auf nicht-transformierte Ratten- beziehungsweise Mauszellen im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit angestellten Vergleich der Transduzierbarkeit verschiedener humaner Tumorzellinien.

Der Hybridvektor TRH1-GFP mit dem Kapsid von AAV-2 transduzierte die hier verwendeten Mamma-Adenokarzinom Zellinien sehr effizient, ebenso wie die

Neurogliom, Glioblastom und Medulloblastom Zellinien. Im Gegensatz dazu wurde die Lungenkarzinom Zellinie Calu-6, die sich von Alveolar- oder Bronchi(ol)en-Epithelzellen ableitet, durch den Hybridvektor nur gering transduziert. Obwohl die Verfügbarkeit von zellulären Rezeptoren essentiell für eine Infektion mit parvoviralen Vektoren ist, kann die erwünschte Transgenexpression bei verschiedenen Schritten einer Infektion, wie dem intrazellulären Transport der Virionen, der Translokation der viralen DNA in den Zellkern oder der Einzelstrangkonversion, blockiert sein. Welcher dieser Schritte für eine Transduktion von Calu-6 Zellen mit den parvoviralen Vektoren limitierend war, kann hier nicht unterschieden werden.

Während nicht-transformierte Ratten-/Maus-Astrozyten wenig permissiv sind für eine Infektion mit AAV-2, werden die transformierten Glioblastom Zellinien RG-2 (Ratten Glioblastom Zellinie; Daten nicht gezeigt) und U-87MG mit dem Hybridvektor sehr effizient transduziert. Dieses Ergebnis unterstreicht frühere Befunde, daß wenigpermissive primäre Zellen durch eine Immortalisierung oder eine Transformation mit bestimmten Onkogenen für Infektionen mit AAV-2 Vektoren und autonom replizierenden Parvoviren sensitiviert werden können (Halbert et al., 1995; Mousset et al., 1986).

Eine Infektion mit dem Hybridvektor führte in permissiven Zellen wie den humanen Glioblastomzellinien NCH 82, NCH 89 und NCH 149 zu einer Akkumulation der Zellen mit doppeltem DNA Gehalt (4n), der im Wesentlichen mit der Transduktion des Hybridvektors korreliert (Kap. 4.4.3). Die Fähigkeit von NS1 Protein zur Arretierung von Zellen ist bekannt (Op de Beeck et al., 1995). Ein Arrest von MVMp infizierten Zellen in S und G₂ wird durch eine Akkumulation von p53 Protein und dessen Aktivität vermittelt (Op de Beeck et al., 2001). p53 Protein liegt allerdings in fast allen verwendeten NCH Zellinien in einer mutierten Form vor, mit Ausnahme der NCH 82 Zellen (D. Weiss; persönliche Mitteilung). Vermutlich ist aus diesem Grund nur in den NCH 82 Zellen nach einer Infektion mit TRH1-GFP der Anteil der Zellen in der S Phase erhöht, verglichen mit nicht-infizierten NCH 82 Zellen. Die Expression von NS1 Protein in stabil transfizierten und induzierbaren Zellinien führt nicht zu einer Akkumulation von p53, jedoch zu einem Wachstumsarrest der Zellen in G₂ durch den Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitor p21^{CIP1} (Op de Beeck et al., 2001). Eine Infektion mit UV-bestrahlten und dadurch inaktivierten Adeno-Assoziierten Viren des Serotyps 2 führt in einer Reihe von Zellinien ebenfalls zu einem Wachstumsarrest in G2, der in Abhängigkeit des p53 Status der Zellen reversibel ist oder in die Apoptose führt (Raj et al., 2001). Dieser Wachstumsarrest ist unabhängig von der Expression viraler Proteine und wird durch das Einbringen von einzelsträngiger viraler DNA mit palindromischen TRs in die Zellen erklärt, da leere AAV-2 Kapside den

beschriebenen Effekt nicht hatten. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit eine Akkumulation der Zellen in G₂ nicht in allen NCH Zellinien beobachtet werden, obwohl eine von AAV-2 abgeleitete virale DNA mit palindromischen TRs verwendet wurde. Bei den infizierten NCH Zellinien korrelierte eine Akkumulation der Zellen mit 4n, also vermutlich in G₂, mit der Transduzierbarkeit, also dem Anteil NS1 Protein und GFP exprimierender Zellen. Daher ist es naheliegend, daß der beobachtete Effekt auf der Anwesenheit und Funktion von NS1 Protein beruht. NS1 Protein vermittelt also in Infektionen mit dem Hybridvektor in permissiven Zellen seine beschriebene zytostatische Aktivität und ist somit mehr als nur ein Transaktivator des P38 Promotors, sondern muß auch als Effektorprotein gesehen werden.

5.3 Alle verwendeten AAV Vektoren exprimieren *in vitro* selektiv in transformierten Zellen

Als Grundlagen der onkoselektiviten und onkolytischen Aktivität der autonom replizierenden Parvoviren MVMp und H-1 Virus werden eine gesteigerte Replikation durch eine effizientere Auflösung von replikativen Konkatemeren (Kuntz-Simon et al., 1999), eine verstärkte Zytotoxizität von NS1 Protein (Mousset et al., 1994) und eine verstärkte P4 Promotoraktivität in transformierten Zellen verantwortlich gemacht (Cornelis et al., 1988b; zur Übersicht s. Cornelis et al., 2004). Die Elemente des P4 Promotors wurden auf ihre Aktivierung in Abhängigkeit von Onkogenen untersucht. Dabei wurden die "Ets transcription factor binding site" (EBS), die zwei "cAMP response elements" (CREs) und die Bindungsstelle für NF-Y (Y-Box) als Promotorelemente identifiziert, die eine verstärkte Aktivität des P4 Promotors in Abhängigkeit von Onkogenen wie c-Ha-Ras oder einer Transformation durch SV40 Virus vermitteln (Fuks et al., 1996; Gu et al., 1995; Perros et al., 1995). Mit der Konstruktion des Hybridvektors wurde der Versuch unternommen, die Regulation des P4 Promotors aus H-1 Virus in einem AAV Vektor für eine onkoselektive Expression zu verwenden. Um die Expression des Hybridvektors auf diese Eigenschaft zu prüfen, wurden Zellpaare von transformierten und nichttransformierten Zellinien verwendet, die entweder mit GFP exprimierenden oder mit HSV-TK exprimierenden Vektoren im Vergleich infiziert wurden (Kap.4.5). In einem ähnlichen Ansatz stellten Dupont et al. in vitro eine ausgeprägte onkoselektive Expression in Infektionen mit MVMp Vektoren fest, die die P4-ns1-P38 Kassette enthielten (Dupont et al., 2000). Dafür wurden nicht-transformierte Zellen gegenüber transformierten Zellen mit GFP oder HSV-TK exprimierenden Vektoren infiziert, die

sich von MVMp ableiteten. In der vorliegenden Arbeit wurde ergänzend versucht, diese Transduktionsvergleiche auch mit einem AAV-2 Vektor durchzuführen, dessen Expression von dem CMV Promotor-Enhancer kontrolliert wurde und von dem erwartet wurde, daß er nicht-onkoselektiv exprimierte. Unerwartet zeigten jedoch sowohl die GFP Transduktionsversuche als auch die "Cell-Killing" Tests übereinstimmend eine verstärkte Expression aller AAV Vektoren in den transformierten vs. den nicht-transformierten Zellinien, also auch der Vektoren mit einem CMV Promotor. Eine unterschiedliche Aufnahme der AAV-2 Kapside in die verwendeten parentalen Zellen gegenüber den transformierten Zellen kann für dieses Ergebnis nicht verantwortlich gemacht werden (Kap.4.5.1). Obwohl eine Quantifizierung der aufgenommenen Vektorgenome aus den Ergebnissen nicht sinnvoll ist, ist ersichtlich, daß alle verwendeten Zellinien AAV-2 Kapside internalisieren können.

Das Ergebnis einer selektiven Expression *in vitro* könnte dadurch erklärt werden, daß primäre Zellen mit AAV-2 Vektoren viel schlechter transduziert werden als immortalisierte und eine Transformation der parentalen Zellinien ein intrazelluläres Umfeld erzeugen kann, das diese Zellen permissiv werden läßt für eine Transduktion mit AAV-2 Vektoren (Halbert et al., 1995). In diesem Fall würde die Beobachtung einer apparent vermehrten Expression in transformierten Zellen nicht auf der Regulation der Promotoraktivitäten beruhen, sondern allgemein in der veränderten Permissivität der Zellen für eine Transduktion mit AAV Vektoren.

Weiterhin könnten in den "Cell-killing" Tests die beobachteten GCV-unabhängigen Reduktionen der Viabilitätswerte in den Infektionen der parentalen Zellinien, unabhängig von einer Expression der Vektoren, durch den beschriebenen reversiblen, proliferationsinhibitorischen Effekt des AAV-2 Virions auf primäre Zellen beeinflusst sein (Winocour et al., 1988; Bantel-Schaal et al., 1992; Hermanns et al., 1997).

Insgesamt konnte durch diese *in vitro* Versuche nicht eindeutig unterschieden werden, ob die Expression von den jeweiligen Promotoren der AAV Vektoren in transformierten Zellinien spezifisch verstärkt war, oder ob andere transformationsbedingte Virus-Zell-Interaktionen dieses Ergebnis beeinflusst haben.

5.4 Analyse der präferentiellen Genexpression von parvoviralen Vektoren mit einer P4-*ns1*-P38 Kassette in transformiertem Gewebe *in vivo*

Verschiedene Parvoviren wie das Kilham Rat Virus (KRV), Rat Parvovirus-1 (RPV-1), Mouse Parvovirus-1 (MPV-1), Minute Virus of Mice (MVMp) und H-1 Virus und das Canine Parvovirus (CPV), besitzen in vivo tumorsuppressive Eigenschaften (Bergs, 1969; Toolan et al., 1982; Yang, 1987; Dupressoir et al., 1989; McKisic et al., 1996; Ball-Goodrich et al., 1998). Diese Viren zeigen einen Onkotropismus, d.h. eine präferentielle Genexpression und Replikation in Tumorgewebe. In permissivem Tumorgewebe werden die infizierten Zellen lysiert und so die Nachkommenviren freigesetzt, ein Effekt, der als Onkolyse bezeichnet wird (zur Übersicht s. Cornelis et al., 2004). Diese Onkolyse beruht also auf der Permissivität von transformierten Zellen, die sich aus der kombinierten Fähigkeit zur Genexpression, der Fähigkeit zur DNA-Replikation, der Toxizität viraler Genprodukte wie z.B. des NS1 Proteins und der Bildung von Nachkommenviren in diesen Zellen ergibt. Parvovirale Vektoren, die sich von H-1 Virus oder AAV-2 ableiten, können aufgrund der Deletion der Kapsidgensequenzen keine Nachkommenviren bilden und es kann sich keine Virämie etablieren, Herkömmliche AAV-2 Vektoren sind durch die Abwesenheit von Rep Proteinen in einer Infektion replikationsdefizient, während Vektoren, die sich von MVMp oder H-1 Virus ableiten, durch die Verwendung der autologen P4-ns1-P38 Kassette grundsätzlich in der Lage sind, ihre DNA zu replizieren. Tumorzellinien können permissiv für eine Transduktion mit Parvoviren und empfindlich für die Toxizität von NS1 Protein sein, ohne daß eine Replikation des viralen Genoms in diesen Zellen stattfinden muß (Rubio et al., 2001). Solche Tumorzellen sind nicht permissiv in Bezug auf einen vollständigen Infektionszyklus von genetisch unmodifizierten, autonom replizierenden Parvoviren. Diese Zellen können dennoch Zielzellen für einen Therapieversuch mit parvoviralen Vektoren sein, da die beschriebene verstärkte P4 die Expression vom Promotor und transformationsabhängige Toxizität von NS1 Protein genutzt werden kann (Cornelis et al., 1988; Mousset et al., 1994). Es bestehen also grundsätzliche Unterschiede bezüglich der Effekte und Möglichkeiten bei einer Verwendung von parvoviralen Vektoren oder den parentalen Viren, von denen sie sich ableiten. Die Expression vom P4 Promotor kann durch die Anwesenheit bestimmter Onkoproteine wie c-Ha-Ras oder SV40 T-Antigen stimuliert werden (Fuks et al., 1996; Perros et al., 1995). Neben einer daraus resultierenden Akkumulation von NS1 Protein wird in Anwesenheit bestimmter Onkoproteine die Toxizität des NS1 Proteins verstärkt (Mousset et al., 1994).

In dieser Arbeit wurde die Verwendung der P4-ns1-P38 Kassette in einem AAV Vektor unter dem Aspekt einer onkoselektiven Genexpression, also eines Onkotropismus mittels eines sogenannten "Promotor-Targeting" untersucht. Dafür wurde der Vergleich der Genexpression mithilfe des Hybridvektors (TRH1-hR/uc), mit einem AAV Vektor, der sein Reportergen unter der Kontrolle des CMV Promotor-Enhancers exprimierte (CMV-hR/uc) und der Genexpression mithilfe eines H-1 Vektors (rH1-hR/uc) gewählt (Kap. 4.6). Wie zuvor in vitro zeigten alle verwendeten Vektoren eine gewisse Steigerung der Genexpression im Tumorgewebe in vivo, allerdings mit variabler statistischer Signifikanz.

Die signifikant erhöhte, **maximale Expression** im Tumor im Vergleich zum Leberparenchym mit dem von H-1 Virus abgeleiteten Vektor rH1-hR*luc* könnte in Suizidgen-Therapien ein Dosisfenster eröffnen, das es ermöglicht, das Normalgewebe zu schonen (Kap. 4.6 Abb. 26). Obgleich eine erhöhte, maximale Expression im MH3924A Tumor mit dem Hybridvektor TRH1-hR*luc* nicht signifikant war, glichen sich die Faktoren einer erhöhten, maximalen Expression im Tumor gegenüber der im Leberparenchym bei der Verwendung der Vektoren rH1-hR*luc* (14,5-fach; *P*=0,0089) beziehungsweise TRH1-hR*luc* (12,8-fach; *P*=0,1127). Die geringere Signifikanz der Ergebnisse mit dem Hybridvektor begründete sich hauptsächlich in der geringen Transduzierbarkeit der MH3924A Zellen mit dem AAV-2 Vektor.

Die einzelnen Anteile an der Luciferase **Gesamtexpression** im Leberparenchym varriierten in verschiedenen Bereichen der Leber, aber die Expression war nicht lokal um die Injektionsstelle und nicht auf denselben Leberlappen begrenzt (Daten nicht gezeigt). In der Analyse der Gesamtexpressionen (Kap.4.6 Abb.28) wurde dieser Umstand dadurch reflektiert, daß sich der Faktor einer erhöhten Expression im Tumor gegenüber der im normalen Leberparenchym bei allen untersuchten Vektortypen in den Gruppen "TRH1-hR*luc* 15d*" (6-fach) und "rH1-hR*luc* 3d" (1,6-fach) verminderte, bedingt durch das größere Volumen des Leberparenchyms gegenüber dem des Tumors.

Die signifikant erhöhte Genexpression des AAV-2 Vektors CMV-hR*luc* im Tumor gegenüber der im Leberparenchym (Kap.4.6 Abb.26 und 28) wurde vermutlich durch die gesteigerte Permissivität von transformierten Zellen gegenüber primären Zellen für eine Transduktion mit AAV-2 Vektoren und der geringen Expressionsaktivität von infizierten, nicht-transformierten Hepatozyten beeinflußt (Halbert et al., 1995; Ponnazhagan et al., 1997; Miao et al., 2000). Daher konnte in diesem Tumormodell ein Einfluß einer Promotorregulation auf die Unterschiede in der Expression bei der Verwendung des Vektors CMV-hR*luc* weder ausgeschlossen noch bestätigt werden.

Dennoch wurde in dieser speziellen Konstellation eine signifikante Tumorpräferenz bezüglich der Expression erzielt.

Insgesamt konnte durch diese Untersuchung *in vivo* keine verstärkte Genexpression im Tumorgewebe mithilfe der P4-*ns1*-P38 Kassette festgestellt werden gegenüber einem AAV Vektor, dessen Genexpression von dem CMV Promotor-Enhancer kontrolliert wurde. Die hier vorgestellten Daten wurden nur an einem Tumormodell gewonnen und es erscheint sinnvoll, sie an anderen Modellen zu überprüfen.

Für die Untersuchung der P4 Promotorregulation *in vivo* mußte ein Tumormodell verwendet werden, bei dem ein Vergleich der Expression der Vektoren in Tumorzellen mit dem homologen Normalgewebe möglich ist. Die Verwendung von Morris Hepatokarzinom Zellen (MH3924A) ermöglichte den direkten Vergleich der Genexpression im Leberkarzinom gegenüber der im normalen Leberparenchym mit allen Vektoren, brachte aber den Nachteil mit sich, daß diese Zellen weniger permissiv für eine Transduktion mit AAV-2 Vektoren sind als für eine Transduktion mit dem H-1 Vektor (Kap.4.6 Abb.21).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Aufarbeitung des Gewebes zu einem Zell-Lysat nicht untersucht werden, welche Zellen des Lebergewebes durch die verwendeten Vektoren transduziert wurden. In vorausgegangenen Experimenten wurde durch die Verwendung GFP-exprimierender Vektoren versucht, die Transduktion Gewebeschnitten bestimmen. in zu Durch die Transduzierbarkeit mit dem AAV-2 Hybridvektor konnten jedoch nur einzelne, wenige GFP-exprimierende Zellen in Tumor-Gewebeschnitten identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Bei einer Verwendung des AAV-2 Kapsids kann es durch den natürlichen Tropismus als wahrscheinlich angenommen werden, daß vornehmlich Hepatozyten und Kupffersche Zellen infiziert wurden (vergleiche dazu 5.2). Obwohl Hepatozyten das Potential zur Proliferation besitzen, ruht der größte Teil von ihnen. In einem Zeitraum von 36 Tagen wurde in den Lebern von Mäusen ein Anteil von 15% der Hepatozyten ermittelt, die eine DNA-Synthesephase durchlaufen haben (Miao et al., 2000). Nach einer partiellen Hepatektomie stieg dieser Anteil auf 50% der Hepatozyten an. Die Transduktion von AAV-2 Vektoren konnte durch die Stimulierung der Proliferation jedoch nicht gesteigert werden und eine Korrelation zwischen proliferierenden Hepatozyten und transduzierten Hepatozyten wurde nicht gefunden.

AAV-2 Vektoren können sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen transduzieren (McCown et al., 1996; Xiao et al., 1996; Miao et al., 2000), im Gegensatz zu den Vektoren der autonom replizierenden Parvoviren, die eine strikte Abhängigkeit von der S-Phase des Zellzyklus besitzen. In Abhängigkeit von

ZyklinA/cdk2 findet die Einzelstrangkonversion der autonom replizierenden Parvoviren in der S-Phase des Zellzyklus statt (Bashir et al., 2000), wobei die Verwendung des S-Phase spezifischen E2F Elements im P4 Promotor der dadurch vorgegebenen intrazellulären Umgebung Rechnung trägt (Deleu et al., 1999). Eine Steigerung der Genexpression in transformierten Zellen vs. nicht-transformierten Zellen wurde für Vektoren der autonom replizierenden Parvoviren, die sich von MVMp beziehungsweise H-1 Virus ableiteten, nur *in vitro* gezeigt (Dupont et al., 2000; Moehler et al., 2001), wurde aber bisher *in vivo* nicht untersucht. *In vitro* wurde ein signifikanter Unterschied in der Transduktion von verschiedenen humanen Hepatokarzinom Zellinien gegenüber Hepatozyten durch H-1 Vektoren beschrieben (Moehler et al., 2001). In diesen Experimenten konnten die verwendeten primären Hepatozyten zwar die S-Phase des Zellzyklus vollenden, sich aber unter den gegebenen Zellkulturbedingungen nicht mehr teilen, so daß ein Einfluß der experimentellen *in vitro* Bedingungen auf das Ergebnis nicht ausgeschlossen werden kann.

In den Untersuchungen zur P4 Promotoraktivierung wurden Zellen verwendet, die durch aktiviertes Ha-Ras oder SV40 T-Antigen transformiert waren oder diese Onkogene durch Transfektion entsprechender Plasmide exprimierten (Gu et al., 1995; Perros et al., 1995; Fuks et al., 1996). In diesen Experimenten konnte in parentalen Fisher Ratten Fibroblasten (FR3T3) die P4 Promotoraktivität durch die Expression von aktiviertem Ha-Ras vierfach gesteigert werden, wobei diese Stimulation zum Teil, aber nicht ausschließlich durch die in diesen Experimenten untersuchte Interaktion des Transkriptionsfaktors Ets mit der EBS des P4 Promotors vermittelt wurde (Fuks et al., 1996).

SV40 T-Antigen bindet intrazelluläres p53 und die pRB Proteine und inhibiert deren Funktionen (Ali et al., 2001; Pipas et al., 2001). Die Expression von aktiviertem Ha-Ras Onkoprotein führt in humanen oesophagealen Keratinozyten nur dann zu einer Transformation, wenn der pRB Signalweg inaktiviert ist (Takaoka et al., 2004). Die Inhibition der Funktion der pRB Proteine ist ursächlich für eine Stimulierung der E2F vermittelten Transkription. Der P4 Promotor enthält eine Bindungsstelle für E2F, die essentiell für die Promotoraktivierung ist (Deleu et al., 1999). Der molekulare und funktionelle Status der pRB Proteine wie auch von Proto-Onkogenprodukten der in dem Tumormodell verwendeten MH3924A Hepatokarzinomzellen ist nicht bekannt. So erscheint es interessant, ob sich die Transduzierbarkeit und Permissivität der MH3924A Zellen gegenüber den jeweiligen Vektoren durch eine zusätzliche Transformation mit aktiviertem Ha-Ras Onkoprotein verändern ließe, und weiterhin,

ob in einem *in vivo* Tumormodell eine ausgeprägtere Präferenz für eine Expression in diesen MH3924A-Ras Zellen nachweisbar wäre.

Vor dem Hintergrund, daß einerseits die Transduktion der MH3924A Zellen mit den AAV-2 Vektoren limitierend war (Kap. 4.6 Abb.21), andererseits aber die Transduktion durch γ -Bestrahlung oder Chemotherapeutika in verschiedenen Zellen *in vitro* und *in vivo* stimuliert werden kann (Peng et al., 2000; Kanazawa et al., 2001/2003; Kap. 4.2.2-4.2.5), wäre es im Hinblick auf eine Kombinationstherapie aufschlußreich, die Expressionen der Vektoren in einer Kombination mit einer Bestrahlung in dem in dieser Arbeit verwendeten Tumormodell zu vergleichen.

Sowohl bei der Verwendung des Hybridvektors als auch bei der des H-1 Vektors war die Genexpression in dem MH3924A Tumor im Vergleich zum Leberparenchym 1,6—14,5—fach erhöht. Zwar zeigten diese Vektoren damit eine Präferenz für eine Genexpression im Tumorgewebe, aber die Genexpression war nicht selektiv im Tumorgewebe. Es ist naheliegend zu vermuten, daß die Onkoprotein vermittelte Regulation des P4 Promotors zu dem Effekt des ausgeprägten Onkotropismus der autonom replizierenden Parvoviren beitragen kann, daß aber eine wesentliche Rolle in der Regulation des P4 Promotors dem E2F Element zukommt.

Wie bereits eingangs beschrieben beruht der Effekt eines Onkotropismus und einer Onkolyse der autonom replizierenden Parvoviren zum Teil auf einer verstärkten Expressionsaktivität des P4 Promotors, die zu einer Akkumulation von NS1 Protein führt, und weiterhin auch auf der Modulation der Toxizität von NS1 Protein in transformierten Zellen. Diese Komponenten bleiben in parvoviralen Vektoren grundsätzlich erhalten und wurden mit der Konstruktion des Hybridvektors auf einen AAV-2 Vektor übertragen. Da in dieser Arbeit bei einer Verwendung der P4-*ns1*-P38 Kassette zwar eine Präferenz für eine Genexpression im MH3924A Tumor, jedoch keine Selektivität in der Expressionsaktivität dieses Promotors festgestellt werden konnte, lassen diese Ergebnisse eine zentrale Rolle des NS1 Proteins bei der Onkolyse durch dessen phosphorylierungsabhängige Regulation (Nüesch et al., 1998 a/b) und transformationsabhängige Toxizität (Mousset et al., 1994) vermuten.

Das NS1 Protein ist in Infektionen mit dem Hybridvektor nicht nur ein Transaktivator des P38 Promotors, sondern vermittelt weitere Effekte, wie beispielsweise die Arretierung von Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus (Kap.4.4.3). Die Toxizität als eine Funktion dieses Proteins kann durch Mutationen an Phosphorylierungsstellen moduliert werden (Daeffler et al., 2003). Da die Aktivitäten des NS1 Proteins durch Phosphorylierungen durch zelluläre Kinasen reguliert werden (Nüesch et al., 2003; Lachmann et al., 2003) und für die Regulation der Zytotoxizität von NS1 Protein vermutlich keine anderen viralen Komponenten benötigt werden, bietet sich die

5. Diskussion

Verwendung dieses NS1 Proteins auch in anderen Vektorsystemen für eine Anti-Krebs Gentherapie an. Eine neoplastische Transformation von Zellen führt jedoch nicht in allen Fällen zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber einer Parvovirus vermittelten Lyse, sondern diese Lyse ist abhängig von der Art des Onkoproteins, wie c-Ha-Ras, v-Myc, v-Src oder SV40 T-Antigen (Salome et al., 1990). Daher bieten sich bei einer Verwendung von Vektoren der autonom replizierenden Parvoviren wie auch des Hybridvektors für eine Anti-Krebstherapie pro-apoptotische Transgene zur Verstärkung eines zytotoxischen Effekts an, wie z.B. eine Transgenexpression von Apoptin mit diesen Vektoren (Olijslagers et al., 2001).

6. Literaturverzeichnis

Ahn, J. K., Gavin, B. J., Kumar, G., and Ward, D. C. (1989). Transcriptional analysis of minute virus of mice P4 promoter mutants. *J. Virol.* **63**, 5425-5439.

Alexander, I. E., Russell, D. W., and Miller, A. D. (1994). DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **68**, 8282-8287.

Alexander, I. E., Russell, D. W., and Miller, A. D. (1997). Transfer of contaminants in adeno-associated virus vector stocks can mimic transduction and lead to artifactual results. *Hum.Gene Ther.* **8**, 1911-1920.

Alexander, I. E., Russell, D. W., Spence, A. M., and Miller, A. D. (1996). Effects of gamma irradiation on the transduction of dividing and nondividing cells in brain and muscle of rats by adeno-associated virus vectors. *Hum.Gene Ther.* **7**, 841-850.

Ali, S. H. and DeCaprio, J. A. (2001). Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin.Cancer Biol.* **11**, 15-23.

Anderson, W. F. (1998). Human gene therapy. Nature 392, 25-30.

Antoni, B. A., Rabson, A. B., Miller, I. L., Trempe, J. P., Chejanovsky, N., and Carter, B. J. (1991). Adeno-associated virus Rep protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in human cells. *J. Virol.* **65**, 396-404.

Ashktorab, H. and Srivastava, A. (1989). Identification of nuclear proteins that specifically interact with adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeat hairpin DNA. *J. Virol.* **63**, 3034-3039.

Astell, C. R., Chow, M. B., and 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**, 171-177.

Astell, C. R., Thomson, M., Chow, M. B., and Ward, D. C. (1983a). Structure and replication of minute virus of mice DNA. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **47 Pt 2**, 751-762.

Astell, C. R., Thomson, M., Merchlinsky, M., and Ward, D. C. (1983b). The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res.* **11**, 999-1018.

Atchison, R. W., Casto, B. C., and Hammon, W. M. (1965). Adenovirus-associated defective virus particles *Science* **149**, 754-756.

Bachmann, P. A., Hoggan, M. D., Kurstak, E., Melnick, J. L., Pereira, H. G., Tattersall, P., and Vago, C. (1979). Parvoviridae: second report. *Intervirology* **11**, 248-254.

Ball-Goodrich, L. J., Leland, S. E., Johnson, E. A., Paturzo, F. X., and Jacoby, R. O. (1998). Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup. *J. Virol.* **72**, 3289-3299.

Bantel-Schaal, U. (1990). Adeno-associated parvoviruses inhibit growth of cells derived from malignant human tumors. *Int.J.Cancer* **45**, 190-194.

Bantel-Schaal, U. and Stohr, M. (1992). Influence of adeno-associated virus on adherence and growth properties of normal cells. *J. Virol.* **66**, 773-779.

Bartlett, J. S., Samulski, R. J., and McCown, T. J. (1998). Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain. *Hum.Gene Ther.* **9**, 1181-1186.

Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J., and Willwand, K. (2000). Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 5522-5527.

- Batchu, R. B., Shammas, M. A., Wang, J. Y., Freeman, J., Rosen, N., and Munshi, N. C. (2002). Adeno-associated virus protects the retinoblastoma family of proteins from adenoviral-induced functional inactivation. *Cancer Res.* **62**, 2982-2985.
- Batchu, R. B., Shammas, M. A., Wang, J. Y., and Munshi, N. C. (1999). Interaction of adeno-associated virus Rep78 with p53: implications in growth inhibition. *Cancer Res.* **59**, 3592-3595.
- Batchu, R. B., Shammas, M. A., Wang, J. Y., and Munshi, N. C. (2001). Dual level inhibition of E2F-1 activity by adeno-associated virus Rep78. *J.Biol.Chem.* **276**, 24315-24322.
- Beaton, A., Palumbo, P., and Berns, K. I. (1989). Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J. Virol.* **63**, 4450-4454.
- Becerra, S. P., Koczot, F., Fabisch, P., and Rose, J. A. (1988). Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J. Virol.* **62**, 2745-2754.
- Becerra, S. P., Rose, J. A., Hardy, M., Baroudy, B. M., and Anderson, C. W. (1985). Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 7919-7923.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323.
- Bergs, V. V. (1969). Rat virus-mediated suppression of leukemia induction by Moloney virus in rats. *Cancer Res.* **29**, 1669-1672.
- Berns, K. I. (1990). Parvovirus replication. Microbiol. Rev. 54, 316-329.
- Berns, K. I. (1996). Parvoviridae: the viruses and their replication. Chapter 31. *Fundamental Virology, Third Edition*. Edited by B. M. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia
- Berns, K. I. and Adler, S. (1972). Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. *J. Virol.* **9**, 394-396.
- Berns, K. I. and Bohenzky, R. A. (1987). Adeno-associated viruses: an update. *Adv. Virus Res.* **32**, 243-306.
- Berns, K. I. and Rose, J. A. (1970). Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: isolation and separation of complementary single strands. *J. Virol.* **5**, 693-699.
- Blesch, A. (2004). Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods* **33**, 164-172.
- Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J. C., Rommelaere, J., and Salome, N. (1999). Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **73**, 7769-7779.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J.Cell Biol.* **106**, 761-771.
- Boukamp, P., Stanbridge, E. J., Foo, D. Y., Cerutti, P. A., and Fusenig, N. E. (1990). c-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential in vivo but lacks correlation with malignancy. *Cancer Res.* **50**, 2840-2847.
- Braun-Falco, M., Doenecke, A., Smola, H., and Hallek, M. (1999). Efficient gene transfer into human keratinocytes with recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* **6**, 432-441.

Brockhaus, K., Plaza, S., Pintel, D. J., Rommelaere, J., and Salome, N. (1996). Nonstructural proteins NS2 of minute virus of mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members. *J. Virol.* **70**, 7527-7534.

Brown, K. E., Anderson, S. M., and Young, N. S. (1993). Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**, 114-117.

Buller, R. M., Janik, J. E., Sebring, E. D., and Rose, J. A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* **40**, 241-247.

Buning, H., Braun-Falco, M., and Hallek, M. (2004). Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Cells Tissues.Organs* **177**, 139-150.

Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 8033-8037.

Carter, B. J., Antoni, B. A., and Klessig, D. F. (1992). Adenovirus containing a deletion of the early region 2A gene allows growth of adeno-associated virus with decreased efficiency. *Virology* **191**, 473-476.

Cassinotti, P., Weitz, M., and Tratschin, J. D. (1988). Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1. *Virology* **167**, 176-184.

Castro, M. G., Cowen, R., Williamson, I. K., David, A., Jimenez-Dalmaroni, M. J., Yuan, X., Bigliari, A., Williams, J. C., Hu, J., and Lowenstein, P. R. (2003). Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol.Ther.* **98**, 71-108.

Cathomen, T., Stracker, T. H., Gilbert, L. B., and Weitzman, M. D. (2001). A genetic screen identifies a cellular regulator of adeno-associated virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 14991-14996.

Chang, L. S. and Shenk, T. (1990). The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J. Virol.* **64**, 2103-2109.

Chang, L. S., Shi, Y., and Shenk, T. (1989). Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J. Virol.* **63**, 3479-3488.

Chapman, M. S. and Rossmann, M. G. (1993). Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology* **194**, 491-508.

Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., and Nevins, J. R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**, 1053-1061.

Chen, Y. Q., de Foresta, F., Hertoghs, J., Avalosse, B. L., Cornelis, J. J., and Rommelaere, J. (1986). Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res.* **46**, 3574-3579.

Cheung, A. K., Hoggan, M. D., Hauswirth, W. W., and Berns, K. I. (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J. Virol.* **33**, 739-748.

Chiorini, J. A., Wiener, S. M., Yang, L., Smith, R. H., Safer, B., Kilcoin, N. P., Liu, Y., Urcelay, E., and Kotin, R. M. (1996). The roles of AAV Rep proteins in gene expression and targeted integration. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **218**, 25-33.

Christensen, J., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1995). Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J. Virol.* **69**, 5422-5430.

- Christensen, J., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1997). A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J. Virol.* **71**, 1405-1416.
- Christensen, J., Pedersen, M., Aasted, B., and Alexandersen, S. (1995). Purification and characterization of the major nonstructural protein (NS-1) of Aleutian mink disease parvovirus. *J. Virol.* **69**, 1802-1809.
- Chu, D., Thistlethwaite, P. A., Sullivan, C. C., Grifman, M. S., and Weitzman, M. D. (2004). Gene delivery to the mammalian heart using AAV vectors. *Methods Mol.Biol.* **246**, 213-224.
- Coffer, P., de Jonge, M., Mettouchi, A., Binetruy, B., Ghysdael, J., and Kruijer, W. (1994). junB promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. *Oncogene* **9**, 911-921.
- Coffey, M. C., Strong, J. E., Forsyth, P. A., and Lee, P. W. (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* **282**, 1332-1334.
- Connors, T. A.(1986). Alkylating agents, nitrosoureas and alkyltriazenes. *Cancer Chemotherapy/8. The EORTC Cancer Chemotherapy Annual*, pp.28. edited by H. M. Pinedo and B. A. Chabner. Elsevier Science Publishers B. V.
- Corbau, R., Salom, N., Rommelaere, J., and Nuesch, J. P. (1999). Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells. *Virology* **259**, 402-415.
- Cornelis, J. J., Becquart, P., Duponchel, N., Salome, N., Avalosse, B. L., Namba, M., and 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**, 1679-1686.
- Cornelis, J. J., Chen, Y. Q., Spruyt, N., Duponchel, N., Cotmore, S. F., Tattersall, P., and Rommelaere, J. (1990). Susceptibility of human cells to killing by the parvoviruses H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription. *J. Virol.* **64**, 2537-2544.
- Cornelis, J. J., Salome, N., Dinsart, C., and Rommelaere, J. (2004). Vectors based on autonomous parvoviruses: novel tools to treat cancer? *J.Gene Med.* **6 Suppl 1**, S193-S202.
- Cornelis, J. J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S. F., Tal, J., and Rommelaere, J. (1988). Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62**, 3438-3444.
- Costello, E., Saudan, P., Winocour, E., Pizer, L., and Beard, P. (1997). High mobility group chromosomal protein 1 binds to the adeno-associated virus replication protein (Rep) and promotes Rep-mediated site-specific cleavage of DNA, ATPase activity and transcriptional repression. *EMBO J.* **16**, 5943-5954.
- Cotmore, S. F., Christensen, J., Nuesch, J. P., and Tattersall, P. (1995). The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]2-3. *J. Virol.* **69**, 1652-1660.
- Cotmore, S. F., Christensen, J., and Tattersall, P. (2000). Two widely spaced initiator binding sites create an HMG1-dependent parvovirus rolling-hairpin replication origin. *J. Virol.* **74**, 1332-1341.
- Cotmore, S. F., D'abramo, A. M., Jr., Carbonell, L. F., Bratton, J., and Tattersall, P. (1997). The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology* **231**, 267-280.
- Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1986a). Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **58**, 724-732.
- Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1986b). The NS-1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. *Virus Res.* **4**, 243-250.

Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1994). An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO J.* **13**, 4145-4152.

Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1998). High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin. *J. Virol.* **72**, 8477-8484.

Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (2003). Resolution of parvovirus dimer junctions proceeds through a novel heterocruciform intermediate. *J. Virol.* **77**, 6245-6254.

Cziepluch, C., Lampel, S., Grewenig, A., Grund, C., Lichter, P., and Rommelaere, J. (2000). H-1 parvovirus-associated replication bodies: a distinct virus-induced nuclear structure. *J. Virol.* **74**, 4807-4815.

Daeffler, L., Horlein, R., Rommelaere, J., and Nuesch, J. P. (2003). Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J. Virol.* **77**, 12466-12478.

de la Maza, L. M. and Carter, B. J. (1980). Heavy and light particles of adeno-associated virus. *J. Virol.* **33**, 1129-1137.

Dechecchi, M. C., Melotti, P., Bonizzato, A., Santacatterina, M., Chilosi, M., and Cabrini, G. (2001). Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J. Virol.* **75**, 8772-8780.

Deleu, L., Fuks, F., Spitkovsky, D., Horlein, R., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1998). Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells. *Mol.Cell Biol.* **18**, 409-419.

Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S., and 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**, 3877-3885.

Dinsart, C., Cornelis, J. J., and Rommelaere, J. (1996). Recombinant autonomous parvoviruses: new tools for the gene therapy of cancer? *Int J Chem Biotech*. pp32

Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S., and Shenk, T. (1996). Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* **272**, 1470-1473.

Dubielzig, R., King, J. A., Weger, S., Kern, A., and Kleinschmidt, J. A. (1999). Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsidation complexes. *J. Virol.* **73**, 8989-8998.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* **72**, 8463-8471.

Dupont, F. (2003). Risk assessment of the use of autonomous parvovirus-based vectors. *Curr.Gene Ther.* **3**, 567-582.

Dupont, F., Avalosse, B., Karim, A., Mine, N., Bosseler, M., Maron, A., Van den Broeke, A. V., Ghanem, G. E., Burny, A., and Zeicher, M. (2000). Tumor-selective gene transduction and cell killing with an oncotropic autonomous parvovirus-based vector. *Gene Ther.* **7**, 790-796.

Dupont, F., Tenenbaum, L., Guo, L. P., Spegelaere, P., Zeicher, M., and Rommelaere, J. (1994). Use of an autonomous parvovirus vector for selective transfer of a foreign gene into transformed human cells of different tissue origins and its expression therein. *J. Virol.* **68**, 1397-1406.

Dupressoir, T., Vanacker, J. M., Cornelis, J. J., Duponchel, N., and 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**, 3203-3208.

- Duverger, V., Sartorius, U., Klein-Bauernschmitt, P., Krammer, P. H., and Schlehofer, J. R. (2002). Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by infection with adeno-associated virus type 2. *Int.J.Cancer* **97**, 706-712.
- Eichwald, V., Daeffler, L., Klein, M., Rommelaere, J., and 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**, 10307-10319.
- Eisold, S., Dihlmann, S., Linnebacher, M., Ryschich, E., Aulmann, M., Schmidt, J., Schlehofer, J. R., Ridder, R., and von Knebel, D. M. (2002). Prevention of chemotherapy-related toxic side effects by infection with adeno-associated virus type 2. *Int.J.Cancer* **100**, 606-614.
- el Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y., and . (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **54**, 1169-1174.
- Erles, K., Sebokova, P., and Schlehofer, J. R. (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J.Med.Virol.* **59**, 406-411.
- Everts, M. and Curiel, D. T. (2004). Transductional targeting of adenoviral cancer gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **4**, 337-346.
- Ezelle, H. J., Markovic, D., and Barber, G. N. (2002). Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector. *J. Virol.* **76**, 12325-12334.
- Faisst, S., Perros, M., Deleu, L., Spruyt, N., and Rommelaere, J. (1994). Mapping of upstream regulatory elements in the P4 promoter of parvovirus minute virus of mice. *Virology* **202**, 466-470.
- Farkas, S. L., Zadori, Z., Benko, M., Essbauer, S., Harrach, B., and Tijssen, P. (2004). A parvovirus isolated from royal python (Python regius) is a member of the genus Dependovirus. *J.Gen. Virol.* **85**, 555-561.
- Feng, X., Eide, F. F., Jiang, H., and Reder, A. T. (2004). Adeno-associated viral vector-mediated ApoE expression in Alzheimer's disease mice: low CNS immune response, long-term expression, and astrocyte specificity. *Front Biosci.* **9**, 1540-1546.
- Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T., and Samulski, R. J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **70**, 3227-3234.
- Ferrari, F. K. (1999). Adeno-associated viral vectors. Chapter 7. *The development of human gene therapy.* Samulski, R. J., Sally, M., and Muzyczka, N.. Friedman (ed.). CSHL Press. pp 131
- Fisher, K. J., Gao, G. P., Weitzman, M. D., DeMatteo, R., Burda, J. F., and Wilson, J. M. (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J. Virol.* **70**, 520-532.
- Fisher, K. J., Kelley, W. M., Burda, J. F., and Wilson, J. M. (1996). A novel adenovirus-adeno-associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the AAV genome. *Hum.Gene Ther.* **7**, 2079-2087.
- Fitzgerald, D. J., Fusenig, N. E., Boukamp, P., Piccoli, C., Mesnil, M., and Yamasaki, H. (1994). Expression and function of connexin in normal and transformed human keratinocytes in culture. *Carcinogenesis* **15**, 1859-1865.
- Fuks, F., Deleu, L., Dinsart, C., Rommelaere, J., and Faisst, S. (1996). ras oncogene-dependent activation of the P4 promoter of minute virus of mice through a proximal P4 element interacting with the Ets family of transcription factors. *J. Virol.* **70**, 1331-1339.

Galien, R., Mercier, G., Garcette, M., and Emanoil-Ravier, R. (1991). ras oncogene activates the intracisternal A particle long terminal repeat promoter through a c-AMP response element. *Oncogene* **6**, 849-855.

Gancberg, D., Zeicher, M., Bakkus, M., Dupont, F., Leo, O., Moser, M., Spegelaere, P., Thielemans, K., Urbain, J., and Horth, M. (2000). Oncoselective transduction of CD80 and CD86 in tumor cell lines using an autonomous recombinant parvovirus. *Anticancer Res.* **20**, 1825-1832.

Gao, G. P., Alvira, M. R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J. M. (2002). Novel adenoassociated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 11854-11859.

Garbutt, M., Liebscher, R., Wahl-Jensen, V., Jones, S., Moller, P., Wagner, R., Volchkov, V., Klenk, H. D., Feldmann, H., and Stroher, U. (2004). Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J. Virol.* **78**, 5458-5465.

Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J., and zur, H. H. (1984). Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* **134**, 64-71.

Giedlin, M. A., Cook, D. N., and Dubensky, T. W., Jr. (2003). Vesicular stomatitis virus: an exciting new therapeutic oncolytic virus candidate for cancer or just another chapter from Field's Virology? *Cancer Cell* **4**, 241-243.

Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G., and Hallek, M. (1999). Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat.Med.* **5**, 1438.

Glorioso, J. C. and Fink, D. J. (2004). Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system. *Annu.Rev.Microbiol.* **58**, 253-271.

Goins, W. F., Wolfe, D., Krisky, D. M., Bai, Q., Burton, E. A., Fink, D. J., and Glorioso, J. C. (2004). Delivery using herpes simplex virus: an overview. *Methods Mol.Biol.* **246**, 257-299.

Grander, D. and Einhorn, S. (1998). Interferon and malignant disease--how does it work and why doesn't it always? *Acta Oncol.* **37**, 331-338.

Green, M. R. and Roeder, R. G. (1980a). Definition of a novel promoter for the major adenovirus-associated virus mRNA. *Cell* **22**, 231-242.

Green, M. R. and Roeder, R. G. (1980b). Transcripts of the adeno-associated virus genome: mapping of the major RNAs. *J. Virol.* **36**, 79-92.

Green, N. K. and Seymour, L. W. (2002). Adenoviral vectors: systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Ther.* **9**, 1036-1042.

Grifman, M., Chen, N. N., Gao, G. P., Cathomen, T., Wilson, J. M., and Weitzman, M. D. (1999). Overexpression of cyclin A inhibits augmentation of recombinant adeno-associated virus transduction by the adenovirus E4orf6 protein. *J. Virol.* **73**, 10010-10019.

Grimm, D. (2002). Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods* **28**, 146-157.

Grimm, D. and Kay, M. A. (2003). From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr.Gene Ther.* **3**, 281-304.

Grimm, D., Kay, M. A., and Kleinschmidt, J. A. (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol.Ther.* **7**, 839-850.

Groner, B., Herrlich, P., Kennedy, N., Ponta, H., Rahmsdorf, U., and Hynes, N. E. (1982). Delimitation of a DNA sequence which confers inducibility by glucocorticoid hormones *J.Cell Biochem.* **20**, 349-357.

Gu, Z., Plaza, S., Perros, M., Cziepluch, C., Rommelaere, J., and Cornelis, J. J. (1995). NF-Y controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interaction with an unusual binding site. *J. Virol.* **69**, 239-246.

Habener, J. F. (1990). Cyclic AMP response element binding proteins: a cornucopia of transcription factors. *Mol.Endocrinol.* **4**, 1087-1094.

Halbert, C. L., Alexander, I. E., Wolgamot, G. M., and Miller, A. D. (1995). Adeno-associated virus vectors transduce primary cells much less efficiently than immortalized cells. *J. Virol.* **69**, 1473-1479.

den Hartigh, J., Verweij, J., and Pinedo, H. M. (1986). Mitomycin C. *Cancer Chemotherapy/8. The EORTC Cancer Chemotherapy Annual*, pp.73. edited by H. M. Pinedo and B. A. Chabner. Elsevier Science Publishers B. V.

Hauswirth, W. W. and Berns, K. I. (1979b). Adeno-associated virus DNA replication: nonunit-length molecules. *Virology* **93**, 57-68.

Hauswirth, W. W. and Berns, K. I. (1979a). Adeno-associated virus DNA replication: nonunit-length molecules. *Virology* **93**, 57-68.

Heilbronn, R., Burkle, A., Stephan, S., and zur, H. H. (1990). The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification *J. Virol.* **64**, 3012-3018.

Hermanns, J., Schulze, A., Jansen, D., Kleinschmidt, J. A., Schmidt, R., and zur, H. H. (1997). Infection of primary cells by adeno-associated virus type 2 results in a modulation of cell cycle-regulating proteins. *J. Virol.* **71**, 6020-6027.

Herold-Mende, C., Steiner, H. H., Andl, T., Riede, D., Buttler, A., Reisser, C., Fusenig, N. E., and Mueller, M. M. (1999). Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Lab Invest* **79**, 1573-1582.

Herrero, Y. C., Cornelis, J. J., Herold-Mende, C., Rommelaere, J., Schlehofer, J. R., and Geletneky, K. (2004). Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. *Int.J.Cancer* **109**, 76-84.

Herzog, R. W. (2004). AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle. *Methods Mol.Biol.* **246**, 179-194.

Hillgenberg, M., Schlehofer, J. R., von Knebel, D. M., and Klein-Bauernschmitt, P. (1999). Enhanced sensitivity of small cell lung cancer cell lines to cisplatin and etoposide after infection with adenoassociated virus type 2. *Eur.J.Cancer* **35**, 106-110.

Hoggan, M. D. (1970). Adenovirus associated viruses. *Prog.Med.Virol.* 12, 211-239.

Hoggan, M. D., Blacklow, N. R., and Rowe, W. P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **55**, 1467-1474.

Horer, M., Weger, S., Butz, K., Hoppe-Seyler, F., Geisen, C., and Kleinschmidt, J. A. (1995). Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *J. Virol.* **69**, 5485-5496.

Im, D. S. and Muzyczka, N. (1989). Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats. *J. Virol.* **63**, 3095-3104.

Im, D. S. and Muzyczka, N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* **61**, 447-457.

- Im, D. S. and Muzyczka, N. (1992). Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J. Virol.* **66**, 1119-1128.
- Janik, J. E., Huston, M. M., Cho, K., and Rose, J. A. (1989). Efficient synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both adenovirus DNA binding protein and VA I RNA. *Virology* **168**, 320-329.
- Johnson, F. B., Ozer, H. L., and Hoggan, M. D. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *J. Virol.* **8**, 860-863.
- Kaludov, N., Brown, K. E., Walters, R. W., Zabner, J., and Chiorini, J. A. (2001). Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J. Virol.* **75**, 6884-6893.
- Kanazawa, T., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nishino, H., Takeuchi, K., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K. (2003). Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice. *Gene Ther.* **10**, 51-58.
- Kanazawa, T., Urabe, M., Mizukami, H., Okada, T., Kume, A., Nishino, H., Monahan, J., Kitamura, K., Ichimura, K., and Ozawa, K. (2001). Gamma-rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytocidal effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells. *Cancer Gene Ther.* **8**, 99-106.
- Kearns, W. G., Afione, S. A., Fulmer, S. B., Pang, M. C., Erikson, D., Egan, M., Landrum, M. J., Flotte, T. R., and Cutting, G. R. (1996). Recombinant adeno-associated virus (AAV-CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Ther.* **3**, 748-755.
- Kedar, P. S., Lowy, D. R., Widen, S. G., and Wilson, S. H. (1990). Transfected human beta-polymerase promoter contains a ras-responsive element. *Mol.Cell Biol.* **10**, 3852-3856.
- Kedar, P. S., Widen, S. G., Englander, E. W., Fornace, A. J., Jr., and Wilson, S. H. (1991). The ATF/CREB transcription factor-binding site in the polymerase beta promoter mediates the positive effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 3729-3733.
- Kestler, J., Neeb, B., Struyf, S., Van Damme, J., Cotmore, S. F., D'Abramo, A., Tattersall, P., Rommelaere, J., Dinsart, C., and Cornelis, J. J. (1999). cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum.Gene Ther.* **10**, 1619-1632.
- King, J. A., Dubielzig, R., Grimm, D., and Kleinschmidt, J. A. (2001). DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.* **20**, 3282-3291.
- Klein, R. L., Meyer, E. M., Peel, A. L., Zolotukhin, S., Meyers, C., Muzyczka, N., and King, M. A. (1998). Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Exp.Neurol.* **150**, 183-194.
- Kodukula, P., Liu, T., Rooijen, N. V., Jager, M. J., and Hendricks, R. L. (1999). Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J.Immunol.* **162**, 2895-2905.
- Koering, C. E., Dupressoir, T., Plaza, S., Stehelin, D., and Rommelaere, J. (1994). Induced expression of the conditionally cytotoxic herpes simplex virus thymidine kinase gene by means of a parvoviral regulatory circuit. *Hum.Gene Ther.* **5**, 457-463.
- Kotin, R. M., Linden, R. M., and Berns, K. I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* **11**, 5071-5078.
- Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K. I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 2211-2215.

- Krady, J. K. and Ward, D. C. (1995). Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol.Cell Biol.* **15**, 524-533.
- Kronenberg, S., Kleinschmidt, J. A., and Bottcher, B. (2001). Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO Rep.* **2**, 997-1002.
- Kuntz-Simon, G., Bashir, T., Rommelaere, J., and Willwand, K. (1999). Neoplastic transformation-associated stimulation of the in vitro resolution of concatemer junction fragments from minute virus of mice DNA. *J. Virol.* **73**, 2552-2558.
- Kyostio, S. R., Owens, R. A., Weitzman, M. D., Antoni, B. A., Chejanovsky, N., and Carter, B. J. (1994). Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels. *J. Virol.* **68**, 2947-2957.
- Kyostio, S. R., Wonderling, R. S., and Owens, R. A. (1995). Negative regulation of the adeno-associated virus (AAV) P5 promoter involves both the P5 rep binding site and the consensus ATP-binding motif of the AAV Rep68 protein. *J. Virol.* **69**, 6787-6796.
- Labow, M. A., Hermonat, P. L., and Berns, K. I. (1986). Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J. Virol.* **60**, 251-258.
- Lachmann, S., Rommeleare, J., and Nuesch, J. P. (2003). Novel PKCeta is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of minute virus of mice. *J. Virol.* **77**, 8048-8060.
- Lackner, D. F. and Muzyczka, N. (2002). Studies of the mechanism of transactivation of the adeno-associated virus p19 promoter by Rep protein. *J. Virol.* **76**, 8225-8235.
- Lai, C. M., Lai, Y. K., and Rakoczy, P. E. (2002). Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol.* **21**, 895-913.
- Laughlin, C. A., Cardellichio, C. B., and Coon, H. C. (1986). Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J. Virol.* **60**, 515-524.
- Laughlin, C. A., Myers, M. W., Risin, D. L., and Carter, B. J. (1979). Defective-interfering particles of the human parvovirus adeno-associated virus. *Virology* **94**, 162-174.
- Laughlin, C. A., Tratschin, J. D., Coon, H., and Carter, B. J. (1983). Cloning of infectious adenoassociated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene* **23**, 65-73.
- Legendre, D. and 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**, 5705-5713.
- Legendre, D. and Rommelaere, J. (1994). Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **68**, 7974-7985.
- Li, J., Samulski, R. J., and Xiao, X. (1997). Role for highly regulated rep gene expression in adeno-associated virus vector production. *J. Virol.* **71**, 5236-5243.
- Li, X. and Rhode, S. L., III (1993). The parvovirus H-1 NS2 protein affects viral gene expression through sequences in the 3' untranslated region. *Virology* **194**, 10-19.
- Lichty, B. D., Power, A. T., Stojdl, D. F., and Bell, J. C. (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol.Med.* **10**, 210-216.
- Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E., and Berns, K. I. (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 11288-11294.
- Linden, R. M., Winocour, E., and Berns, K. I. (1996). The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 7966-7972.

- Lopez-Bueno, A., Valle, N., Gallego, J. M., Perez, J., and Almendral, J. M. (2004). Enhanced cytoplasmic sequestration of the nuclear export receptor CRM1 by NS2 mutations developed in the host regulates parvovirus fitness. *J. Virol.* **78**, 10674-10684.
- Lorson, C., Burger, L. R., Mouw, M., and Pintel, D. J. (1996). Efficient transactivation of the minute virus of mice P38 promoter requires upstream binding of NS1. *J. Virol.* **70**, 834-842.
- Lorson, C., Pearson, J., Burger, L., and Pintel, D. J. (1998). An Sp1-binding site and TATA element are sufficient to support full transactivation by proximally bound NS1 protein of minute virus of mice. *Virology* **240**, 326-337.
- Lou, E. (2003). Oncolytic herpes viruses as a potential mechanism for cancer therapy. *Acta Oncol.* **42**, 660-671.
- Lusby, E., Bohenzky, R., and Berns, K. I. (1981). Inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: independence of the orientation at either end of the genome. *J. Virol.* **37**, 1083-1086.
- Lusby, E., Fife, K. H., and Berns, K. I. (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* **34**, 402-409.
- Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* **9**, 935-944.
- Mah, C., Qing, K., Khuntirat, B., Ponnazhagan, S., Wang, X. S., Kube, D. M., Yoder, M. C., and Srivastava, A. (1998). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression. *J. Virol.* **72**, 9835-9843.
- Markert, J. M., Medlock, M. D., Rabkin, S. D., Gillespie, G. Y., Todo, T., Hunter, W. D., Palmer, C. A., Feigenbaum, F., Tornatore, C., Tufaro, F., and Martuza, R. L. (2000). Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* **7**, 867-874.
- Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G. J., Iwaki, Y., and Colosi, P. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther.* **5**, 938-945.
- Mayor, H. D., Torikai, K., Melnick, J. L., and Mandel, M. (1969). Plus and minus single-stranded DNA separately encapsidated in adeno-associated satellite virions. *Science* **166**, 1280-1282.
- McCarty, D. M., Christensen, M., and Muzyczka, N. (1991). Sequences required for coordinate induction of adeno-associated virus p19 and p40 promoters by Rep protein. *J. Virol.* **65**, 2936-2945.
- McCarty, D. M., Monahan, P. E., and Samulski, R. J. (2001). Self-complementary recombinant adenoassociated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* **8**, 1248-1254.
- McCarty, D. M., Ni, T. H., and Muzyczka, N. (1992). Analysis of mutations in adeno-associated virus Rep protein in vivo and in vitro. *J. Virol.* **66**, 4050-4057.
- McCarty, D. M., Pereira, D. J., Zolotukhin, I., Zhou, X., Ryan, J. H., and Muzyczka, N. (1994). Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* **68**, 4988-4997.
- McCarty, D. M., Ryan, J. H., Zolotukhin, S., Zhou, X., and Muzyczka, N. (1994). Interaction of the adeno-associated virus Rep protein with a sequence within the A palindrome of the viral terminal repeat. *J. Virol.* **68**, 4998-5006.
- McCarty, D. M., Young, S. M., Jr., and Samulski, R. J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu.Rev.Genet.* **38**, 819-845.

- McCormack, M. P. and Rabbitts, T. H. (2004). Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N.Engl.J.Med.* **350**, 913-922.
- McCown, T. J., Xiao, X., Li, J., Breese, G. R., and Samulski, R. J. (1996). Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res.* **713**, 99-107.
- McKisic, M. D., Paturzo, F. X., and Smith, A. L. (1996). Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T cell effector functions. *Transplantation* **61**, 292-299.
- McLaughlin, S. K., Collis, P., Hermonat, P. L., and Muzyczka, N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* **62**, 1963-1973.
- McPherson, R. A., Rosenthal, L. J., and Rose, J. A. (1985). Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* **147**, 217-222.
- Mellerick, D. M. and Fraser, N. W. (1987). Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology* **158**, 265-275.
- Mendelson, E., Trempe, J. P., and Carter, B. J. (1986). Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J. Virol.* **60**, 823-832.
- Miao, C. H., Nakai, H., Thompson, A. R., Storm, T. A., Chiu, W., Snyder, R. O., and Kay, M. A. (2000). Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J. Virol.* **74**, 3793-3803.
- Miller, D. G., Adam, M. A., and Miller, A. D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol.Cell Biol.* **10**, 4239-4242.
- Miller, D. G., Petek, L. M., and Russell, D. W. (2004). Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat.Genet.* **36**, 767-773.
- Mineta, T., Rabkin, S. D., Yazaki, T., Hunter, W. D., and Martuza, R. L. (1995). Attenuated multimutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat.Med.* **1**, 938-943.
- Moehler, M., Blechacz, B., Weiskopf, N., Zeidler, M., Stremmel, W., Rommelaere, J., Galle, P. R., and Cornelis, J. J. (2001). Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors. *Cancer Gene Ther.* **8**, 158-167.
- Morgan, W. R. and Ward, D. C. (1986). Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all minute virus of mice RNAs *J. Virol.* **60**, 1170-1174.
- Mousset, S., Cornelis, J., Spruyt, N., and Rommelaere, J. (1986). Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular Harvey-ras oncogene or the polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute-virus-of-mice. *Biochimie* **68**, 951-955.
- Mousset, S., Ouadrhiri, Y., Caillet-Fauquet, P., and Rommelaere, J. (1994). The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J. Virol.* **68**, 6446-6453.
- Muller, O. J., Kaul, F., Weitzman, M. D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J. A., and Trepel, M. (2003). Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat.Biotechnol.* **21**, 1040-1046.
- Muzyczka, N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **158**, 97-129.
- Myers, M. W., Laughlin, C. A., Jay, F. T., and Carter, B. J. (1980). Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: effect of temperature-sensitive mutations in adenovirus early gene region *J. Virol.* **35**, 65-75.

- Naeger, L. K., Cater, J., and Pintel, D. J. (1990). The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner *J. Virol.* **64**, 6166-6175.
- Naeger, L. K., Salome, N., and Pintel, D. J. (1993). NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells *J. Virol.* **67**, 1034-1043.
- Nakai, H., Montini, E., Fuess, S., Storm, T. A., Grompe, M., and Kay, M. A. (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice *Nat.Genet.* **34**, 297-302.
- Nakai, H., Storm, T. A., and Kay, M. A. (2000). Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo *J. Virol.* **74**, 9451-9463.
- Nakai, H., Yant, S. R., Storm, T. A., Fuess, S., Meuse, L., and Kay, M. A. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo *J. Virol.* **75**, 6969-6976.
- Nettelbeck, D. M., Jerome, V., and Muller, R. (2000). Gene therapy: designer promoters for tumour targeting *Trends Genet.* **16**, 174-181.
- Niculescu, A. B., III, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S. I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication *Mol.Cell Biol.* **18**, 629-643.
- Nuesch, J. P., Corbau, R., Tattersall, P., and Rommelaere, J. (1998). Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated In vitro by the phosphorylation state of the polypeptide *J. Virol.* **72**, 8002-8012.
- Nuesch, J. P., Cotmore, S. F., and 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**, 122-135.
- Nuesch, J. P., Dettwiler, S., Corbau, R., and Rommelaere, J. (1998). Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through protein kinase C *J. Virol.* **72**, 9966-9977.
- Nuesch, J. P., Lachmann, S., Corbau, R., and Rommelaere, J. (2003). Regulation of minute virus of mice NS1 replicative functions by atypical PKClambda in vivo *J. Virol.* **77**, 433-442.
- Nuesch, J. P. and Tattersall, P. (1993). Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport *Virology* **196**, 637-651.
- Ohshima, T., Iwama, M., Ueno, Y., Sugiyama, F., Nakajima, T., Fukamizu, A., and Yagami, K. (1998). Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection *J.Gen.Virol.* **79 (Pt 12)**, 3067-3071.
- Ohshima, T., Nakajima, T., Oishi, T., Imamoto, N., Yoneda, Y., Fukamizu, A., and Yagami, K. (1999). CRM1 mediates nuclear export of nonstructural protein 2 from parvovirus minute virus of mice *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **264**, 144-150.
- Olijslagers, S., Dege, A. Y., Dinsart, C., Voorhoeve, M., Rommelaere, J., Noteborn, M. H., and Cornelis, J. J. (2001). Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther.* **8**, 958-965.
- Op, D. B., Anouja, F., Mousset, S., Rommelaere, J., and Caillet-Fauquet, P. (1995). The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2 *Cell Growth Differ.* **6**, 781-787.
- Op, D. B. and Caillet-Fauquet, P. (1997). The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin? *J. Virol.* **71**, 5323-5329.

- Op, D. B., Sobczak-Thepot, J., Sirma, H., Bourgain, F., Brechot, C., and Caillet-Fauquet, P. (2001). NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1) *J. Virol.* **75**, 11071-11078.
- Owens, R. A., Trempe, J. P., Chejanovsky, N., and Carter, B. J. (1991). Adeno-associated virus rep proteins produced in insect and mammalian expression systems: wild-type and dominant-negative mutant proteins bind to the viral replication origin *Virology* **184**, 14-22.
- Owens, R. A., Weitzman, M. D., Kyostio, S. R., and Carter, B. J. (1993). Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins *J. Virol.* **67**, 997-1005.
- Pankov, R., Neznanov, N., Umezawa, A., and Oshima, R. G. (1994). AP-1, ETS, and transcriptional silencers regulate retinoic acid-dependent induction of keratin 18 in embryonic cells *Mol.Cell Biol.* **14**, 7744-7757.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 8392-8396.
- Pecora, A. L., Rizvi, N., Cohen, G. I., Meropol, N. J., Sterman, D., Marshall, J. L., Goldberg, S., Gross, P., O'Neil, J. D., Groene, W. S., Roberts, M. S., Rabin, H., Bamat, M. K., and Lorence, R. M. (2002). Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers *J.Clin.Oncol.* **20**, 2251-2266.
- Peden, C. S., Burger, C., Muzyczka, N., and Mandel, R. J. (2004). Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain *J. Virol.* **78**, 6344-6359.
- Peng, D., Qian, C., Sun, Y., Barajas, M. A., and Prieto, J. (2000). Transduction of hepatocellular carcinoma (HCC) using recombinant adeno-associated virus (rAAV): in vitro and in vivo effects of genotoxic agents *J.Hepatol.* **32**, 975-985.
- Perabo, L., Buning, H., Kofler, D. M., Ried, M. U., Girod, A., Wendtner, C. M., Enssle, J., and Hallek, M. (2003). In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display *Mol.Ther.* **8**, 151-157.
- Pereira, D. J., McCarty, D. M., and Muzyczka, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection *J. Virol.* **71**, 1079-1088.
- Pereira, D. J. and Muzyczka, N. (1997a). The adeno-associated virus type 2 p40 promoter requires a proximal Sp1 interaction and a p19 CArG-like element to facilitate Rep transactivation *J. Virol.* **71**, 4300-4309.
- Pereira, D. J. and Muzyczka, N. (1997b). The cellular transcription factor SP1 and an unknown cellular protein are required to mediate Rep protein activation of the adeno-associated virus p19 promoter *J. Virol.* **71**, 1747-1756.
- Perros, M., Deleu, L., Vanacker, J. M., Kherrouche, Z., Spruyt, N., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1995). Upstream CREs participate in the basal activity of minute virus of mice promoter P4 and in its stimulation in ras-transformed cells. *J. Virol.* **69**, 5506-5515.
- Philpott, N. J., Giraud-Wali, C., Dupuis, C., Gomos, J., Hamilton, H., Berns, K. I., and Falck-Pedersen, E. (2002). Efficient integration of recombinant adeno-associated virus DNA vectors requires a p5-rep sequence in cis *J. Virol.* **76**, 5411-5421.
- Philpott, N. J., Gomos, J., Berns, K. I., and Falck-Pedersen, E. (2002). A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19 *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 12381-12385.
- Pipas, J. M. and Levine, A. J. (2001). Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis *Semin.Cancer Biol.* **11**, 23-30.

- Pitluk, Z. W. and Ward, D. C. (1991). Unusual Sp1-GC box interaction in a parvovirus promoter *J. Virol.* **65**, 6661-6670.
- Ponnazhagan, S. (2004). Parvovirus vectors for cancer gene therapy Expert. Opin. Biol. Ther. 4, 53-64.
- Ponnazhagan, S., Mukherjee, P., Yoder, M. C., Wang, X. S., Zhou, S. Z., Kaplan, J., Wadsworth, S., and Srivastava, A. (1997). Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice *Gene* **190**, 203-210.
- Porteus, M. H., Cathomen, T., Weitzman, M. D., and Baltimore, D. (2003). Efficient gene targeting mediated by adeno-associated virus and DNA double-strand breaks *Mol.Cell Biol.* **23**, 3558-3565.
- Prasad, K. M. and Trempe, J. P. (1995). The adeno-associated virus Rep78 protein is covalently linked to viral DNA in a preformed virion *Virology* **214**, 360-370.
- Pujol, A., Deleu, L., Nuesch, J. P., Cziepluch, C., Jauniaux, J. C., and Rommelaere, J. (1997). Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1 *J. Virol.* **71**, 7393-7403.
- Qing, K., Hansen, J., Weigel-Kelley, K. A., Tan, M., Zhou, S., and Srivastava, A. (2001). Adenoassociated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression *J. Virol.* **75**, 8968-8976.
- Qing, K., Li, W., Zhong, L., Tan, M., Hansen, J., Weigel-Kelley, K. A., Chen, L., Yoder, M. C., and Srivastava, A. (2003). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular T-cell protein tyrosine phosphatase in transgene expression in established cell lines in vitro and transgenic mice in vivo *J. Virol.* **77**, 2741-2746.
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., and Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2 *Nat.Med.* **5**, 71-77.
- Qing, K., Wang, X. S., Kube, D. M., Ponnazhagan, S., Bajpai, A., and Srivastava, A. (1997). Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 10879-10884.
- Qiu, J., Handa, A., Kirby, M., and Brown, K. E. (2000). The interaction of heparin sulfate and adenoassociated virus 2 *Virology* **269**, 137-147.
- Raj, K., Ogston, P., and Beard, P. (2001). Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity *Nature* **412**, 914-917.
- Ran, Z., Rayet, B., Rommelaere, J., and Faisst, S. (1999). Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis *Virus Res.* **65**, 161-174.
- Rayet, B., Lopez-Guerrero, J. A., Rommelaere, J., and 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**, 8893-8903.
- Redemann, B. E., Mendelson, E., and Carter, B. J. (1989). Adeno-associated virus rep protein synthesis during productive infection *J. Virol.* **63**, 873-882.
- Rhode, S. L., III (1973). Replication process of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous cell system *J. Virol.* **11**, 856-861.
- Rhode, S. L., III and Paradiso, P. R. (1983). Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation *J. Virol.* **45**, 173-184.
- Rhode, S. L., III and Richard, S. M. (1987). Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter *J. Virol.* **61**, 2807-2815.

Richardson, W. D. and Westphal, H. (1981). A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno-associated virus *Cell* **27**, 133-141.

Robbins, P. D., Tahara, H., and Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy *Trends Biotechnol.* **16**, 35-40.

Roberts, A., Kretzschmar, E., Perkins, A. S., Forman, J., Price, R., Buonocore, L., Kawaoka, Y., and Rose, J. K. (1998). Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge *J. Virol.* **72**, 4704-4711.

Rohr, U. P., Kronenwett, R., Grimm, D., Kleinschmidt, J., and Haas, R. (2002). Primary human cells differ in their susceptibility to rAAV-2-mediated gene transfer and duration of reporter gene expression. *J. Virol. Methods* **105**, 265-275.

Rommelaere, J., and Tattersall, P. (1990). Oncosuppression by parvoviruses. *Handbook of parvoviruses. Vol. II.* P. Tijsen (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton. Fla., pp41.

Rose, J. A., Berns, K. I., Hoggan, M. D., and Koczot, F. J. (1969). Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **64**, 863-869.

Rose, J. A. and Koczot, F. (1972). Adenovirus-associated virus multiplication. VII. Helper requirement for viral deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid synthesis *J. Virol.* **10**, 1-8.

Rose, J. A., Maizel, J. V., Jr., Inman, J. K., and Shatkin, A. J. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated viruses *J. Virol.* **8**, 766-770.

Rose, N. F., Roberts, A., Buonocore, L., and Rose, J. K. (2000). Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 *J. Virol.* **74**, 10903-10910.

Rosl, F., Lengert, M., Albrecht, J., Kleine, K., Zawatzky, R., Schraven, B., and zur, H. H. (1994). Differential regulation of the JE gene encoding the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in cervical carcinoma cells and derived hybrids *J. Virol.* **68**, 2142-2150.

Rubio, M. P., Guerra, S., and 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**, 11573-11582.

Ruffing, M., Heid, H., and Kleinschmidt, J. A. (1994). Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif *J.Gen.Virol.* **75** (**Pt 12**), 3385-3392.

Russell, D. W., Alexander, I. E., and Miller, A. D. (1995). DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 5719-5723.

Russell, S. J. (2002). RNA viruses as virotherapy agents Cancer Gene Ther. 9, 961-966.

Salome, N., van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J., and Cornelis, J. J. (1990a). Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes. *Oncogene* **5**, 123-130.

Salome, N., van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J., and Cornelis, J. J. (1990b). Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes *Oncogene* **5**, 123-130.

Salome, N., van Hille, B., Geuskens, M., and Rommelaere, J. (1989). Partial reversion of conditional transformation correlates with a decrease in the sensitivity of rat cells to killing by the parvovirus minute virus of mice but not in their capacity for virus production: effect of a temperature-sensitive v-src oncogene *J. Virol.* **63**, 4797-4807.

Salvetti, A., Oreve, S., Chadeuf, G., Favre, D., Cherel, Y., Champion-Arnaud, P., David-Ameline, J., and Moullier, P. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production *Hum.Gene Ther.* **9**, 695-706.

Samulski, R. J. and Shenk, T. (1988). Adenovirus E1B 55-Mr polypeptide facilitates timely cytoplasmic accumulation of adeno-associated virus mRNAs *J. Virol.* **62**, 206-210.

Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., and Hunter, L. A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19 *EMBO J.* **10**, 3941-3950.

Sanlioglu, S., Benson, P., and Engelhardt, J. F. (2000). Loss of ATM function enhances recombinant adeno-associated virus transduction and integration through pathways similar to UV irradiation *Virology* **268**, 68-78.

Sanlioglu, S., Duan, D., and Engelhardt, J. F. (1999). Two independent molecular pathways for recombinant adeno-associated virus genome conversion occur after UV-C and E4orf6 augmentation of transduction *Hum.Gene Ther.* **10**, 591-602.

Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C. W., Halbert, D. N., Shenk, T., and Levine, A. J. (1984). Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells *J. Virol.* **49**, 692-700.

Saudan, P., Vlach, J., and Beard, P. (2000). Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb *EMBO J.* **19**, 4351-4361.

Schlehofer, J. R. (1994). The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses *Mutat.Res.* **305**, 303-313.

Schlehofer, J. R., Ehrbar, M., and zur, H. H. (1986). Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus *Virology* **152**, 110-117.

Schlereth, B., Rose, J. K., Buonocore, L., ter, M., V, and Niewiesk, S. (2000). Successful vaccine-induced seroconversion by single-dose immunization in the presence of measles virus-specific maternal antibodies *J. Virol.* **74**, 4652-4657.

Schmidt, M., Afione, S., and Kotin, R. M. (2000). Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53 *J. Virol.* **74**, 9441-9450.

Schmidt, M., Katano, H., Bossis, I., and Chiorini, J. A. (2004). Cloning and characterization of a bovine adeno-associated virus *J. Virol.* **78**, 6509-6516.

Schnell, M. J., Johnson, J. E., Buonocore, L., and Rose, J. K. (1997). Construction of a novel virus that targets HIV-1-infected cells and controls HIV-1 infection *Cell* **90**, 849-857.

Schubert, M., Joshi, B., Blondel, D., and Harmison, G. G. (1992). Insertion of the human immunodeficiency virus CD4 receptor into the envelope of vesicular stomatitis virus particles *J. Virol.* **66**, 1579-1589.

Schwarzbach, M. H., Eisold, S., Burguete, T., Willeke, F., Klein-Bauernschmitt, P., Schlehofer, J. R., Herfarth, C., Ridder, R., and von Knebel, D. M. (2002). Sensitization of sarcoma cells to doxorubicin treatment by concomitant wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV-2) infection. *Int.J. Oncol.* **20**, 1211-1218.

Siegl, G. (1976). The parvoviruses Virol. Monogr 15, 1-109.

Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E., and Tattersall, P. (1985). Characteristics and taxonomy of Parvoviridae *Intervirology* **23**, 61-73.

- Smith, R. H., Spano, A. J., and Kotin, R. M. (1997). The Rep78 gene product of adeno-associated virus (AAV) self-associates to form a hexameric complex in the presence of AAV ori sequences *J. Virol.* **71**, 4461-4471.
- Snyder, R. O., Im, D. S., and Muzyczka, N. (1990). Evidence for covalent attachment of the adenoassociated virus (AAV) rep protein to the ends of the AAV genome *J. Virol.* **64**, 6204-6213.
- Snyder, R. O., Samulski, R. J., and Muzyczka, N. (1990). In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends *Cell* **60**, 105-113.
- Sodeik, B., Ebersold, M. W., and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus *J.Cell Biol.* **136**, 1007-1021.
- Song, S., Laipis, P. J., Berns, K. I., and Flotte, T. R. (2001). Effect of DNA-dependent protein kinase on the molecular fate of the rAAV2 genome in skeletal muscle *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 4084-4088.
- Song, S., Lu, Y., Choi, Y. K., Han, Y., Tang, Q., Zhao, G., Berns, K. I., and Flotte, T. R. (2004). DNA-dependent PK inhibits adeno-associated virus DNA integration *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 2112-2116.
- Spegelaere, P., van Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J. J., and Rommelaere, J. (1991). Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-ras oncogene. *J. Virol.* **65**, 4919-4928.
- Srivastava, A. (2002). Obstacles to human hematopoietic stem cell transduction by recombinant adeno-associated virus 2 vectors *J. Cell Biochem. Suppl* **38**, 39-45.
- Srivastava, A., Lusby, E. W., and Berns, K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome *J. Virol.* **45**, 555-564.
- Steegenga, W. T., Riteco, N., Jochemsen, A. G., Fallaux, F. J., and Bos, J. L. (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells *Oncogene* **16**, 349-357.
- Stracker, T. H., Cassell, G. D., Ward, P., Loo, Y. M., van Breukelen, B., Carrington-Lawrence, S. D., Hamatake, R. K., van der Vliet, P. C., Weller, S. K., Melendy, T., and Weitzman, M. D. (2004). The Rep protein of adeno-associated virus type 2 interacts with single-stranded DNA-binding proteins that enhance viral replication *J. Virol.* **78**, 441-453.
- Straus, S. E., Ginsberg, H. S., and Rose, J. A. (1975). DNA-minus temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5 help adenovirus-associated virus replication *J. Virol.* **17**, 140-148.
- Straus, S. E., Sebring, E. D., and Rose, J. A. (1976). Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**, 742-746.
- Strong, J. E., Coffey, M. C., Tang, D., Sabinin, P., and Lee, P. W. (1998). The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus *EMBO J.* **17**, 3351-3362.
- Summerford, C., Bartlett, J. S., and Samulski, R. J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection *Nat.Med.* **5**, 78-82.
- Summerford, C. and Samulski, R. J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions *J. Virol.* **72**, 1438-1445.
- Takaoka, M., Harada, H., Deramaudt, T. B., Oyama, K., Andl, C. D., Johnstone, C. N., Rhoades, B., Enders, G. H., Opitz, O. G., and Nakagawa, H. (2004). Ha-Ras(G12V) induces senescence in primary and immortalized human esophageal keratinocytes with p53 dysfunction *Oncogene* **23**, 6760-6768.
- Tenenbaum, L., Chtarto, A., Lehtonen, E., Velu, T., Brotchi, J., and Levivier, M. (2004). Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system *J.Gene Med.* **6 Suppl 1**, S212-S222.

Tenenbaum, L., Jurysta, F., Stathopoulos, A., Puschban, Z., Melas, C., Hermens, W. T., Verhaagen, J., Pichon, B., Velu, T., and Levivier, M. (2000). Tropism of AAV-2 vectors for neurons of the globus pallidus *Neuroreport* **11**, 2277-2283.

Thimmappaya, B., Weinberger, C., Schneider, R. J., and Shenk, T. (1982). Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection *Cell* **31**, 543-551.

Thomson, B. J., Weindler, F. W., Gray, D., Schwaab, V., and Heilbronn, R. (1994). Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression *Virology* **204**, 304-311.

Toda, M., Iizuka, Y., Kawase, T., Uyemura, K., and Kawakami, Y. (2002). Immuno-viral therapy of brain tumors by combination of viral therapy with cancer vaccination using a replication-conditional HSV *Cancer Gene Ther.* **9**, 356-364.

Toda, M., Rabkin, S. D., Kojima, H., and Martuza, R. L. (1999). Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity *Hum.Gene Ther.* **10**, 385-393.

Toda, M., Rabkin, S. D., and Martuza, R. L. (1998). Treatment of human breast cancer in a brain metastatic model by G207, a replication-competent multimutated herpes simplex virus 1 *Hum.Gene Ther.* **9**, 2177-2185.

Toolan, H. W. (1967). Lack of oncogenic effect of the H-viruses for hamsters Nature 214, 1036.

Toolan, H. W. and Ledinko, N. (1968). Inhibition by H-1 virus of the incidence of tumors produced by adenovirus 12 in hamsters *Virology* **35**, 475-478.

Toolan, H. W., Rhode, S. L., III, and Gierthy, J. F. (1982). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors in Syrian hamsters by prior infection with H-1 parvovirus *Cancer Res.* **42**, 2552-2555.

Tratschin, J. D., Tal, J., and Carter, B. J. (1986). Negative and positive regulation in trans of gene expression from adeno-associated virus vectors in mammalian cells by a viral rep gene product *Mol.Cell Biol.* **6**, 2884-2894.

Trempe, J. P. and Carter, B. J. (1988a). Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adenoassociated virus VP1 capsid protein *J. Virol.* **62**, 3356-3363.

Trempe, J. P. and Carter, B. J. (1988b). Regulation of adeno-associated virus gene expression in 293 cells: control of mRNA abundance and translation *J. Virol.* **62**, 68-74.

Trempe, J. P., Mendelson, E., and Carter, B. J. (1987). Characterization of adeno-associated virus rep proteins in human cells by antibodies raised against rep expressed in Escherichia coli *Virology* **161**, 18-28.

Tullis, G. E., Burger, L. R., and 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**, 131-141.

van Hille, B., Duponchel, N., Salome, N., Spruyt, N., Cotmore, S. F., Tattersall, P., Cornelis, J. J., and Rommelaere, J. (1989). Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-ras-transformed rat cells to minute virus of mice *Virology* **171**, 89-97.

Vanacker, J. M., and Rommelaere, J. (1995). Non-structural proteins of autonomous parvoviruses: from cellular effects to molecular mechanisms. *Seminars in Virology*. **6**:291-297.

Vanacker, J. M., Corbau, R., Adelmant, G., Perros, M., Laudet, V., and 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**, 2369-2377.

- Verma, I. M. and Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects *Nature* **389**, 239-242.
- Vincent, K. A., Piraino, S. T., and Wadsworth, S. C. (1997). Analysis of recombinant adeno-associated virus packaging and requirements for rep and cap gene products *J. Virol.* **71**, 1897-1905.
- Walsh, C. E., Liu, J. M., Xiao, X., Young, N. S., Nienhuis, A. W., and Samulski, R. J. (1992). Regulated high level expression of a human gamma-globin gene introduced into erythroid cells by an adeno-associated virus vector *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 7257-7261.
- Walters, R. W., Yi, S. M., Keshavjee, S., Brown, K. E., Welsh, M. J., Chiorini, J. A., and Zabner, J. (2001). Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer *J.Biol.Chem.* **276**, 20610-20616.
- Wang, X. S., Ponnazhagan, S., and Srivastava, A. (1995). Rescue and replication signals of the adeno-associated virus 2 genome *J.Mol.Biol.* **250**, 573-580.
- Wang, X. S., Qing, K., Ponnazhagan, S., and Srivastava, A. (1997). Adeno-associated virus type 2 DNA replication in vivo: mutation analyses of the D sequence in viral inverted terminal repeats *J. Virol.* **71**, 3077-3082.
- Wasylyk, B., Hahn, S. L., and Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors *Eur.J.Biochem.* **211**, 7-18.
- Wasylyk, C., Flores, P., Gutman, A., and Wasylyk, B. (1989). PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes *EMBO J.* **8**, 3371-3378.
- Weger, S., Wendland, M., Kleinschmidt, J. A., and Heilbronn, R. (1999). The adeno-associated virus type 2 regulatory proteins rep78 and rep68 interact with the transcriptional coactivator PC4 *J. Virol.* **73**, 260-269.
- Weger, S., Wistuba, A., Grimm, D., and Kleinschmidt, J. A. (1997). Control of adeno-associated virus type 2 cap gene expression: relative influence of helper virus, terminal repeats, and Rep proteins. *J. Virol.* **71**, 8437-8447.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control Cell 81, 323-330.
- Weitzman, M. D., Fisher, K. J., and Wilson, J. M. (1996). Recruitment of wild-type and recombinant adeno-associated virus into adenovirus replication centers *J. Virol.* **70**, 1845-1854.
- Weitzman, M. D., Kyostio, S. R., Carter, B. J., and Owens, R. A. (1996). Interaction of wild-type and mutant adeno-associated virus (AAV) Rep proteins on AAV hairpin DNA *J. Virol.* **70**, 2440-2448.
- Weitzman, M. D., Kyostio, S. R., Kotin, R. M., and Owens, R. A. (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 5808-5812.
- West, M. H., Trempe, J. P., Tratschin, J. D., and Carter, B. J. (1987). Gene expression in adeno-associated virus vectors: the effects of chimeric mRNA structure, helper virus, and adenovirus VA1 RNA *Virology* **160**, 38-47.
- White, S. J., Nicklin, S. A., Buning, H., Brosnan, M. J., Leike, K., Papadakis, E. D., Hallek, M., and Baker, A. H. (2004). Targeted gene delivery to vascular tissue in vivo by tropism-modified adenoassociated virus vectors *Circulation* **109**, 513-519.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresh, D. A., and Nemerow, G. R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment *Cell* **73**, 309-319.
- Wilson, G. M., Jindal, H. K., Yeung, D. E., Chen, W., and 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**, 90-98.

- Winocour, E., Callaham, M. F., and Huberman, E. (1988). Perturbation of the cell cycle by adenoassociated virus *Virology* **167**, 393-399.
- Wistuba, A., Weger, S., Kern, A., and Kleinschmidt, J. A. (1995). Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins *J. Virol.* **69**, 5311-5319.
- Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D., and Kleinschmidt, J. A. (1997). Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J. Virol.* **71**, 1341-1352.
- Wonderling, R. S., Kyostio, S. R., and Owens, R. A. (1995). A maltose-binding protein/adeno-associated virus Rep68 fusion protein has DNA-RNA helicase and ATPase activities *J. Virol.* **69**, 3542-3548.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R. J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector *J. Virol.* **70**, 8098-8108.
- Xu, Z., Yue, Y., Lai, Y., Ye, C., Qiu, J., Pintel, D. J., and Duan, D. (2004). Trans-splicing adeno-associated viral vector-mediated gene therapy is limited by the accumulation of spliced mRNA but not by dual vector coinfection efficiency *Hum.Gene Ther.* **15**, 896-905.
- Yakobson, B., Hrynko, T. A., Peak, M. J., and Winocour, E. (1989). Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm *J. Virol.* **63**, 1023-1030.
- Yakobson, B., Koch, T., and Winocour, E. (1987). Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus *J. Virol.* **61**, 972-981.
- Yalkinoglu, A. O., Heilbronn, R., Burkle, A., Schlehofer, J. R., and zur, H. H. (1988). DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress *Cancer Res.* **48**, 3123-3129.
- Yan, Z., Zhang, Y., Duan, D., and Engelhardt, J. F. (2000). Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 6716-6721.
- Yang, C. C., Xiao, X., Zhu, X., Ansardi, D. C., Epstein, N. D., Frey, M. R., Matera, A. G., and Samulski, R. J. (1997). Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro *J. Virol.* **71**, 9231-9247.
- Yee, J. K., Moores, J. C., Jolly, D. J., Wolff, J. A., Respess, J. G., and Friedmann, T. (1987). Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 5197-5201.
- Young, S. M., Jr., McCarty, D. M., Degtyareva, N., and Samulski, R. J. (2000). Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination *J. Virol.* **74**, 3953-3966.
- Yu, S. F., von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., and Gilboa, E. (1986). Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 3194-3198.
- Zeicher, M., Spegelaere, P., Horth, M., Gancberg, D., Karim, A., and Dupont, F. (2003). Oncoselective parvoviral vector-mediated gene therapy of cancer *Oncol.Res.* **13**, 437-444.
- Zhong, L., Chen, L., Li, Y., Qing, K., Weigel-Kelley, K. A., Chan, R. J., Yoder, M. C., and Srivastava, A. (2004). Self-complementary adeno-associated virus 2 (AAV)-T cell protein tyrosine phosphatase vectors as helper viruses to improve transduction efficiency of conventional single-stranded AAV vectors in vitro and in vivo *Mol.Ther.* **10**, 950-957.
- Zolotukhin, S., Potter, M., Hauswirth, W. W., Guy, J., and Muzyczka, N. (1996). A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells *J. Virol.* **70**, 4646-4654.

6. Literaturverzeichnis

Zolotukhin, S., Byrne, B. J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R. J., and Muzyczka, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield *Gene Ther.* **6**, 973-985.

Zwelling, L. A. (1986). Cisplatin and new platinum analogs. *Cancer Chemotherapy/8. The EORTC Cancer Chemotherapy Annual*, pp.97. edited by H. M. Pinedo and B. A. Chabner. Elsevier Science Publishers B. V.

7. Anhang

7.1 Deletion eines Nukleotids zur Vermittlung von Replikationskompetenz

Herkömmliche AAV Vektoren sind durch die Deletion des gesamten kodierenden replikationsdefizient. Die Vektoren, die sich vom replizierenden H-1 Virus ableiten, enthalten den offenen Leserahmen, der die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 kodiert. Die Expression des multifunktionellen NS1 Proteins vermittelt diesen Vektoren, die flankierend die TRs von H-1 Virus besitzen, die Fähigkeit zur Replikation der Vektor DNA. Der parvovirale Hybridvektor enthält flankierend die ITRs von AAV-2, die in cis zur Verpackung und Replikation dieser Vektoren mit Hilfe der Rep Proteine notwendig sind. Er enthält aber auch den Replikationsursprung des parentalen H-1 Virus, allerdings in einer inaktiven Form (Astell et al., 1996). Das hat zur Konsequenz, daß der Vektor TRH1 nicht zur Replikation fähig ist, obwohl das homologe Nichtstrukturprotein NS1 exprimiert wird. Ein aktiver Replikationsursprung benötigt zwei ACGT Bindungsstellen für die Bindung des Parvovirus Initiations Faktors PIF (Christensen et al., 1997) und die Bindungsstelle für NS1 Protein und die Möglichkeit dieser Proteine zur Interaktion (vergleiche 1.5.2 Replikation bei autonomen Parvoviren Abb.7). Zwischen den Bindungsstellen für diese Proteine enthält das linke Palindrom in H-1 Virus oder MVMp eine Struktur, die als "Bubble" Sequenz bezeichnet wird. Alternativ enthält diese Struktur in der replizierten Form zwei beziehungsweise drei Basenpaare und bewirkt im Falle des Dinukleotids eine funktionellen Aktivierung der NS1 endonukleolytischen Aktivität durch Interaktion zwischen PIF und NS1 Protein. Nur der Teil des Palindroms, der zwei Basenpaare enthält, dient als aktiver Replikationsursprung.

Der linke Terminus des Hybridvektors enthält aufgrund der Klonierung nur den Anteil der "Bubble" Sequenz mit den drei Nukleotiden (s. Abb. A1).

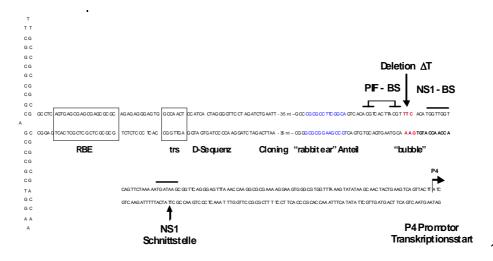


Abb. A 1: Der linke Terminus des Hybridvektors TRH1 in der doppelsträngigen Form

Das linke Palindrom des Hybridvektors enthält das Rep Bindungs Element (RBE) und die terminale Auflösungsstelle (trs), die für die Replikation und Verpackung des Genoms durch Rep Proteine notwendig sind. Durch die Klonierung bedingt ist der Anteil des linken H-1 Virus Palindroms in diesem Vektor enthalten, der in der "Bubble" Sequenz 3 Nukleotide enthielt, die das PIF Protein (PIF-BS) von dem NS1 Protein (NS1-BS) trennt. Daher wurde versucht, diesem Vektor die Fähigkeit zur Replikation durch NS1 Protein zu vermitteln durch die Deletion des Thymidins (Deletion ΔT).

Beruhend auf der Annahme, daß replikationskompetente Vektoren stärker exprimieren bedingt durch eine größere Menge an Vektor DNA in infizierten Zellen, stellte sich die Frage, ob es möglich ist, dem Hybridvektor die Fähigkeit zur Replikation durch NS1 Protein zu vermitteln, indem man ein Nukleotid aus dieser Triplett-Sequenz deletiert. Dafür wurde das Thymidin durch Mutagenese entfernt (ΔT) und die Deletion durch Sequenzierung bestätigt (Daten nicht gezeigt).

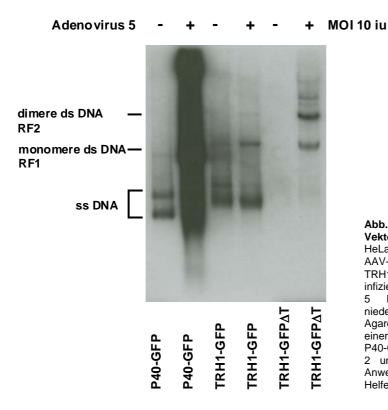


Abb. A2: Replikation der verschiedenen Vektoren

HeLa Zellen wurden mit den verschiedenen AAV-2 Vektoren P40-GFP, TRH1-GFP und TRH1-GFPΔT mit einer MOI von 200 ru infiziert und gegebenenfalls mit Adenovirus 5 koinfiziert (Adenovirus +/-). Die niedermolekulare DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, transferiert und mit einer ³²P-gfp Sonde detektiert. Der Vektor P40-GFP enthält den linken ORF von AAV-2 und ist durch die Rep Proteine in Anwesenheit von Adenovirus 5 Helferfunktionen replikationskompetent.

In Abbildung A2 wird die Fähigkeit des Vektors TRH1-GFP∆T zur Replikation mit den Vektoren P40-GFP und TRH1-GFP in HeLa Zellen verglichen (jeweils MOI 200 ru). Der Vektor P40-GFP ist erwartungsgemäß in Anwesenheit von Adenovirus (MOI 10 iu) zu einer Rep Protein vermittelten Replikation fähig, während der Vektor TRH1-GFP in Anwesenheit von Adenovirus eine stärkere Zweitstrangsynthese zeigt (monomere ds DNA). In einer Koinfektion von TRH1-GFP∆T (MOI 200 ru) mit Adenovirus 5 (MOI 10 iu) wurden sowohl monomere ds DNA, dimere ds DNA und

Konkatemere höherer Formen gebildet. In Abwesenheit von Adenovirus 5 sind keine replikativen Formen zu erkennen, so wie auch nur eine geringe Menge an Einzelstrang DNA (ss DNA).

Die Doppelbande der als ss DNA gekennzeichneten Banden beruht auf Sekundärstrukturen, wie einer Zirkularisierung des Genoms durch die ITRs. Die Größenunterschiede der ss DNA zwischen den Vektoren entsprechen dabei den Größenunterschieden der Vektorgenome. Das Genom des Vektors P40-GFP hat eine Größe von 3168 Nukleotiden, das von TRH1-GFP und TRH1-GFPΔT hat eine Größe von 4149 beziehungsweise 4148 Nukleotiden.

Grundsätzlich besitzt der Vektor TRH1-GFP∆T die Fähigkeit zur Replikation durch NS1 Protein, jedoch wird in HeLa Zellen eine hohe MOI des Vektors und eine Adenovirus 5 Koinfektion dafür benötigt. Eine verstärkte Expression wurde nicht beobachtet, so daß dieser Vektor nicht weiterverwendet wurde.