

---

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

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

**vorgelegt von  
Diplom-Biologin Kristiane H. I. Wetzel  
aus: Aachen  
Tag der mündlichen Prüfung:**

---

**Untersuchung MCP-3-rekombinanter Parvoviren  
zur Gentherapie von Krebs: Vorklinische Studien in  
zwei Tiermodellen**

**Gutachter: Prof. Dr. Ekkehard Bautz  
Prof. Dr. Lutz Gissmann**

---

## DANKSAGUNG

Diese Dissertation wurde in der Abteilung Tumorstudiologie von Prof. Dr. Jean Rommelaere am Institut für Angewandte Tumorstudiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg mit der Unterstützung der französischen Forschungsgemeinschaft INSERM, Unité 375, angefertigt.

Für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung dieser Arbeit danke ich Prof. Dr. Jean Rommelaere.

Prof. Dr. Ekkehard Bautz und Prof. Dr. Lutz Gissmann möchte ich für die Begutachtung der Arbeit danken.

Dr. Christiane Dinsart und Dr. Jan Cornelis möchte ich für die Themenstellung und Betreuung danken.

Bei Annabel Grewenig und Ginette Balboni möchte ich mich für die freundliche Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Alexandra Dege möchte für die Hilfe bei den *Western-Blots* danken.

Bei Dr. Ursula Bodendorf und Dr. Celina Cziepluch möchte ich mich für die angeregten Unterhaltungen, die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen guten Tips bedanken.

Für das Korrekturlesen der Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir geholfen haben.

Den anderen (ehemaligen) Mitgliedern des Instituts danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und den Spaß, den wir auch außerhalb des Labor hatten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Nathalia Giese für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreudigkeit. Außerdem möchte ich mich für die Unterstützung bei allen anfallenden Problemen sowie für die freundschaftliche Atmosphäre bedanken.

Patricia Menten und Prof. Van Damme sowie Dr. Silvano Sozzani danke ich für die MCP-3-ELISA, die Chemotaxistests mit MCP-3 und die nette Beantwortung aller Fragen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	1
<b>1.1 Vektoren zur Gentherapie von Krebs</b>	1
<b>1.2 Die autonomen Parvoviren</b>	3
1.2.1 Die onkosuppressiven Eigenschaften der autonomen Parvoviren	3
1.2.2 Taxonomie der Parvoviren	4
1.2.3 Der parvovirale Lebenszyklus	6
1.2.4 Die geringe Pathogenität der Parvoviren H-1 und MVMp	10
1.2.5 Der Aufbau rekombinanter parvoviraler Vektoren	10
<b>1.3 Mögliche Transgene zur Gentherapie von Krebs mit parvoviralen Vektoren</b>	13
1.3.1 Die Funktion der Chemokine	14
1.3.2 Das Chemokin MCP-3	15
<b>1.4 Die Tumormodelle</b>	17
1.4.1 Murine B78/H1-Melanomzellen	17
1.4.2 Humane Zervixkarzinomzellen	18
<b>1.5 Zielsetzung dieser Arbeit</b>	19
<b>2 Material und Methoden</b>	21
<b>2.1 Chemikalien</b>	21
<b>2.2 Mikrobiologische Methoden</b>	21
2.2.1 Bakterienstämme	21
2.2.2 Kultivierung und Kryokonservierung von E. coli	21
2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen	22
2.2.4 Transformation von E. coli-Zellen	22
<b>2.3 Präparation, Analyse und Modifikation von DNA</b>	22
2.3.1 Plasmide	23
2.3.2 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA	23
2.3.3 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA	23
2.3.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	23
2.3.5 Ethanolfällung von Nukleinsäuren	24
2.3.6 Restriktionsverdau	24

2.3.7 Auffüllen überhängender Enden	24
2.3.8 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	24
2.3.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	25
2.3.10 Ligation	25
2.3.11 Sequenzierung mit radioaktiver Markierung	25
2.3.12 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	26
2.3.13 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	27
<b>2.4 Zellbiologische Methoden</b>	<b>30</b>
2.4.1 Kultivierung von Säugetierzellen	30
2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Säugetierzellen	31
2.4.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen	31
2.4.4 Färbung adhärenter Zellen mit Kristall-Violett	31
2.4.5 Transfektion von Plasmid-DNA	31
<b>2.5 Virologische Methoden</b>	<b>32</b>
2.5.1 Produktion rekombinanter Viren	32
2.5.2 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	32
2.5.3 Dichtebestimmung durch Refraktionsmessung	33
2.5.4 Hämagglutinationstest	33
2.5.5 Virusaufreinigung über Sephadexsäulen	34
2.5.6 Dichtezentrifugation über Iodixanolgradient	34
2.5.7 Virus-Konzentrierung	35
2.5.8 Uranylazetat-Kontrastfärbung	35
2.5.9 Infektion	35
2.5.10 Filterhybridisierungstest zur Titration rekombinanter Viren	36
2.5.11 Plaque-Assay	37
2.5.12 Analyse der Infektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop	38
2.5.13 Bestimmung der MCP-3-Produktion in vitro	38
<b>2.6 Durchflußzytometrie (FACS)</b>	<b>39</b>
2.6.1 Bestimmung der Infektionseffizienz mit Hilfe der Durchflußzytometrie	39
2.6.2 Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen mittels FACS-Analyse	39
<b>2.7 Protein-Präparation und Analyse</b>	<b>40</b>
2.7.1 Proteinextrakte aus Säugetierzellen	40
2.7.2 Proteinbestimmung	40

2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.7.4 <i>Western-Blot</i> -Analyse	41
<b>2.8 Tierexperimentelle Methoden</b>	<b>43</b>
2.8.1 Versuchstiere	43
2.8.2 Induktion von Tumoren mit <i>in vitro</i> infizierten Zellen	43
2.8.3 Bestimmung des Tumorummens	44
2.8.4 Infektion etablierter Tumore	44
2.8.5 Gewinnung von Blutserum	44
2.8.6 Tumor- und Organ-Entnahme	44
2.8.7 MCP-3-Proteinbestimmung aus Tumorgewebe	45
2.8.8 Bestimmung Makrophagen-vermittelter Zytotoxizität <i>in vitro</i>	45
2.8.9 Induktion und Bestimmung der Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten	46
<b>2.9 Immunhistochemische Analyse von Tumoren</b>	<b>48</b>
2.9.1 Herstellung der Tumorgewebeschnitte	48
2.9.2 Färbeverfahren	49
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Herstellung rekombinanter Parvoviren</b>	<b>50</b>
3.1.1 Klonierung der cDNA des humanen MCP-3 in parvovirale Vektoren	50
3.1.2 Produktion und Aufreinigung rekombinanter H-1-Viren	52
3.1.3 Produktion und Aufreinigung MVMp-verwandter Viren	53
3.1.4 Höhere Ausbeuten rekombinanter MVMp-Viren durch die Verwendung eines Iodixanolgradienten	54
<b>3.2 Rekombinante Parvoviren <i>in vitro</i></b>	<b>57</b>
3.2.1 Anzahl transduzierter Tumorzellen	57
3.2.2 Wachstum infizierter Zellkulturen <i>in vitro</i>	59
3.2.3 MCP-3-Abgabe <i>in vitro</i> nach Infektion mit MCP-3-rekombinanten Parvoviren	61
3.2.4 Parvoviral transduziertes MCP-3 ist biologisch aktiv	63
3.2.5 NS1-Expression <i>in vitro</i> nach Infektion mit rekombinanten Parvoviren	66
<b>3.3 Die antineoplastische Wirkung von MVMp/MCP-3 in immunkompetenten Mäusen im syngenem Tumormodell</b>	<b>68</b>
3.3.1 MHC-Klasse-I-Expression der Melanomzellen wird durch eine parvovirale Infektion nicht induziert	68

3.3.2 MVMp/MCP-3-Infektion von B78/H1-Zellen reduziert die Tumorentstehung um 75%	68
3.3.3 MVMp/MCP-3-Infektion bei MOI von 10 RU/Zelle verhindert die Bildung von B78/H1-Tumoren vollständig	70
3.3.4 Untersuchung der CTL-Aktivität in tumorfreien Mäusen	71
3.3.5 Wachstum präinfizierter B78/H1-Zellen in Nacktmäusen	72
3.3.6 MVMp/MCP-3 inhibiert das Tumorstadium etablierter B78/H1-Tumoren	74
3.3.7 Nachweis von T-Zellen und NK-Zellen in MVMp/MCP-3-infizierten Tumoren	76
<b>3.4 Die antineoplastische Wirkung von pH1/MCP-3 in Nacktmäusen</b>	<b>79</b>
3.4.1 MCP-3-Expression <i>in vivo</i>	79
3.4.2 Retardiertes Tumorstadium von hH1/MCP-3-infizierten HeLa-Zellen in Nacktmäusen	80
3.4.3 Infiltration von Makrophagen und DC in Tumoren hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Zellen	82
3.4.4 RT-PCR-Analyse zum Nachweis der Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen	85
<b>4 Diskussion</b>	<b>88</b>
<b>4.1 Überblick</b>	<b>88</b>
<b>4.2 Die Verwendung eines Iodixanolgradienten zur Aufreinigung verbessert die Ausbeute rekombinanter MVMp-Viren</b>	<b>89</b>
<b>4.3 Rekombinante Parvoviren vermitteln eine hohe Transgenproduktion der infizierten Zellen</b>	<b>90</b>
<b>4.4 Parvovirale Vektoren im Tierversuch</b>	<b>91</b>
4.4.1 Der Einfluß der Parentalviren und ihrer Derivate auf das Wachstum von Tumorzellen	91
4.4.2 MCP-3-rekombinante Vektoren besitzen ein stärkeres antineoplastisches Potential als die Parentalviren	92
4.4.3 Die Beteiligung verschiedener Leukozytenpopulationen an der antitumoralen Wirkung MCP-3-rekombinanter Parvoviren	93
4.4.4 Mechanismus der MVMp/MCP-3-vermittelten Tumorzellyse durch die verschiedenen Effektorzellen	96

4.4.5 H-1-Viren im HeLa/Nacktmaus-Modell	100
<b>4.5 Beurteilung MCP-3-rekombinanter Parvoviren zur Genterapie von Krebs</b>	101
<b>4.6 Ausblick</b>	103
<b>5 Zusammenfassung</b>	104
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	106

---

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
µg	Mikrogramm	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AAV	Adeno-assoziiertes Virus	ELISA	Enzymgekoppelter Immunsorbent Test
Abb.	Abbildung	FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
ADH	Alkoholdehydrogenase	FCS	fötales Kälberserum
Ag	Antigen	g	als Massenangabe: Gramm als Zentrifugalkraft: Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
Ak	Antikörper	h	Stunde
ANOVA	<i>analysis of variances</i>	IFN	Interferon
APC	<i>antigen presenting cell</i>	IL	Interleukin
APS	Amoniumpersulfat	iNOS	induzierbare NO-Synthetase
AS	Aminosäure	IP	<i>inducible protein</i>
bp	Basenpaare	ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
BSA	Rinderserumalbumin	kb	Kilobasen
bzw.	beziehungsweise	kDa	Kilodalton
ca.	circa	l	Liter
CD	<i>cluster of differentiation</i>	LB	<i>Liquid Broth-Medium</i>
Ci	Curie	LDH	Lactatdehydrogenase
CI	Chemotaxis Index	Lsg.	Lösung
cpm	Zerfälle pro Minute <i>counts per minute</i>	M	molar
Cr	Chrom	m.u.	Karteneinheiten ( <i>map units</i> )
CsCl	Cäsiumchlorid	mA	Milliampere
CTL	zytotoxische T-Zellen <i>cytotoxic T-lymphocyte</i>	MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
CTLA-4	zytotoxisches T-Zellenantigen-4	MEM	<i>Eagle's minimum essential medium</i>
Da	Dalton	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex <i>major histocompatibility complex</i>
DC	dendritische Zellen	min	Minute
DKS	fötales Kälberserum <i>donor calf serum</i>	ml	Milliliter
DMEM	Dubelcco-modifiziertes Eagle Medium	mm	Millimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid	mM	milli molar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MOI	Infektionsmultiplizität <i>multiplicity of infection</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate	mRF	momomere replikative Form
dRF	dimere replikative Form		
DTT	Dithiothreitol		

---

mRNA	<i>messenger-RNA</i>	V	Volt
MVMp	<i>minute virus of mice</i> , Prototyp	v. a.	vor allem
ng	nano Gramm	VP1/2	virales Strukturprotein 1/2
NK	Natürliche Killer (-Zellen)	VTE	Virus-TE
nM	nano molar	w/v	Gewicht/Volumen
NS1/2	Nichtstrukturprotein 1/2	wt	wildtyp
OD	optische Dichte		
ORI	Replikationsursprung		
p.i.	<i>post infection</i>		
PAA	Palyacrylamid		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PEG	Polyethylenglykol		
PEM	peritoneale Exsudat-Macrophages		
pfu	Plaque bildende Einheiten <i>plaque forming units</i>		
RCV	<i>replication competent virus</i>		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Umdrehungen pro Minute		
RT	Raumtemperatur		
RT-PCR	<i>reversed transcriptase polymerase chain reaction</i>		
RU	Replikationseinheit <i>replication unit</i> ,		
RP-HPLC	<i>reversed phase high pressure liquid chromatography</i>		
s	Sekunde		
SEM	<i>standard error of the mean</i>		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
sRF	einzelsträngige replikative Form		
Tab.	Tabelle		
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylen- diamin		
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan		
TNF	Tumor Nekrose Faktor		
Trp	Tryptophan		
U	<i>units</i>		
UV	ultraviolettes Licht		

# 1 Einleitung

## 1.1 Vektoren zur Gentherapie von Krebs

Der Begriff Gentherapie bezeichnet den „Transfer neuen genetischen Materials in Zellen eines Individuums mit daraus folgendem Nutzen für dieses Individuum“ (Morgen & Anderson, 1993). Eine Vielzahl klinischer Gentherapieversuche zielten auf die Behandlung von Krebserkrankungen ab (Anderson, 1998; Bodey *et al.*, 2000), da die klassischen Methoden zur Behandlung von Krebs wie Bestrahlung oder Chemotherapie zu starken Nebenwirkungen führen und nur begrenzt helfen. Ein kritischer Punkt liegt in der Wahl des Vektors zum Gentransfer. Der „ideale“ Vektor muß hohen Anforderungen an die Sicherheit für den Patienten entsprechen, darf also nicht toxisch und nicht immunogen sein. Der Gentransfer sollte sehr effizient und dabei selektiv in die gewünschten Zellen erfolgen und eine ausreichende Expression des therapeutischen Transgens ermöglichen. Außerdem sollte das Verfahren in der Klinik einfach anzuwenden sein (Anderson, 1998; Kirn & McCormick, 1996).

Grundsätzlich lassen sich die verwendeten Vektoren in virale und nicht-virale Systeme einteilen. Zu den nicht-viralen Methoden zählen die Injektion „nackter“ DNA, die DNA-Transfektion und die Verwendung von Liposomen (Schmidt-Wolf & Schmidt-Wolf, 1994; Smith, 1995). Wesentlich effizienter verläuft der Transfer in der Regel aber mit viralen Vektoren, da viele Viren während ihrer Evolution sehr effiziente Strategien entwickelt haben, ihr Genom in Zellen einzuschleusen. Durch den Austausch viraler Gene gegen eine therapeutisch wirksames Transgen werden „natürliche“ Vektoren geschaffen. Eine große Anzahl klinischer Studien wurde mit retroviralen und adenoviralen Vektoren durchgeführt. Daneben werden auch andere Viren als Vektoren erprobt, wie Herpes simplex-Viren (HSV) oder Adeno-assoziierte Viren (AAV) (Anderson, 1998). Die vorhandenen viralen Vektoren werden jedoch nicht allen Anforderungen an einen idealen Vektor zur Krebstherapie gerecht.

Adenoviren besitzen ein gut charakterisiertes Genom (Kremer & Perricaudet, 1995). Sie infizieren sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen, was sie als Vektoren für die Therapie von Gendefekten attraktiv, für die selektive Transduktion von schnell

proliferierenden Krebszellen jedoch weniger geeignet macht. Die zunächst beschriebene geringe Pathogenität muß mittlerweile in Frage gestellt werden (Marshall, 1999).

Lentiviren, eine Gruppe von Retroviren, zu denen HIV-1 zählt, infizieren ebenfalls ruhende und proliferierende Zellen, weshalb sie zur Krebstherapie nur begrenzt geeignet sind. Die Verwendung lentiviraler Vektoren beinhaltet zudem das Sicherheitsrisiko einer möglichen Rekombination, die zu einer Produktion von pathogenen Parentalviren führen kann (Haubrich *et al.*, 1995). Andere Retroviren (z. B. *murine leukemia virus*, MuLV) infizieren allein proliferierende Zellen, was Krebszellen genauso einschließt wie andere Zellen. Weitere Viren wie HSV-1 werden ebenfalls als Vektoren zur Gentherapie diskutiert. Ihr Tropismus für spezifische Gewebe löst das Problem des tumorgerichteten Transfers nur bedingt (Jia *et al.*, 1994).

AAV zeigen onkosuppressive Eigenschaften und würden sich deshalb zur Krebstherapie anbieten (Kirschstein *et al.*, 1968). Sie transduzieren aber sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen, womit eine zielgerichtete Tumortransduktion nicht gegeben ist. AAV gelten als apathogen. Allerdings werden sie mit Spontanaborten in den ersten Schwangerschaftswochen in Verbindung gebracht (Tobiasch *et al.*, 1994). Neueste Untersuchungen zeigen auch, daß in Abhängigkeit von der Applikation der AAV-Vektoren unerwünschte Immunreaktionen auftreten können (Zhang *et al.*, 2000).

Die konstitutive Expression einiger therapeutischer Transgene wurde als nachteilig beschrieben (Dranoff *et al.*, 1993). Für eine transiente Transgenexpression kann die Integration verschiedener viraler Vektoren wie die der Lentiviren und anderer Retroviren oder AAV-Vektoren, die zu einer permanenten Transgenexpression führt, von Nachteil sein.

Die Unzulänglichkeiten der bisher bekannten viralen Vektoren in Bezug auf die Sicherheit und die Selektivität des Gentransfers macht Alternativen wünschenswert (Vile *et al.*, 2000). Die onkosuppressiven Eigenschaften einiger autonomer Parvoviren in Abwesenheit erkennbarer unerwünschter Nebenwirkungen machen sie zu interessanten Vektoren zur Gentherapie von Krebs (Dinsart *et al.*, 1996; Kim & McCormick, 1996).

## 1.2 Die autonomen Parvoviren

Parvoviren (lat. *parvus* = klein) gehören mit einem Durchmesser von 18-26 nm zu den kleinsten bekannten Viren. Ihre hüllenlosen, ikosaedrischen Kapside umschließen ein einzelsträngiges, lineares DNA-Genom mit einer Länge von etwa 5000 Nukleotiden. Sie infizieren eine Vielzahl von Spezies, darunter auch den Menschen.

### 1.2.1 Die onkosuppressiven Eigenschaften der autonomen Parvoviren

Die ersten Isolate autonomer Parvoviren stammten aus Tumoren, Präparationen onkogener Viren, Tumorzelllinien oder karzinogen-behandelten Versuchstieren (Kilham & Olivier, 1959; Lum & Schreier, 1963; Toolan *et al.*, 1962). Da Versuche, sie aus normalen Geweben zu isolieren, fehlschlagen (Kilham & Olivier, 1959; Toolan *et al.*, 1962), lag zu Beginn die Vermutung nahe, daß diese Viren für die Tumorentstehung verantwortlich waren. Später zeigte sich jedoch, daß einige Parvoviren im Gegenteil die Entwicklung spontaner, induzierter oder implantierter Tumoren in Versuchstieren hemmen (Toolan *et al.*, 1982; Dupressoir *et al.*, 1989; Guetta *et al.*, 1986; Rommelaere & Cornelis, 1991). Dieser Effekt wird als **Onkosuppression** bezeichnet und bestätigte sich bei einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorarten, wie Leukämien, Sarkomen und Karzinomen (Bergs, 1969; Guetta *et al.*, 1986; Yang, 1987).

Der Mechanismus der Onkosuppression ist weitestgehend unbekannt. Zellkulturen, die durch virale bzw. zelluläre Onkogene (z.B. SV40 TAg, v-src, c-Ha-ras) oder durch chemische Karzinogene transformiert sind, zeigen eine erhöhte Replikation des parvoviralen Genoms und Expression der viralen Gene, gegenüber den nicht-transformierten Parentalzellen (Spegelaere *et al.*, 1991; Cornelis *et al.*, 1988a/b; Chen *et al.*, 1986; Van Hille *et al.*, 1989). Dieses Phänomen zusammen mit dem bevorzugten Auftreten der Parvoviren in Tumoren wird als **Onkotropismus** bezeichnet. Da Parvoviren nur für eine geringe Anzahl regulatorischer und struktureller Proteine kodieren, sind sie für ihre Vermehrung, neben einem bestimmten Differenzierungszustand ihrer Wirtszelle (Tattersall, 1978), von zellulären Faktoren abhängig, die transient während der S-Phase des Zellzyklus zur Verfügung stehen (Siegl *et al.*, 1973; Tattersall, 1972). Im Gegensatz zu onkogenen DNA-Viren sind Parvoviren jedoch nicht in der Lage, die S-Phase in ruhenden Zellen zu induzieren (Tattersall, 1972). Somit stellen

transformierte Zellen ein günstiges Milieu für die Vermehrung von Parvoviren dar (Cotmore & Tattersall, 1987; Rommelaere & Cornelis, 1991).

Nach parvoviraler Infektion kommt es darüber hinaus präferentiell zur Lyse von transformierten Zellen, während nicht-transformierte Zellen seltener abgetötet werden - eine Tatsache, die mit dem Begriff **Onkolyse** bezeichnet wird (Chen *et al.*, 1989; Cornelis *et al.*, 1988a/b; Mousset *et al.*, 1986; Mousset *et al.*, 1994; Salome *et al.*, 1990). Für den zytotoxischen Effekt von Parvoviren in der Zellkultur ist vor allem das multifunktionelle Nichtstrukturprotein NS1 verantwortlich (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990; Legrand *et al.* 1993; Mousset *et al.*, 1994; Van Hille *et al.*, 1989). Es wird angenommen, daß der onkolytische Effekt eine große Rolle bei der Onkosuppression *in vivo* spielt (Dupressoir *et al.*, 1989; Faisst *et al.*, 1998). Darüber hinaus wird auch eine Beteiligung des Immunsystems diskutiert (Haag *et al.*, 2000; Toolan *et al.*, 1986; Guetta *et al.*, 1986).

Der onkotrope Charakter der Parvoviren bietet die Möglichkeit eines gerichteten Gentransfer in transformierte Zellen. Diese Eigenschaft zeichnet sie gegenüber anderen bekannten Viren als Vektoren zur Genthherapie von Krebs aus. Die präferentielle Expression der parvoviralen Gene in transformierte Zellen ermöglicht eine bevorzugte Transgenproduktion in Krebszellen.

## 1.2.2 Taxonomie der Parvoviren

Die Familie der *Parvoviridae* besteht aus zwei Unterfamilien: *Densovirinae* umfaßt die Parvoviren der Insekten und *Parvovirinae* diejenigen der Vertebraten (Pringle, 1998; Tab. 1-1).

Zu den *Parvovirinae* gehören drei Genera: Die 1. Gattung der *Dependoviren* umfaßt die Adeno-assoziierten Viren (AAV), die für einen produktiven Infektionszyklus auf eine Koinfektion der Zielzelle mit einem Adeno- oder Herpesvirus als Helfervirus angewiesen sind (Atchison *et al.*, 1965; McPherson & Rosenthal, 1985). Alternativ können sie in Abwesenheit eines Helfervirus eine latente Infektion etablieren, indem sie sich ortsspezifisch in das Wirtszellgenom integrieren (Berns *et al.*, 1975).

Im Gegensatz dazu replizieren die Mitglieder der beiden weiteren Gattungen *Erythrovirus* und *Parvovirus* unabhängig von einem Helfervirus und werden deshalb auch als autonome Parvoviren bezeichnet. Eine Integration autonomer Parvoviren in das Wirtszellgenom wurde nicht beobachtet. Zu den Erythroviren, die sich durch ihren Tropismus für erythroide

Vorläuferzellen auszeichnen, gehört das einzige bisher bekannte humanpathogene autonom replizierende Parvovirus B19, das bei Menschen während einer akuten Infektion Ringelröteln (*Erythema infectiosum*) hervorrufen kann.

Wirtsorganismen	Unterfamilie	Gattung	Vertreter
Vertebraten	<i>Parvovirinae</i>	<b>helferabhängige PV:</b>	
		<i>Dependovirus</i>	AAV-1-6
		<b>autonome PV:</b>	
		<i>Erythrovirus</i>	B19, SPV
		<i>Parvovirus</i>	
		RV-artige:	MVMp, MVMi, H-1, KRV, FPV, CPV, PPV,
		andere:	LuIII, BPV, ADV
Arthropoden	<i>Densovirinae</i>	<i>Densovirus</i>	JcDNV
		<i>Iteravirus</i>	BmDNV
		<i>Contravirus</i>	AaDNV

**Tab. 1-1: Einige charakteristische Vertreter der Familie der *Parvoviridae***

AAV: *adeno-associated virus*, B19: B19-Virus, SPV: *simian parvovirus*, RV: *rat virus* MVMp: *minute virus of mice*/prototyper Stamm, MVMi: *minute virus of mice*/immunsuppressiver Stamm, H-1: H-1-Virus, KRV: *Kilham's rat virus*, FPV: *feline panleukopenia virus*, CPV: *canine parvovirus*, PPV: *porcine parvovirus*, LuIII: LuIII-Virus, BPV: *bovine parvovirus*, ADV: *Aleutian disease virus*, JcDNV: *Junonia coenia densovirus*, BmDNV: *Bombyx mori densovirus*, AaDNV: *Aedes aegypti densovirus*

Die Gattung *Parvovirus* wurde anhand von Analysen der Kapsidstruktur in verschiedene Gruppen unterteilt (Cotmore & Tattersall, 1987): Die größte Gruppe der RV-artigen Parvoviren (RV: *rat virus*) weist die Kapsidstrukturmerkmale des Prototyps der Gattung *Parvovirus*, des „Kilham's rat virus“ (KRV), auf. Zu den RV-artigen Viren gehören unter anderem (Tab. 1-1) die beiden in dieser Arbeit verwendeten Vertreter: das murine MVMp („minute virus of mice“/prototyper Stamm) und das H-1-Virus. Andere autonome Parvoviren unterscheiden sich z. B. von den RV-artigen Viren durch das Vorhandensein von vier statt drei Kapsidproteinen. Im weiteren Verlauf werden die verwendeten Viren zur Vereinfachung als Parvoviren bezeichnet.

## 1.2.3 Der parvovirale Lebenszyklus

### 1.2.3.1 Organisation des viralen Genoms

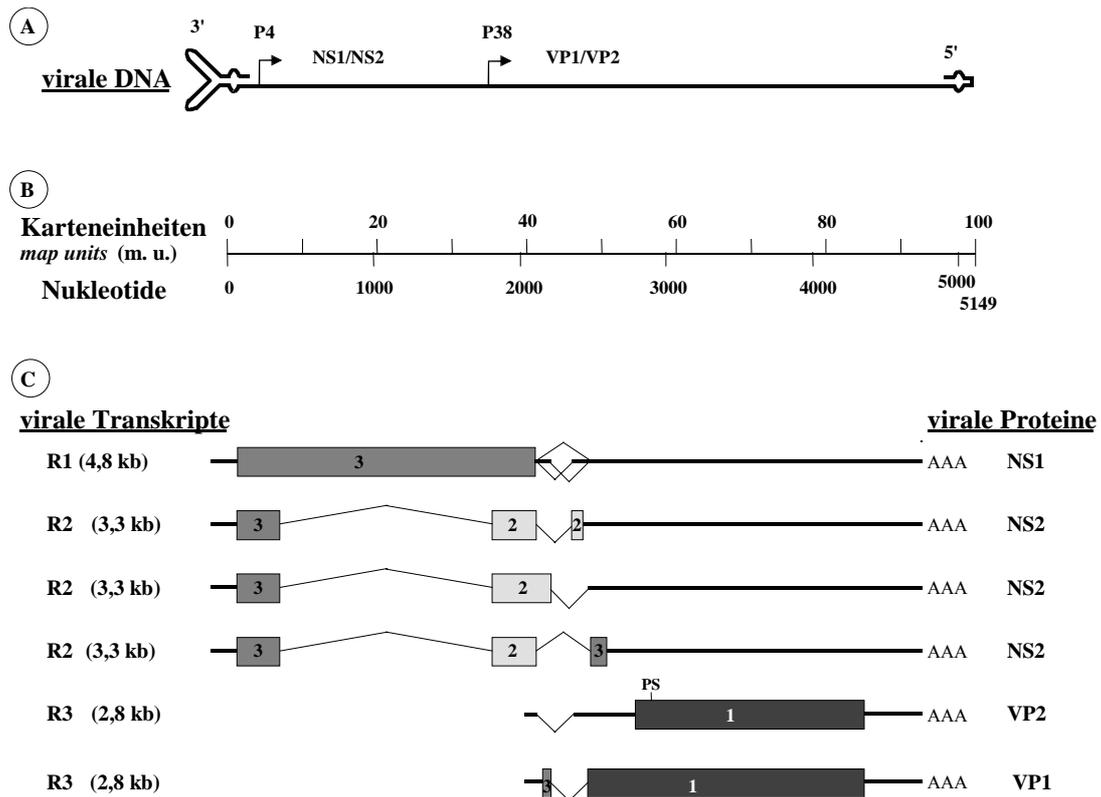
Bei den RV-artigen Viren werden fast ausschließlich (99%) DNA-Stränge verpackt, die komplementär zur während der Infektion synthetisierten mRNA sind (Minusstrang-Orientierung, Bates *et al.*, 1984). Das parvovirale Genom, das am Beispiel von MVM in Abbildung 1-1 schematisch dargestellt ist, besitzt terminale, nicht-identische, palindromische Sequenzabschnitte von 110-300 Basen, die als ITR-Regionen (*inverted terminal repeats*) bezeichnet werden (Astell *et al.*, 1983; Rhode & Paradiso, 1983). Diese Termini bilden Y- (3'-Ende) bzw. T-förmige (5'-Ende), doppelsträngige Sekundärstrukturen aus, die auch als Haarnadelschleifen bezeichnet werden (Abb. 1-1 A). Sie enthalten *cis*-aktive Sequenzen, die zur Replikation und Verpackung der DNA benötigt werden (Astell *et al.*, 1985).

Das Genom besitzt zwei überlappende Transkriptionseinheiten mit jeweils einem Promotor (Abb. 1-1 C; Cotmore & Tattersall, 1986; Cotmore & Tattersall, 1987). Unter Kontrolle des „frühen“ Promotors P4 (Karteneinheit 4, Abb. 1-1 B) entsteht ein Transkript, dessen Spleißvarianten R1 (4,8 kb) und R2 (3,3 kb) die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 kodieren. Bei NS2 führen drei alternativ verwendete Spleißsignale zur Synthese dreier, sich im C-Terminus unterscheidender Proteinisoformen (Pintel *et al.*, 1995). Der „späte“ Promotor P38 (Karteneinheit 38, Abb. 1-1 B) steuert die Synthese eines Transkripts, aus dem durch alternatives Spleißen die R3-Varianten entstehen (Abb. 1-1 A, C). Sie kodieren für die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2 (VP: *viral protein*) (Jongeneel *et al.*, 1986; Labieniec-Pintel & Pintel, 1986; Morgan & Ward, 1986). VP3 entsteht durch proteolytische Spaltung von VP2 im Spätstadium der Infektion.

### 1.2.3.2 Die Funktionen der viralen Proteine

#### *NS1*

Das multifunktionelle Nichtstrukturprotein NS1 (83 kDa) ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert (Cotmore & Tattersall, 1987; Nüesch & Tattersall, 1993). Da die Aktivität des P4-Promotors durch den Transkriptionsfaktor E2F stimuliert wird, ist die NS1-Expression in der S-Phase des Zellzyklus erhöht (Deleu *et al.*, 1998/1999).



**Abb. 1-1: Genomische Organisation und Kodierungsstrategie von MVM**

**A** Schematische Darstellung des einzelsträngigen parvoviralen Genoms negativer Polarität mit den beiden terminalen Haarnadelstrukturen und den P4- und P38-Promotoren sowie den von ihnen kodierten Proteinen.

**B** Einteilung des viralen Genoms in Karteneinheiten (*map units*, m. u.) unter gleichzeitiger Angabe der Nukleotidpositionen.

**C** Das virale Genom kodiert für drei virale Transkriptklassen R1, R2 und R3. Die viralen mRNAs kodieren für die Nichtstrukturproteine NS1, die drei NS2-Isoformen, sowie die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2 in verschiedenen Leserastern (mit 1, 2, und 3 bezeichnet). AAA steht für den PolyA-Schwanz. PS: Proteolytische Schnittstelle von VP2, die zur Entstehung von VP3 führt.

Seine Fähigkeit zu oligomerisieren und DNA sequenzspezifisch zu binden, sowie seine Aktivität als DNA-Helikase, ATPase und sequenzspezifische Endonuklease sind für eine produktive virale Replikation essentiell (Cotmore, *et al.*, 1995; Cotmore & Tattersall, 1998; Nuesch *et al.*, 1998a/b; Pujol *et al.*, 1997; Vanacker & Rommelaere, 1995; Wilson *et al.*, 1991). Eine weitere Funktion von NS1 besteht in der Transaktivierung des viralen P38-Promotors (Rhode & Richards, 1987). NS1 ist hauptsächlich für die virusvermittelte Zytotoxizität verantwortlich. Wird es allein in transformierten Zellen exprimiert, kommt es

zum Absterben dieser Zellen (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990; Mousset *et al.*, 1994). Dabei sind nicht-transformierte Zellen gegenüber einer bestimmten Menge NS1 resistent, wogegen dieselbe Menge NS1 nach Transformation der Zellen zu deren Absterben führt (Mousset *et al.*, 1994). Welcher Mechanismus der Lyse der Zellen zugrunde liegt, ist noch weitestgehend ungeklärt.

NS1 greift nach Parvovirusinfektion auch in viele zelluläre Prozesse ein. So führt die Expression von NS1 zu einer Akkumulation transformierter Zellen in der S- und G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus (Op De Beeck *et al.*, 1995; Op De Beeck & Caillet-Fauquet, 1997). Es wird darüber spekuliert, ob NS1-abhängige Veränderungen der Zelle durch eine direkte Interaktion zwischen NS1 und zellulären Faktoren zustande kommen, da das Phosphorylierungsmuster sowie die subzelluläre Verteilung von zellulären Proteinen ebenfalls NS1-abhängig verändert werden (Cziepluch *et al.*, 1998). NS1 interagiert direkt mit einigen zellulären Faktoren wie z. B. Sp1 (Kradly & Ward, 1995), PIF (Cotmore *et al.*, 1995) und SGT (Cziepluch *et al.*, 1998). Ob und auf welchem Weg diese Interaktionen zur Zytotoxizität beitragen, ist bisher unbekannt. Ein anderer Aspekt ist die Regulation von NS1 durch zelluläre Faktoren. Die Funktionen von NS1 während der Replikation, vor allem die Helikase-Aktivität, werden über die Phosphorylierung durch die Proteinkinase PKC $\lambda$  reguliert, die eine wesentliche Rolle in der Zelldifferenzierung und Transformation spielt (Nüesch *et al.*, 1998a/b).

## **NS2**

Über die genaue Funktion der kleinen Nichtstrukturproteine NS2 ist bisher wenig bekannt, und es ist noch unklar, ob die drei Isoformen unterschiedliche oder identische Funktionen haben. Bisher konnte nachgewiesen werden, daß die Aktivität von NS2 für den Zusammenbau bei MVMP-Viruspartikeln notwendig ist (Cotmore *et al.*, 1997). Außerdem führten bestimmte Mutationen des NS2 von MVMP bei einer Infektion von Mauszellen, d. h. den vom natürlichen Wirt abstammenden Zelllinien, zu einer reduzierten Produktion infektiöser Nachkommen (Cater & Pintel, 1992). Dagegen sind NS2-Funktionen von MVMP z. B. in humanen Zellen für eine produktive Infektion nicht essentiell (Naeger *et al.*, 1993).

## **VPI-3**

Die Kapside der RV-artigen Parvoviren bestehen hauptsächlich aus VP1 und VP2 (Cotmore *et al.*, 1983; Rhode & Paradiso, 1983). Dagegen ist VP3 lediglich in geringen Mengen und

ausschließlich bei infektiösen Partikeln nachzuweisen. Leere Partikel bestehen dagegen nur aus VP1 und VP2 (Paradiso, 1981; Santaren *et al.*, 1993; Tattersall *et al.*, 1977).

### 1.2.3.3 Der Verlauf des parvoviralen Infektionszyklus

Die parvovirale Infektion beginnt mit der Adsorption des Viruspartikels an spezifische Oberflächenrezeptoren. Die Rezeptoren von MVMp und H-1 sind noch nicht bekannt, aber ihre Sensitivität gegenüber Neuraminidase- und Trypsinbehandlung läßt auf ein Protein mit N-Acetyl-Neuraminsäureresten schließen (Cotmore & Tattersall, 1987). Solche Rezeptoren, die sowohl volle als auch leere Kapside binden, befinden sich in großer Zahl ( $1-5 \times 10^5$ ) auf Zellen unterschiedlichster Gewebetypen (Linser *et al.*, 1977; Spalholz & Tattersall, 1983).

Die Aufnahme der Viren in die Zelle erfolgt durch Endozytose (Linser *et al.*, 1977; Linser *et al.*, 1979), wobei die Penetration der Wirtszelle zu jedem Punkt im Zellzyklus erfolgen kann (Rhode, 1973; Siegl & Gautschi, 1973). Neueste Untersuchungen zeigen, daß der endosomale Transport von CPV Clathrin-vermittelt ist (Parker & Parish, 2000). Nach Internalisierung werden die Viren in den Zellkern transloziert, wobei der genaue Transportmechanismus noch ungeklärt ist. Proliferiert die Wirtszelle nicht, kann das Virusgenom latent in der Zelle vorliegen, ohne in das Wirtszellgenom zu integrieren (Richards & Armentrout, 1979). Die Replikation des viralen Genoms und die Expression der viralen Gene sind von zellulären Faktoren abhängig, die nur während der S-Phase des Zellzyklus zur Verfügung stehen (Cotmore & Tattersall, 1987). Dabei besteht der erste Schritt in der Konversion des einzelsträngigen Genoms (ss) zur doppelsträngigen monomer replikativen Form (mRF), die ebenfalls als Matrize zur Synthese der viralen mRNA dient. Die Konversion ist strikt S-Phase gebunden, womit die Virusvermehrung allein in proliferierenden Zellen erfolgt (Bashir *et al.*, 2000). Die nachfolgenden Amplifikationsschritte, die NS1-abhängig sind, verlaufen über multimere Duplex-Intermediate in einem unidirektionalen, quasizirkulären „rollenden Haarnadel-Mechanismus“ (*rolling hairpin replication*, Astell *et al.*, 1985; Tattersall & Ward, 1976). Als *cis*-wirkende Sequenzen dafür werden die beiden doppelsträngigen, terminalen Palindrome (Faust & Ward, 1979) sowie interne Replikationssequenzen am 5'-Ende des Genoms benötigt. Die Produktion infektiöser Nachkommenviren erfordert fortlaufende DNA-Synthese und ist von der Anwesenheit vorgeformter Kapside abhängig (Hardt *et al.*, 1983). Es konnte gezeigt werden, daß bei der Verpackung *cis*-aktive virale DNA-Sequenzen eine Rolle spielen, die außerhalb der terminalen Palindrome liegen (Kestler *et al.*, 1999). Die Freisetzung der neu entstandenen Viruspartikel erfolgt durch Lyse der Wirtszelle. Für die

promonozytische Zelllinie U937 konnte gezeigt werden, daß eine H-1-Infektion den sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose) auslöst (Rayet *et al.*, 1998).

#### **1.2.4 Die geringe Pathogenität der Parvoviren H-1 und MVMP**

Aufgrund ihrer geringen Pathogenität in der Maus und im Menschen wurden für diese Arbeit die beiden bestuntersuchten Nagerparvoviren MVMP und H-1 ausgewählt. Nagerparvoviren können in verschiedenen Wirtstierarten zu Krankheiten führen. Akute, letale Erkrankungen entstehen aber nur nach intrauteriner oder neonataler Infektion, während sie in adulten Tieren selten pathogen sind (Jacoby *et al.*, 1996). H-1 beispielsweise führt nach *in vivo*-Applikation bei Menschen zu Virämien, ohne nachteilige Effekte hervorzurufen (Dupressoir *et al.*, 1993; Toolan *et al.*, 1965).

Es wurden auch Stamm-spezifische Erkrankungen beobachtet. Von dem *Minute Virus of Mice* (MVM) existieren zwei allotrope Varianten: Zum einen der prototype Stamm MVMP, zum anderen der immunsuppressive Stamm MVMI, wobei der erste Fibroblasten und der zweite T-Lymphozyten produktiv infiziert (Cotmore & Tattersall, 1987; Spalholz & Tattersall, 1983; Tattersall & Bratton, 1983). Obwohl die zwei Varianten in beide Zellen eindringen können, findet eine Replikation nur in der eigentlichen Wirtszelle statt. Es zeigte sich, daß nur 2 Aminosäuren der Kapsidproteine den Zelltropismus bestimmen (Ball-Goodrich & Tattersall, 1992; Previsani *et al.*, 1997). MVMI ist in der Lage, *in vitro* die zytotoxische Aktivität von T-Zellen zu inhibieren. Dagegen gilt MVMP in der Maus als apathogen (Tattersall & Cotmore, 1986). Im Gegensatz zu einigen Viren, von denen viralen Vektoren abstammen, führen die Parentalviren MVMP und H-1 zu klinisch unauffälligen Infektionen (Cotmore & Tattersall, 1987; Guetta *et al.*, 1986; Toolan *et al.*, 1967). Rekombinante Parvoviren werden daher als sichere Vektoren eingestuft (Kirn & McCormick, 1996).

#### **1.2.5 Der Aufbau rekombinanter parvoviraler Vektoren**

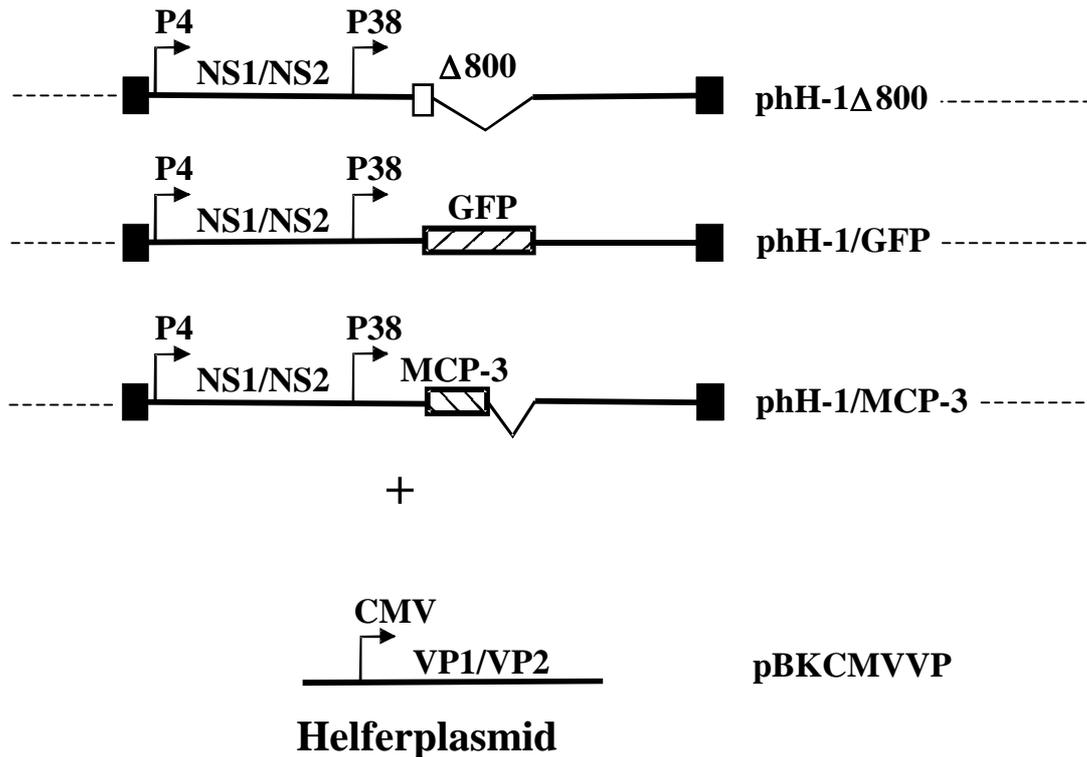
Parvoviren sind aufgrund ihrer geringen Pathogenität und ihrer zu Beginn des Kapitels beschriebenen onkosuppressiven Eigenschaften in besonderem Maße zur Genterapie von Krebs geeignet. Die Tatsache, daß verschiedene Parvoviren ursprünglich aus wachsenden Tumoren isoliert wurden, zeigt, daß die Viren das Tumorstadium nicht vollkommen

verhindern können. Um sich ihre positiven Eigenschaften zu Nutze zu machen, wurden rekombinante Derivate entwickelt, die eine Integration eines Transgens in das parvovirale Genom ermöglichen, dessen Expression die antineoplastische Wirkung des Wildtypvirus verstärken kann. Bei der Konstruktion der parvoviralen Vektoren ist es wünschenswert, den Tropismus zu erhalten, um neben der intrinsischen onkolytischen Wirkung des Virus das Transgen präferenziell in Tumorzellen zu transduzieren.

Da parvovirale Kapside eine Verlängerung des Genoms von mehr als 5% nicht tolerieren, muß das Transgen im Austausch gegen einen Teil des Genoms integriert werden. (Kestler *et al.*, 1999). So können alle kodierenden und nicht-kodierenden Bereiche entfernt werden, die nicht essentiell für Replikation und Verpackung der Viren sind. Ein Transgen kann dabei unter die Kontrolle des autologen P4-Promotors oder eines heterologen Promotors gestellt werden (Maxwell *et al.*, 1993). Durch den Verlust der Nichtstrukturproteine und des P38-Promotors gehen aber wichtige Eigenschaften wie Onkotropismus und Zytotoxizität verloren, die parvovirale Vektoren für eine tumorgerichtete Gentherapie gerade auszeichnen.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Insertion des Transgens im Austausch gegen einen Teil der VP-kodierenden Region. Dadurch ist die Transgenlänge zwar limitiert, die gewünschten Eigenschaften der Vektoren bleiben aber erhalten.

In dieser Arbeit wurden Vektorkonstrukte der zweiten Variante gewählt, die von H-1 und MVMp abstammen (Kestler *et al.*, 1999). Als Beispiel sind die rekombinanten H-1-Vektoren in Abbildung 1-2 schematisch dargestellt. Bei der Konstruktion der rekombinanten Vektoren blieben die für die Replikation notwendigen *cis*-wirkenden Elemente in den telomeren Regionen (■) erhalten. Durch die Verwendung des P4-Promotors (➔ P4) ist die NS-Expression (NS1/2) S-Phase-stimuliert und erfolgt damit vorwiegend in schnell proliferierenden Zellen. Die NS1-Expression ermöglicht eine hohe Replikation und durch eine starke Transaktivierung des P38-Promotors (➔ P38) eine hohe Transgenexpression. Außerdem kann die NS1-vermittelte lytische Wirkung der Viren erhalten bleiben. Die multiple Klonierungsstelle zur Insertion des Transgens (□) beginnt am Translationsstart von VP2 (Kestler *et al.*, 1999). Zur Produktion rekombinanter Viren werden die rekombinanten Genome mit einem Helferplasmid kotransfiziert, das die VP-Genexpression ermöglicht.



**Abb. 1-2: Schematische Darstellung der rekombinanten Parvoviren am Beispiel der H-1-Vektoren**

Die rekombinanten hH1-Vektoren liegen in einem pUC19 Plasmid (---) als doppelsträngige Form vor. Ausgehend von dem infektiösen DNA-Klon pH1 wurden 800 bp der VP-kodierenden Transkriptionseinheit deletiert und eine multiple Klonierungsstelle (□) am VP2-Translationsinitiationscodon eingefügt. Die schwarzen Kästchen repräsentieren die palindromischen Sequenzen mit dem DNA-Replikationsstart. Pfeile markieren die viralen Promotoren P4 und P38. NS1/NS2 und VP1/VP2 zeigen die Regionen, die für die Nichtstrukturproteine (NS) bzw. die Kapsidproteine (VP) kodieren. Transgene (gestreifte Kästchen) können in den Polylinker des pH1Δ800-Plasmids eingefügt werden. Rekombinante Viren wurden durch Kotransfektion von 293T-Zellen mit dem rekombinanten Genom und dem Helferplasmid pBKCMVVP, das die VP-Gene unter Kontrolle des Zytomegaloviruspromotors (CMV) enthält, produziert.

Für Vektoren, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, konnte eine präferenzielle Transgenexpression in transformierten gegenüber nicht-transformierten Zellkulturen bestätigt werden (Dupont *et al.*, 2000).

Die Nachteile des existierenden Systems sind zum einen die limitierte Länge des Transgens, das inseriert werden kann. Zum anderen führt die Produktion rekombinanter Parvoviren zu relativ geringen Titern der Viruspräparationen und einer Kontamination mit replikationskompetenten Revertanten (*replication competent virus*, RCV). Diese sog. „Wildtypkontamination“ entsteht nach Kotransfektion durch Rekombination zwischen

homologen Sequenzen des rekombinanten Vektors und des VP-tragenden Verpackungshelferplasmids (Brandenburger & Russell, 1996).

### **1.3 Mögliche Transgene zur Gentherapie von Krebs mit parvoviralen Vektoren**

Bei der Gentherapie von Krebs werden verschiedene Strategien verfolgt. Eine Möglichkeit besteht in der Korrektur genetischer Defekte, die für die Krebsentstehung verantwortlich sind. Dabei werden mutierte Tumorsuppressorgene wie p53 supplementiert oder Onkogene durch Transduktion von *Antisense*-mRNA inhibiert (Yang *et al.*, 1995). Als weitere Strategie ergeben sich aus der Gentherapie vielfältige Möglichkeiten, eine Zerstörung der transformierter Zellen zu erreichen. Dabei werden direkt- oder indirekt-wirkende Toxine sowie immunmodulatorische Faktoren untersucht. Ein Beispiel für die Verwendung von Toxinen ist der Transfer eines sogenannten Suizidgens, wie der Thymidinkinase des HSV, die eine inaktive Vorstufe in ein wirksames Toxin konvertiert (Jia *et al.*, 1994). Bei den genannten Ansätzen hängt der dauerhafte Erfolg dieser Therapie von einer vollständigen Transduktion aller transformierten Zellen ab, da ein Tumor theoretisch aus einer einzelnen Zelle entstehen kann. Dies ist jedoch mit keiner der bisher bekannten Gentransfermethoden möglich.

Einen anderen Ansatz verfolgt die Transduktion antiangiogener Faktoren, die zu einer Hemmung der Gefäßbildung führt und so die Versorgung des Tumorgewebes unterbindet (Folkman, 1990).

Ein weitere Alternative liegt in der Immuntherapie. Das Ziel besteht in der Aktivierung des Immunsystems des Wirts gegen die Tumorzellen. Der Vorteil liegt darin, daß Wirtsabwehrmechanismen nicht nur gegen die Transgen-produzierenden Zellen, sondern auch gegen die nicht-transduzierten Nachbarzellen aktiviert werden. Auf diese Weise könnten auch Metastasen eliminiert werden. Hierbei werden wiederum zwei Ansätze unterschieden. Auf der einen Seite wird versucht, die Immunogenität der Tumorzellen durch den Transfer von z. B. kostimulatorischen Faktoren wie B7-1 zu erhöhen (Fujii *et al.*, 1996). Zu diesem Therapieansatz kann auch die Tumorzellvaksinierung gezählt werden. Sie beruht auf der Präsentation tumorspezifischer Antigene, die durch zytotoxische T-Zellen erkannt werden

können. Diese Form der Therapie birgt allerdings das Risiko der Präsentation „falscher Peptide“, die nicht zur Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort, sondern im Gegenteil zu einer Toleranz gegenüber den Tumorzellen führt (Bodey *et al.*, 2000).

Eine weitere Möglichkeit besteht im Transfer von Zytokinen zur Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten im Bereich des Tumors. Die Lyse der Tumorzellen wird dabei durch die Aktivität der Immunzellen vermittelt. Da Zytokine in der Regel mit mehreren Leukozyten interagieren, kann der Transfer eines einzelnen Gens das Zusammenspiel verschiedener Zellen ermöglichen. Zytokine eignen sich auch aufgrund ihrer geringen Länge für die Insertion in parvovirale Vektoren. In dieser Arbeit wurde das Chemokin MCP-3 ausgewählt, da es mit einer Vielzahl von Leukozytenpopulationen interagiert.

### **1.3.1 Die Funktion der Chemokine**

Chemotaktische Zytokine, genannt Chemokine, bilden eine Superfamilie kleiner (5 –20 kDa), Proteoglykan-bindender Proteine, die die Migration und Aktivierung von Leukozyten regulieren. Damit spielen sie eine zentrale Rolle in Prozessen wie Immunantwort, Angiogenese, entzündlichen Reaktionen und Hämatopoese. Die Migration erfolgt entlang eines steigenden Chemokinkonzentrationsgradienten (Baggioni & Dahinden, 1994; Hedrick & Zlotnik, 1996; Koch *et al.*, 1992; Luster, 1998; Rollins, 1997).

Chemokine sind durch 4 konservierte Cysteinreste charakterisiert. Nach Position und Abstand der 2 Cysteinreste im N-terminalen Bereich unterscheidet man C-, CC-, CXC- oder CX3C-Chemokine (Baggioni, 1993), wobei die C- und CX3C-Familie bisher nur aus jeweils einem Mitglied, Lymphotaktin bzw. Fractalkin, besteht. Zu den bekannten Vertretern der CXC-Gruppe, auch  $\alpha$ -Familie genannt, zählt IL-8. CXC-Chemokine locken v. a. Neutrophile an, während die CC- oder  $\beta$ -Chemokine bevorzugt auf T-Zellen und Monozyten wirken. Neben RANTES und MIP-1 $\alpha/\beta$  gehören zu dieser Gruppe auch *Monocyte Chemotactic Protein* MCP-1 bis 4 (Van Damme *et al.*, 1992; Baggiolini *et al.*, 1994). Dabei sind MCP-1 und MCP-3 mit 73% Homologie auf Aminosäureebene die engsten Verwandten (Van Damme *et al.*, 1992). Bis jetzt sind in der Maus 3 MCP-Homologe identifiziert worden: Je/MCP-1 (Rollins, 1988), MARC-FIC/MCP-3 (Heinrich *et al.*, 1993; Thirion *et al.*, 1994) und murines MCP-5 (Sarafí *et al.*, 1997).

Chemokine interagieren über Rezeptoren, die aus sieben Transmembrandomänen bestehen und an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind. Bisher sind im Menschen 11 CC-Chemokin-spezifische Rezeptoren (CCR1-11) und 5 CXC-spezifische Rezeptoren (CXCR1-5) identifiziert worden (Berger *et al.*, 1999; Horuk & Peiper, 1995; Permack & Schall, 1996; Schweickart *et al.*, 2000). Ein Rezeptor kann mehrere Liganden binden und umgekehrt interagiert ein Chemokin mit verschiedenen Rezeptoren. Einige dieser Rezeptoren dienen als Korezeptor bei HIV-Infektion, so daß Chemokine durch Verdrängung eine HIV-1-Infektion kompetitiv inhibieren können (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1996; Schols *et al.*, 1997; Greco *et al.*, 1999).

Die Rezeptorbindung eines Chemokins löst eine Signalkaskade aus über G-Proteine (meist  $G_{\alpha i}$ ), Phospholipase C und die Produktion von Inositoltriphosphat, die zu einer  $Ca^{2+}$ -Freigabe aus intrazellulären Kompartimenten führt (Locati *et al.*, 1996; Proost *et al.*, 1996; Rollins, 1997). Nach Auslösen des Signals kommt es bei den Leukozyten meist zur Internalisierung der Rezeptoren und dadurch zur Desensibilisierung gegenüber dem Chemokin.

Leukozyten wandern entlang eines steigenden Konzentrationsgradienten der Chemokine. Endothelzellen präsentieren beispielsweise in der Nähe eines Entzündungsherdess Proteoglykan-gebundene Chemokine, die von den patrouillierenden Leukozyten erkannt werden. Durch die zusätzliche Bindung von Selektinen auf der Oberfläche der endothelialen Zellen und deren Liganden auf der Leukozytenmembran kommt es zuerst zu einer rollenden Fortbewegung entlang der endothelialen Oberfläche. Nach einer stabilen Interaktion an einer bestimmten Position erfolgt die Diapedesis, d. h. die Wanderung aus dem Gefäß zwischen den Endothelzellen hindurch. Diese beiden Schritte sind abhängig von Chemokinrezeptor- und Integrin-Expression der Leukozyten. Die Wanderung zum Bestimmungsort erfolgt erneut entlang eines Chemokingradienten in der extrazellulären Matrix (Springer, 1994; Rollins, 1997).

### **1.3.2 Das Chemokin MCP-3**

Identifiziert wurde MCP-3 ursprünglich parallel aus humanen Osteosarkom-Zellen (Opdenakker *et al.*, 1994; Van Damme *et al.*, 1992) und promyelomonozytären Zellen (Minty *et al.*, 1993) mit einem Molekulargewicht von 11 kDa (Menten *et al.*, 1999). Bis jetzt ist allerdings sehr wenig über die natürliche zelluläre Herkunft und biochemische Form bekannt

(Menten *et al.*, 1999). MCP-3 besitzt eine hohe Affinität zu CCR1-3 (Proost *et al.*, 1996), CCR5 (Blanpain *et al.*, 1999), CCR10 (Bonini *et al.*, 1997) und CCR11 (Schweickart *et al.*, 2000). Die Rezeptoren CCR1-3 und CCR5 werden von Monozyten, T-Zellen, Natürlichen Killer (NK)-Zellen, Granulozyten und DC exprimiert (Ward *et al.*, 1998; Van Coillie *et al.*, 1999). *In vitro* konnte die Chemotaxis dieser Leukozytenpopulationen durch MCP-3 bestätigt werden:

Chemotaxis-Tests mit synthetischem MCP-3 bestätigten *in vitro* eine Anlockung und  $[Ca^{2+}]$ -Efflux von humanen Monozyten (Ugucioni *et al.*, 1995). Nach intradermaler MCP-3-Injektion in Kaninchen wurde ebenfalls eine Rekrutierung von Makrophagen festgestellt (Van Damme *et al.*, 1992). Es zeigte sich, daß MCP-3 bevorzugt über CCR2 mit Monozyten interagiert (Sozzani *et al.*, 1994). Dabei wird die Sekretion von IL-12 durch MCP-3 supprimiert (Braun *et al.*, 2000).

Humane NK-Zellklone und frisch isolierte NK-Zellen zeigten nach IL-2-Stimulierung eine chemotaktische Anlockung und  $[Ca^{2+}]$ -Efflux durch MCP-3, sowie Granzym A-Abgabe (Loetscher *et al.*, 1996; Allavena *et al.*, 1994/1996). Taub *et al.* (1995b) bestätigten die Chemotaxis, verbunden mit einer erhöhten Degranulation der NK-Zellen.

Loetscher *et al.* (1994/1996) konnten außerdem eine chemotaktische Anlockung von aktivierten humanen  $CD4^{+}$ - und  $CD8^{+}$ -T-Zellklonen mit MCP-3 nachweisen. Die stimulierten  $CD8^{+}$ -T-Zellklone sekretierten zusätzlich Granzym A in Gegenwart von MCP-3. Es wurde keine Migration von frisch aus humanem Blut separierten, unstimulierten T-Zellen beobachtet (Taub *et al.*, 1995). Allerdings kann MCP-3 die Diapedesis dieser Lymphozyten fördern (Roth *et al.*, 1995).

Unreife humane DC wandern ebenfalls *in vitro* entlang eines MCP-3-Gradienten, während reife DC dies nicht zeigen. Die Antigenpräsentation, IL-12-Abgabe und zytotoxische Aktivierung von T-Zellen bleibt durch MCP-3 unbeeinflusst (Sozzani *et al.*, 1995/1997; Vecchi *et al.*, 1999; Yanagihara *et al.*, 1998).

Des weiteren konnte eine chemotaktische Anlockung, zusammen mit einem  $[Ca^{2+}]$ -Efflux, frisch separierter humaner basophiler und eosinophiler Granulozyten durch MCP-3 gezeigt werden, verbunden mit einer Histamin- und Leukotrien-C4-Abgabe der basophilen Granulozyten (Ugucioni *et al.*, 1997; Noso *et al.*, 1994; Dahinden *et al.*, 1994).

*In vitro*-Versuche zur Aktivität des humanen MCP-3 ergaben eine Chemotaxis humaner Monozyten, unreifer DC, aktivierter NK-Zellen, aktivierter CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, basophiler und eosinophiler Granulozyten. Bisher ist aber wenig über die natürliche biologische Funktion von MCP-3 bekannt. Die MCP-3-Transduktion in einem stark immunogenen P815-Mastozytomtumormodell führte in immunkompetenten Mäusen zum Teil zu einer Abstoßung der Mastozytomtumoren und zu einer tumorspezifischen erworbenen Immunität (Fioretti *et al.*, 1998). Dabei war zudem eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in MCP-3-sekretierenden Tumoren zu beobachten, obwohl CC-Chemokine im allgemeinen nicht mit neutrophilen Granulozyten interagieren. *In vitro* führten Versuche zur Chemotaxis von MCP-3 auf diese Art von Granulozyten zu widersprüchlichen Ergebnissen (Van Damme *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß IFN- $\gamma$  die Transkription von CCR1 und CCR3 in humanen neutrophilen Granulozyten induziert (Bonnechi *et al.*, 1999). IFN- $\gamma$  wird von aktivierten NK-Zellen und T-Zellen abgegeben. Die Anlockung dieser Granulozyten könnte also *in vivo* einen sekundären Effekt auf die MCP-3-Sekretion darstellen. Die Applikation MCP-3-gekoppelter Antikörper führte ebenfalls zur Induktion einer T-Zell-vermittelten Tumorzellyse und in einigen Fällen zu einer erworbenen Immunität gegen die Tumorzellen (Biragyn *et al.*, 1999).

MCP-3 ist, soweit bisher bekannt, das pluripotenteste Chemokin und wurde deshalb als Transgen für diese Arbeit ausgewählt.

## **1.4 Die Tumormodelle**

### **1.4.1 Murine B78/H1-Melanomzellen**

Die Versuche von Fioretti *et al.* (1998) zeigen, daß eine Immuntherapie hoch immunogener Tumoren mit MCP-3 möglich ist, wobei die beobachteten Effekte zum größten Teil auf einer Aktivierung zytotoxischer T-Zellen basierten. Humane Tumoren zeichnen sich aber gerade durch eine geringe Immunogenität aus, aufgrund einer fehlerhaften oder fehlenden Expression von einem oder mehreren HLA-Molekülen (Garrido *et al.*, 1995; Ferrone & Marincola, 1995). Bei Tumoren epithelialen Ursprungs konnte in 88% der Fälle keine HLA-Expression

nachgewiesen werden (Garrido *et al.*, 1997). Die niedrige HLA-Expression kann ein wichtiger Mechanismus sein, durch den Tumoren einer T-Zell-vermittelten Immunantwort entgehen (Nanni *et al.*, 1998). MCP-3 kann *in vivo* eine Th1-Immunantwort auslösen (Fioretti *et al.*, 1998), aber auch zumindest *in vitro* Effektoren der angeborenen Immunantwort wie NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten rekrutieren. Damit könnte eine MCP-3-Transduktion einen antitumoralen Effekt auch auf schwach immunogene Tumore vermitteln.

Eine der gefährlichsten Formen von Krebs stellen Melanome dar: Obwohl sie zu einem frühen Stadium operativ entfernt werden können, sind wiederkehrende Melanome und Metastasen resistent gegenüber klassischen Behandlungen wie Chemotherapie, und die Prognosen für fortgeschrittene Melanome sind schlecht (Johnson *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1999). Aus diesem Grund besteht dringender Bedarf für einen alternativen Ansatz zur Behandlung von Melanomen.

Für die Untersuchung der antionkogenen Eigenschaften von MVMp/MCP-3 in einem schwach immunogenen Tumormodell wurden B78/H1-Melanomtumoren in immunkompetenten syngen C57BL/6-Mäusen ausgewählt. B78/H1 ist ein amelanoider, stark tumorigener Klon der B16-Melanomzelllinie (Lollini *et al.*, 1990), der bereits bei Inokulation von  $10^3$  Zellen zur Induktion schnell wachsender Tumoren in syngen C57BL/6-Mäusen führt (Bottazzi *et al.*, 1992). In FACS-Analysen zeigen B78/H1-Zellen keine Expression von MHC-Klasse-I/II-Molekülen (Nanni *et al.*, 1998).

## **1.4.2 Humane Zervixkarzinomzellen**

Im Hinblick auf eine spätere klinische Verwendung MCP-3-rekombinanter Parvoviren sollte ihr Einfluß auf das Wachstum humaner Zellen untersucht werden. Da H-1 im Menschen eine Virämie auslösen kann, im Gegensatz zu MVMp, wurden H-1-verwandte Vektoren für diese Untersuchungen eingesetzt. Da der Einfluß des Wildtypvirus H-1 auf HeLa-Zellen bereits untersucht wurde (Faisst *et al.*, 1998; Haag *et al.*, 2000), bot sich dieses Tumormodell zum Vergleich mit dem MCP-3-tragenden Vektor an.

Als Versuchstier wurde die Nacktmaus ausgewählt. Sie ist Träger einer Mutation im *nude*-Gen und zeichnet sich durch Haarlosigkeit und Thymusaplasie aus. Da während der Embryonalentwicklung die Differenzierung des Thymus in Rinde und Mark entfällt, bleibt der Thymus klein und funktionslos und die Besiedlung mit lymphoiden Zellen unterbleibt.

Aufgrund der fehlenden T-Zellpopulation werden Allo- und Xenotransplantate von soliden Tumoren oder Tumorzelllinien ohne Abstoßungsreaktion akzeptiert, im Gegensatz zu immunkompetenten Mäusen.

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die onkosuppressiven Eigenschaften zeichnen autonome Parvoviren wie H-1 und MVMp zusammen mit ihrer geringen Pathogenität als attraktive Vektoren für die Gentherapie von Krebs aus (Dinsart *et al.*, 1996; Dupressoir *et al.*, 1993).

Ziel dieser Arbeit war es, die antitumorale Wirkung MCP-3-rekombinanter parvoviraler Vektoren zu untersuchen. Das humane Chemokin MCP-3 wurde als Transgen ausgewählt, da es mit einer Vielzahl von Leukozytenpopulationen interagiert und deshalb eine antitumorale Wirkung auch auf schwach immunogene Tumoren vermuten läßt, ein weit verbreitetes Phänomen bei humanen Tumoren.

Für die Untersuchung des antineoplastischen Effekts von MVMp/MCP-3 wurden die stark tumorigenen, aber schwach immunogenen B78/H1-Melanomtumoren in immunkompetenten Mäusen als Modell gewählt. Mit Blick auf eine spätere klinische Anwendung sollte außerdem der Einfluß von hH1/MCP-3 auf das Wachstum humaner HeLa-Zervixkarzinomzellen in Nacktmäusen untersucht werden. Der Effekt MCP-3-rekombinanter Viren sollte mit dem der Wildtyp- bzw der transgenfreier Viren verglichen werden. Dazu waren folgende Arbeiten und Versuche notwendig:

- Nach Klonierung der cDNA des humanen MCP-3 in die verschiedenen parvoviralen Vektoren mußten ausreichende Mengen der MCP-3-rekombinanten Viren und der Kontrollviren produziert werden.
- Da ein antitumoraler Effekt im Tier nur bei einer ausreichenden Transgenproduktion zu erwarten ist, sollte die MCP-3-Abgabe von B78/H1- und HeLa-Zellen nach Infektion mit MVMp/MCP-3 bzw. hH1/MCP-3 quantifiziert werden.

- Anschließend war es vorgesehen, das Wachstum von B78/H1-Melanomzellen, die *in vitro* mit MVMp/MCP-3 infiziert worden waren, in syngenen Mäusen zu untersuchen, im Vergleich zum Wachstum MVMp $\Delta$ 400- oder MVMp-infizierter Zellen.
- Außerdem sollte der Effekt einer MVMp/MCP-3-Behandlung bereits etablierter B78/H1-Melanomtumore bestimmt werden, im Vergleich zur Wirkung von MVMp $\Delta$ 400 bzw. MVMp.
- Danach war es vorgesehen, den Einfluß von hH1/MCP-3 auf das Wachstum humaner Zervixkarzinomzellen in Nacktmäusen zu bestimmen, verglichen mit dem des Kontrollvirus hH1 $\Delta$ 800.
- Bei einem positiven Ergebnis sollten sich Untersuchungen zum Mechanismus des antineoplastischen Effekts des MCP-3-rekombinanten Virus anschließen.

In der Regel wird unter *ex vivo*-Behandlung die Entnahme, Modifikation und Reimplantation von Zellen desselben Individuums verstanden. Für diese Arbeit möchte ich die Untersuchungen mit Zellen, die *außerhalb des Tieres* infiziert werden und danach in Mäuse implantiert wurden, in die Definition von *ex vivo*-Versuchen mit einbeziehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Säuren, Basen, anorganische und organische Lösungen stammten von den Firmen Amersham (Braunschweig), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) in der jeweils höchsten Reinheitsstufe.

### 2.2 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> SURE	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene

#### 2.2.2 Kultivierung und Kryokonservierung von *E. coli*

Beide *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C kultiviert. Suspensionskulturen wurden über Nacht bei ca. 200 rpm geschüttelt. Für die Kryokonservierung wurden 1,2 ml der Kultur mit 300 µl sterilem Glycerol (20 %) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

LB-Medium:            5 g NaCl  
                              5 g Bacto-Hefeextrakt (Difco)  
                              10 g Bacto-Trypton (Difco)  
                              ad 1000 ml H<sub>2</sub>O, autoklavieren

LB-Agar:                LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar

Selektionszusätze:    100 µg/ml Ampicillin (Stratagene)  
                                  12,5 µg/ml Tetracyclin (Sigma)

### 2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Transformation wurden Zellen beider *E. coli*-Stämme nach der Methode von Hanahan (1983) mit den Transformationspuffern A und B kompetent gemacht.

Transformationspuffer A: 90 mM K-Acetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,5 mM LiCl  
100 mM RbCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
15% (v/v) Glycin  
pH 5,8

Transformationspuffer B: 10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
15% (v/v) Glycin  
pH 7,0

### 2.2.4 Transformation von *E. coli*-Zellen

Ligationsprodukte zur Klonierung von MCP-3 wurden in kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-Blue transformiert. Dazu wurden 100 µl einer Suspension kompetenter Zellen mit der zu transformierenden DNA 20 min auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock von 90 sec bei 42°C ausgesetzt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 35 bis 45 min bei 37°C inkubiert und auf LB/Amp-Platten ausgestrichen. Um Veränderungen der Vektoren durch Rekombination/Deletionen zu vermeiden, wurden danach 10-20 ng Plasmid-DNA (2.3.2) der gewünschten Klone zur weiteren Verwendung in kompetente SURE-Bakterien transformiert.

## 2.3 Präparation, Analyse und Modifikation von DNA

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die molekularbiologischen Techniken nach Vorschriften von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

### 2.3.1 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind mit den dazugehörigen Referenzen in der folgenden Liste aufgeführt:

Bezeichnung	Referenz
pBKRSV/PCRMCP3B	Opdenakker <i>et al.</i> , 1993
phH1 $\Delta$ 800	Kestler <i>et al.</i> , 1999
phH1/MCP-3	diese Arbeit
phH1/GFP	Kestler <i>et al.</i> , 1999
pBK-CMVVP	Kestler <i>et al.</i> , 1999
pMVMp $\Delta$ 400	Kestler <i>et al.</i> , 1999
pMVMp/MCP-3	diese Arbeit
pMVMp/GFP	C. Kornfeld, Diplomarbeit, 1997
pMVMCMVVP	C. Kornfeld, Diplomarbeit, 1997

### 2.3.2 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA

Die Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde in 50  $\mu$ l TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und deren Reinheit und Konzentration photometrisch bestimmt (2.3.4).

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA

### 2.3.3 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA

Die Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA zur Transfektion von Säugetierzellen (2.4.5) erfolgte mit dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde in 500  $\mu$ l TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und die Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt (2.3.4).

### 2.3.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen ergibt sich durch Messung ihrer Extinktion bei 260 nm. Dabei entspricht eine Extinktion (E) von E = 1 einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml ds DNA, 33  $\mu$ g/ml ss DNA und 40  $\mu$ g/ml RNA. Die Reinheit einer Präparation lässt sich aus

dem Verhältnis der optischen Dichte bei den Wellenlängen von 260 nm zu 280 nm ableiten, wobei der Quotient für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen sollte.

### **2.3.5 Ethanolfällung von Nukleinsäuren**

Zur Konzentrierung und Umpufferung von DNA wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol<sub>abs</sub> zugegeben und 30 min bei -80°C bzw. ü.N. bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm (Tischzentrifuge) pelletiert, der Überstand abgehoben und das Pellet an der Luft getrocknet.

Für die Fällung von RNA wurde die Ethanolkonzentration auf das dreifache Volumen erhöht.

### **2.3.6 Restriktionsverdau**

Die Enzyme (Boehringer Mannheim, Gibco, New England Biolabs) wurden nach Empfehlungen des Herstellers in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Wenn Restriktionshydrolysen mit mehr als einem Enzym nicht in einem gemeinsamen Puffer ablaufen konnten, erfolgten die Spaltungen nacheinander. Dazu wurde die DNA nach Beendigung der ersten Restriktion mit Ethanol gefällt und das Pellet in einem für den weiteren Restriktionsverdau geeigneten Puffer aufgenommen. Bei dem Verdau von Plasmid-DNA nach 2.3.2 wurde 133 ng/µl RNase A (DNase-frei, Boehringer Mannheim) zugegeben.

### **2.3.7 Auffüllen überhängender Enden**

Die Modulation kohäsiver DNA-Enden in stumpfe Enden erfolgte durch Inkubation der DNA mit 3 U Klenow-Fragment (Boehringer Mannheim) und 0,5 nmol dNTP in dem mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 30 min bei 37°C.

### **2.3.8 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA**

Sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken wurde die DNA in 0,8-1,3% (w/v) Agarosegelen (Agarose NA, Pharmacia) und bei einer Stromstärke von 3,6-6 mV/cm in 1 × TAE-Puffer aufgetrennt. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente

umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts, d. h. kleine Fragmente wandern schneller als große.

Durch Zugabe von 1 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) konnte die DNA mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz im UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera fotografiert werden. Die Identifizierung von Banden zur anschließenden Aufreinigung erfolgte bei 366 nm. Als Größenstandard dienten  $\lambda$ /*EcoRI/HindIII*-Leiter (Appligene) und 100bp-Leiter (GIBCO-BRL)

1 × TAE-Puffer                      0,04 M Tris-Acetat, pH 8,0  
   0,001 M EDTA, pH 8,0

### **2.3.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Nach Auftrennung in einem präparativen Agarosegel wurden die gewünschten DNA-Fragmente ausgeschnitten und die DNA wurde mittels *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

### **2.3.10 Ligation**

Zur Insertion von MCP-3 in die parvoviralen Vektoren wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Verknüpfung von unterschiedlichen DNA-Molekülen fand in 10-20 µl mit 1U T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim, 5 U/µl) in dem von der Firma mitgelieferten Puffer statt. Der Ansatz wurde bei 14°C ü.N. inkubiert.

### **2.3.11 Sequenzierung mit radioaktiver Markierung**

Die Sequenzierung erfolgte gemäß der Didesoxymethode nach Sanger (1977). 1-5 µg Plasmid-DNA wurden durch Inkubation für 10 min mit 0,3 M NaOH denaturiert, dann mit 0,6 M K-Acetat, pH 5,2 neutralisiert und mit Ethanol gefällt. Zur Sequenzierung wurde das *T7-Sequencing Kit* (Pharmacia) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Herrn W. Weinig (DKFZ) hergestellt. Die Markierung erfolgte unter Einbau von [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP (1000 Ci/mmol, ICN). Die Reaktion lief nach Angaben des Herstellers, allerdings mit nur der Hälfte der angegebenen Substanzen.

Die Auftrennung der DNA nach Größe erfolgte in einem 6% (w/v) Polyacrylamidgel (nach Garoff und Ansorge, 1981) in einer Gelapparatur der Fa. Stratagene. Dazu wurde eine der Gelplatten mit 4 M NaOH angeätzt und die andere mit Repel-Silane ES (Pharmacia) silikonisiert. Für das Gel wurden Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, Biometra) und 7,3 M Harnstoff in  $0,5 \times$  TBE-Puffer bei  $50^\circ\text{C}$  gelöst. Dann wurden 0,5% APS (BioRad) zugegeben und die Polymerisation durch Zugabe von  $30 \mu\text{l}$  TEMED (BioRad) gestartet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Ansätze 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  denaturiert. Pro Spur wurden  $2,5 \mu\text{l}$  der Reaktion aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in  $0,5 \times$  TBE-Puffer als Laufpuffer bei  $50^\circ\text{C}$  und einer Spannung von 4,5 kV/m. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für zwei Stunden unter Vakuum getrocknet und auf einem Röntgenfilm (X-Omat AK, Kodak) 1-3 Tage bei Raumtemperatur exponiert. Die Sequenzierung der MCP-3-tragenden Klone wurde alle 6 bis 8 Monate wiederholt, um Mutationen ausschließen zu können.

Oligonukleotide:

MCP-3 seq.for (kodierender Strang)      5'GGTTTCTGGTTTGGTCCTAG'3

MCP-3 seq.rev (nicht-kodierender Strang) 5'CCCAAACCTCCAAAGCTTTG'3

1 x TBE-Puffer:                    90 mM Tris-HCl  
     90 mM Borsäure  
     2,5 mM EDTA, pH 8,0

### 2.3.12 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (Sonden) diente der Identifikation Membran-gebundener Virus-DNA (2.5.9). Die Markierung von 20-30 ng DNA erfolgte mit dem *Megaprime<sup>TM</sup> DNA labelling system* (Amersham) nach Angaben des Herstellers durch Einbau von [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP (3000 Ci/mmol, ICN). Als Sonde für rekombinante H-1-Viren diente das 567 bp-lange *NcoI*-Fragment aus pH1 $\Delta$ 800 und für MVMp-verwandte Viren das 411 bp-lange *PstI*-Fragment aus pMVMp $\Delta$ 400.

### **2.3.13 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*reversed transcriptase polymerase chain reaction*, RT-PCR)**

#### **2.3.13.1 RT-PCR zur Analyse der Genexpression**

Dieses Verfahren dient zur selektiven Anreicherung bestimmter RNA-Moleküle aus einem RNA-Gemisch. Dazu werden am Anfang die RNA-Moleküle durch das Enzym Reverse Transcriptase in cDNA umgeschrieben. Danach können über eine PCR-Reaktion (2.3.13.3) die gewünschten Sequenzen spezifisch amplifiziert werden. Die hohe Sensitivität dieser Methode erlaubt den Nachweis seltener mRNA-Moleküle bzw. die Verwendung von weniger als  $10^4$  Zellen als Ausgangsmaterial. So können auch mRNA-Moleküle in einem Gemisch verschiedener Zellpopulationen detektiert werden. Außerdem kann mit Hilfe der RT-PCR in ein und der selben Probe gleichzeitig die Expression einer Vielzahl von unterschiedlichen Genen untersucht werden, ohne jedes einzelne getrennt zu analysieren. Das Flußdiagramm (Abb. 2-1) zeigt den Ablauf der RT-PCR.

#### **2.3.13.2 RNA-Präparation und cDNA-Synthese**

Mit Hilfe dieser Methode wurde in RNA-Präparationen ausgehend von Tumorgewebe die Expression verschiedener Indikator- und Effektormoleküle unterschiedlicher Leukozyten, sowie die Expression der viral transduzierten Gene NS1 und MCP-3 untersucht. Zur Analyse des Melanomtumormodells wurden  $3 \times 10^5$  B78/H1-Zellen (2.4.1) in C57BL6-Mäuse (2.8.1) subkutan inokuliert. Sobald die entstandenen Tumoren eine Größe von  $2,5\text{-}3 \text{ mm}^3$  erreicht hatten, wurden 8 Tage lang MVMp-verwandte Viren täglich peritumoral injiziert (2.5.3), bevor die Tumoren entnommen wurden. Die Gesamtvirusdosis betrug  $2 \times 10^7$  infektiösen Viruseinheiten/Tier. Zur Untersuchung im HeLa-Zell/Nacktmaus-Tumormodell wurden  $5 \times 10^6$  präinfizierte HeLa-Zellen (2.5.8) in Nacktmäuse (2.8.1) injiziert, und nach drei Tagen wurden die Tumoren entnommen. Sofort nach Entnahme wurden die Tumoren in *TRIzol-Reagent* (GIBCO-BRL) gegeben und für 1 min in einem *Fastprep FP100-homogenizer* (SAVANT) homogenisiert. Gesamt-RNA (1  $\mu\text{g}$ ) wurde dann in cDNA umgeschrieben mit Hilfe des *Reverse Transcription System* (Promega) nach Angaben des Herstellers. Die cDNA-

Produkte wurden danach in einer 1:20 Verdünnung zur PCR-Amplifikation der gewünschten Sequenzen mit spezifischen Primern (2.3.13.3) eingesetzt.

### 2.3.13.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung und Modifikation von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Dabei werden je zwei Oligonukleotide verwendet, die nach Hitzedenaturierung der DNA bei 94°C mit der Zielsequenz hybridisieren (sog. *Annealing*). Der Komplementärstrang wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) meist bei 72°C synthetisiert. Die Temperatur zur Anlagerung der Primer ist abhängig von der Basenzusammensetzung, Länge der Oligonukleotide. Die Annealing-Temperatur liegt im typischen Fall 5°C unter dem  $T_M$ -Wert (Temperatur, bei der 50% der Stränge denaturiert sind) der verwendeten Primer. Als Faustregel gilt :  $T_M = (A+T) 2^\circ\text{C} + (G+C) 4^\circ\text{C}$  Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide und die Länge der PCR-Produkte waren wie folgt:

Name	$T_M$	Anzahl Zyklen	Produktlänge (bp)
$\beta$ -Aktin	60°C	35	489
CD40L	50°C	40	282
CD8	54°C	40	513
COX-2	53°C	40	309
CTLA-4	53°C	40	438
FasL	53°C	40	923
GranzymA	60°C	35	531
GranzymB	60°C	35	253
H-1/NS	60°C	35	515
IFN $\alpha$	53°C	40	162
IFN $\gamma$	60°C	40	237
IL-2	53°C	40	247
IL-12p40	53°C	40	313
iNOS	60°C	40	828
Nk1.1	60°C	40	576
MCP-3	58°C	35	338
MVM/NS	60°C	40	511
Perforin	60°C	40	486

In dieser Arbeit wurde das *Taq DNA Polymerase PCR Reagents* (Sigma) Kit nach Angaben des Herstellers verwendet, allerdings mit nur der Hälfte der Substanzen. Die Amplifikation

erfolgte in einem *PTC-200 Peletier Thermal Cycler* (MJ Research). Die verwendeten Oligonukleotide, die folgend aufgelistet sind, wurden von Herrn W. Weinig (DKFZ, Heidelberg) hergestellt.

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Referenz</b>
$\beta$ -actin for	ATGTTTGAGACCTTCAACAC	diese Arbeit
$\beta$ -actin rev	CACGTCACACTTCATGATCC	diese Arbeit
CD40L for	ATCTGTGCTTTTTGCTGTGT	Giese <i>et al.</i> , 2000
CD40L rev	TTACTGTTGGCTTCGCTT	Giese <i>et al.</i> , 2000
CD8 for	ATGCAGCCATGGCTCTGGCTGG	Gazzinelli <i>et al.</i> , 1993
CD8 rev	GACTTCAAAGAGTAACAGG	Gazzinelli <i>et al.</i> , 1993
COX-2 for	TTATGGTGAAACTCTGGACA	Giese <i>et al.</i> , 2000
COX-2 rev	AGTATGAGTCTGCTGGTTTG	Giese <i>et al.</i> , 2000
CTLA-4 for	ATTCACCATCACACAACACT	Giese <i>et al.</i> , 2000
CTLA-4 rev	GGGGCATTTCACATAGACC	Giese <i>et al.</i> , 2000
FasL for	CAAGGCTGTGAGAAGGAAACC	Lopez <i>et al.</i> , 1999
FasL rev	CCCATGATAAAGAATAGTAGA	Lopez <i>et al.</i> , 1999
GranzymeA for	CCTGAAGGAGGCTGTGAAAGAATC	Tannenbaum <i>et al.</i> , 1996
GranzymeA rev	CCCTGCACAAATCATGTTTAGTCC	Tannenbaum <i>et al.</i> , 1996
GranzymeB for	ACTCAAACACGCTACAAGA	Tannenbaum <i>et al.</i> , 1996
GranzymeB rev	ATCCAGGATAAGAAACTCG	Tannenbaum <i>et al.</i> , 1996
H-1/NSRT for	CCAGAACACACTCAACCAAT	diese Arbeit
H-1/NSRT rev	CAAGGTCAGCTCCTCGTTGAAGTC	diese Arbeit
IFN $\alpha$ for	TCATCGTCAGAAGGGATGAA	Giese <i>et al.</i> , 2000
IFN $\alpha$ rev	TCCTGGAGACATTGGCCAGT	Giese <i>et al.</i> , 2000
IFN $\gamma$ for	AACGCTACACACTGCATCTTGG	Gazzinelli <i>et al.</i> , 1993
IFN $\gamma$ rev	GACTTCAAAGAGTAACAGG	Gazzinelli <i>et al.</i> , 1993
IL-2 for	GAGTCAAATCCAGAACATGCC	Gazzinelli <i>et al.</i> , 1993
IL-2 rev	TCCACTTCAAGCTCTACAG	Gazzinelli <i>et al.</i> , 1993
IL-12p40 for	AGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG	Giese <i>et al.</i> , 2000
IL-12p40 rev	CTTCATCTGCAAGTTCTTGGGC	Giese <i>et al.</i> , 2000
INOS for	CATGGCTTGCCCCTGGAAGTTTCTCTTCAAAG	Gazzinelli <i>et al.</i> , 1993
INOS rev	GCAGCATCCCCTCTGATGGTGCCATCG	Gazzinelli <i>et al.</i> , 1993
NK1.1 for	CTACCTCGGTTTAAAGCCACC	Giese <i>et al.</i> , 2000
NK1.1 rev	GAAGCACAGCTCTCAGGATCAC	Giese <i>et al.</i> , 2000
MCP-3 RT-PCR for	GGAAGCCCATGCCCTCACCC	diese Arbeit
MCP-3 RT-PCR rev	CAGTCATGAATGTTCAAAGC	diese Arbeit
MVM/NSRT for	ACGCTCACCATTCACGACACCGAAA	Haag, Dissertation 1999
MVM/NSRT rev	ATCATAGGCCTCGTCGTGCTCTTTG	Haag, Dissertation 1999
Perforin for	CAGAATGCAAGCAGAAGCACAAG	Tannenbaum <i>et al.</i> , 1996
Perforin rev	GGTGGAGTGGAGGTTTTTGTACC	Tannenbaum <i>et al.</i> , 1996

Die meisten Primer waren so ausgewählt, daß die Amplifikation von cDNA und Verunreinigungen mit genomischer DNA unterschiedlich lange PCR-Produkte ergaben (z. B.

IL-2: Bindung der Primer an Exon 1 und 4; genomisch: 4534 bp, cDNA: 307 bp). Da im Falle des MCP-3 nicht zwischen der parvoviral eingebrachten und der neu synthetisierten cDNA differenziert werden konnte, wurde zum Ausschluß einer DNA-Kontamination bei der RNA-Präparation Gesamt-RNA-Lösung zusätzlich in die PCR eingesetzt.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Zur Vermehrung wurden die Zellen zweimal pro Woche mit Trypsin-Lösung (GIBCO-BRL) von der Kulturschale (Nunc) abgelöst und im Verhältnis 1:5 bis 1:50 in frischem Medium ausgesät. Allen Medien (Sigma) wurde 2 mM L-Glutamin (GIBCO-BRL), 100 µg/ml Pencillin/Streptomycin (GIBCO-BRL) und fötales Kälberserum (FKS, GIBCO-BRL) zugesetzt (Komplett-Medium).

<b>Zelllinie</b>	<b>Medien und Zusätze</b>	<b>Referenz</b>
A9, murin, Bindegewebszelllinie	MEM, 5% FKS	Tattersall & Bratton, 1983
B78/H1, murin Melanomzelllinie	DMEM, 10% FKS	Lollini <i>et al.</i> , 1990
HeLa, human Zervixkarzinomzelllinie	DMEM, 10% FKS	Kennedy <i>et al.</i> , 1995
NB-E, human Nierenzelllinie	MEM, 5% FKS	Cotmore <i>et al.</i> , 1995
293T, human Nierenzelllinie	DMEM, 10% FKS	Krauskopf & Aloni, 1994

## 2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Säugetierzellen

Zum Einfrieren wurden  $1-5 \times 10^6$  Zellen pelletiert (5 min bei 1200 rpm), in 1 ml Einfriermedium (50% Komplett-Medium, 40% FKS, 10% DMSO) aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Die Einfriergefäße wurden in einem Isopropanol-isolierten Behälter innerhalb von 24 h auf  $-80^\circ\text{C}$  abgekühlt und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Eingefrorene Zellen wurden schnell im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut, in 10 ml Medium aufgenommen, pelletiert (5 min, 1200 rpm), in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturschale überführt.

## 2.4.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Ein Aliquot der zu untersuchenden Zellsuspension wurde mit Trypanblau-Lösung (Sigma) zu gleichen Teilen vermischt, auf das Zählfeld einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Zellen, die infolge defekter Membranen den Farbstoff aufgenommen hatten und im mikroskopischen Bild daher blau erschienen, wurden als tot gewertet und nicht berücksichtigt. Nach Auszählung von 4 Großquadraten des Zählkreuzes ergab sich die Zellkonzentration folgendermaßen:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittlere Anzahl pro Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnung mit Trypanblau}$$

## 2.4.4 Färbung adhärenter Zellen mit Kristall-Violett

Mit Hilfe dieser Färbung kann ein zytopathischer Effekt auf Zellkulturen schnell makroskopisch sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums 20 min bei  $4^\circ\text{C}$  in eiskalter Essigsäure/Ethanol-Lösung (v/v 1: 3) fixiert und danach für 20 min mit Ethanol (70%) überschichtet. Nach vorsichtigem Spülen mit Wasser wurden die Zellen für 1 h mit Kristall-Violett-Lösung (Sigma) bei RT gefärbt und nach Auswaschen ungebundene Färbelösung beurteilt.

## 2.4.5 Transfektion von Plasmid-DNA

293T-Zellen wurden am Vorabend der Transfektion in einer Dichte von  $2 \times 10^6/10\text{cm}$ -Schale ausgesät. Für die Transfektion wurden pro Schale 6  $\mu\text{g}$  des rekombinanten viralen Genoms

und 12 µg des Kapsidproteingene-tragenden Helfer-Plasmids in einer CaCl<sub>2</sub>-Lösung (250 mM in H<sub>2</sub>O) auf ein Volumen von 450 µl eingestellt und unter Schütteln das gleiche Volumen 2 x HBSS-Puffer zugegeben. Zur Bildung der Calciumphosphat-Präzipitate wurde der Ansatz 15 min bei RT inkubiert, dann vorsichtig auf die Zellen pipettiert und durch Schwenken im Medium gleichmäßig verteilt.

2 x HBSS-Puffer:     280 mM NaCl  
                          50 mM Hepes  
                          1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                          pH 7,05 (mit NaOH), sterilfiltriert

## 2.5 Virologische Methoden

### 2.5.1 Produktion rekombinanter Viren

Zur Herstellung rekombinanter Viren wurden 293T-Zellen, wie unter 2.4.5 angegeben, ausgesät und transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen im Kulturmedium mit einem Gummischaber von der Schale gelöst und in einem 50 ml-Falcongefäß pelletiert (10 min bei 1000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet von 10 Kulturschalen in 6 ml VTE-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch 3 Frier/Tau-Zyklen bei -20°C/RT aufgeschlossen. Grobe Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 15 min abgetrennt, während kleinere Zellfragmente und leere Kapside im Fall der MVMP-verwandten Viren über einen Iodixanol-Gradienten (2.5.2) oder im Fall der H-1-rekombinanten Viren durch CsCl-Gradienten (2.5.4) abgetrennt wurden.

VTE:                50 mM Tris/HCl, pH 8,7  
                          0,5 mM EDTA

### 2.5.2 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Dazu wurden 5 ml CsCl-Lösung der Dichte 1,4 g/cm<sup>2</sup> mit 1 ml Saccharose-Lösung/VTE und 5 ml der Viruspräparation (2.5.1) überschichtet und dann bei 39000 rpm (TST4114-Rotor) und 10°C für 24 h zentrifugiert. Danach wurde der Gradient fraktioniert. Die Virusenthaltenden Fraktionen wurden durch Refraktionmessung (2.5.3) und Hämagglutinationstest

(2.5.6) identifiziert, vereinigt und dann über Nacht gegen VTE dialysiert oder über eine Sephadex-G-20-Säule aufgereinigt (2.5.7) und danach titriert (2.5.9).

### 2.5.3 Dichtebestimmung durch Refraktionsmessung

Hierbei ist die Ablenkung des einfallenden Lichtes ein Maß für die Brechungseigenschaften einer Lösung in einem Refraktometer. Aus dem Refraktionsindex wird die Dichte der Lösung berechnet nach der Formel:

$$\text{Dichte } \rho = (10,5416 \times n \text{ (gemessener Index)} - 13,059) \text{ kg/l}$$

Die Eichkurve wurde von A. Haag (Dissertation, 1999) übernommen.

### 2.5.4 Hämagglutinationstest

Die verwendeten Parvoviren sind in der Lage, Meerschweinchen-Erythrozyten zu binden bzw. zu vernetzen. Dadurch sammeln sich diese in Mikrotiterplatten mit V-förmigem Bodenprofil nicht am Boden ab, sondern bilden eine diffuse Schicht.

Für den Test wurden 2 µl der Gradientenfraction (2.5.4) zusammen mit 48 µl 1 x PBS in die oberste Vertiefung der Mikrotiterplatte vorgelegt und in die darauffolgenden Reihen jeweils 25 µl 1 x PBS. Mit einer 12-Kanalpipette wurden nun immer 1:2 Verdünnungen durch Übertragung von jeweils 25 µl hergestellt. Allen Proben wurde dann 25 µl einer 2%-Erythrozyten-suspension (in Alzever's Lösung) zugegeben und 1h bei 4°C inkubiert.

Alzever's Lösung:     60 mM Saccharose  
                          38 mM Na-Citrat  
                          72 mM NaCl  
                          3 mM Citronensäure

Phosphatgepufferte 0,1 M Kochsalzlösung (1 x PBS):     2,68 mM KCl  
  1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
  100 mM NaCl  
  8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
  pH 7,2-7,4

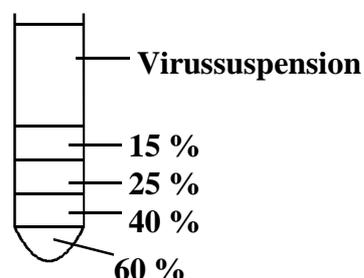
### 2.5.5 Virusaufreinigung über Sephadexsäulen

Alternativ zur Dialyse wurde CsCl über Sephadex-G-20-Säulen (Amersham) nach Angaben des Herstellers aus Viruspräparationen entfernt. Die dreidimensionale Matrix der Säulen läßt größere Partikel, wie z.B. Viren, schneller passieren als kleinere, wie z. B. Ionen. Die Viren wurden mit VTE eluiert.

### 2.5.6 Dichtezentrifugation über Iodixanolgradient

nach Zolotukhin *et al.* 1998)

Zur Aufreinigung rekombinanter MVMP-Viren wurde ein diskontinuierlicher Stufengradient durch Unterschichten vorgefertigt, der aus jeweils 1,5 ml verschiedener Lösungen aufsteigender Konzentrationen von Iodixanol (5,5'[(2-hydroxyl-1-3-propanediyl)-bis(acetylamino)] bis [N,N'-bis(2,3dihydroxylpropyl-2,4,6-triiodo-1,3-benzenecarboxamide] Sigma) bestand und der dann mit Virussuspension (2.5.2) überschichtet wurde. Die Iodixanollösungen wurden in 1 x PBS mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 2,5 mM KCl angesetzt. Der 15%igen Lösung wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1M zugegeben, was eine Aggregation der Partikel verhindert. Die Gradienten wurden 4,5 h bei 40000 rpm (TST41.14-Rotor, Beckmann) und 4°C zentrifugiert. Volle Partikel sammeln sich aufgrund ihrer Dichte in der 40%-Phase, während leere Kapside und Zellreste in der darüberliegenden 25%-Phase zu finden sind. Durch Zugabe von Phenol-Rot (0,01 µg/ml) zur 60%- und 25%-Iodixanollösung können die einzelnen Schichten unterschieden und die gewünschte 40%-Phase selektiv mit einer sterilen Spritze entnommen werden. Die Virussuspension wurde bei 4°C gelagert.



**Abb. 2-2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Iodixanolgradienten**

Die Iodixanollösungen wurden in PBS-MK (1 x PBS, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM KCl) in den angegebenen Konzentrationen (15%, 25%, 40%, 60%) angesetzt. Der Gradient wurde durch Unterschichten von 1,5 ml der einzelnen Iodixanollösungen unterschiedlicher Konzentration vorgefertigt und dann mit 6,5 ml virushaltigem Zellextrakt überschichtet.

### 2.5.7 Virus-Konzentrierung

Zur direkten Injektion der MVMP-verbunden Viren in Mäuse mußte die aufgereinigte Virus-Präparation zum einen konzentriert, zum anderen aus der Iodixanollösung in 1 x PBS-Puffer (GIBCO BRL) überführt werden, um mögliche Auswirkungen des Iodixanols auf die Immunantwort der Mäuse zu verhindern. Dazu wurde ein Gradient aus jeweils 450 µl einer 30% und einer 50% Saccharoselösung hergestellt und mit Virussuspension überschichtet, wie in Abb. 2-3 dargestellt. Die Partikel wurden bei 45000 rpm (SW 60-Rotor, Beckmann) für 3 h pelletiert. Das Pellet wurde dann in 1 x PBS resuspendiert und bei 4°C gelagert. Für den Gradienten wurden 450µl frisch angesetzter 30%ige und 50%ige Saccharoselösungen durch Unterschichten vorgelegt und dann mit Virussuspension überschichtet. Die Pelletierung der Viren erfolgte bei 45000 rpm für 3 h.

### 2.5.8 Uranylazetat-Kontrastfärbung

Zur Kontrastierung von Viruspartikeln für Elektronenmikroskopaufnahmen wurden 5 µl der zu untersuchenden Virussuspension auf ein mit Kohle bedampftes Kupfergitter (hergestellt von B. Hub, DKFZ) gegeben. Nach 2 min, in denen sich die Viren auf dem Gitter absetzten, wurde die Flüssigkeit abgesaugt und das Gitter mit 8 µl 2%iger wässriger Uranylazetatlösung überschichtet. Überschüssige Lösung wurde nach 5 min abgesaugt, das Gitter an der Luft getrocknet und in das Elektronenmikroskop eingeschleust.

### 2.5.9 Infektion

Bei der Verwendung von Virussuspensionen bekannten Titers zur Infektion von Zielzellen wurde ein bestimmtes Verhältnis von Virus zu Zelle verwendet. Diese MOI (*multiplicity of infection*) wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{MOI} = \frac{\text{ml Virussuspension} \times \text{Virustiter/ml}}{\text{Zellzahl}}$$

Zur Infektion wurde die entsprechende Virussuspension so in serumfreiem DMEM-Medium verdünnt, dass das Inokulum für eine 6cm-Schale bei 0,4 ml und für eine 10cm-Schale bei 1 ml lag. Um einen Einfluß der Virussuspension auf die Zellen zu vermeiden, lag die

Verdünnung aber mindestens bei 1:3 (v/v). Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und das Inokulum zugegeben. Dann wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert und die Schalen im Abstand von 10 min leicht geschwenkt, um die Virussuspension wieder zu verteilen und eine gleichmäßige Infektion zu gewährleisten. Um einen Effekt des Puffers, in dem die Viren aufbewahrt waren, abschätzen zu können, wurden Zellen „mock“ infiziert, d. h. anstelle einer Virussuspension wurden Zellen mit virusfreiem Puffer ohne Virus behandelt.

### **2.5.10 Filterhybridisierungstest zur Titration rekombinanter Viren**

Das Genom rekombinanter Viren kann replizieren, aber es können keine infektiösen Nachkommen gebildet werden. Deshalb bleibt eine Infektion auf die einzelne Zelle beschränkt. Bei diesem Test wird nach Infektion mit absteigender Verdünnung der Virus-Lösung die in den Zellen enthaltene DNA an Membranen gebunden und dann in einem Southern-Blot nachgewiesen.

Für die Titration H-1-verwandter Viren wurden  $5 \times 10^5$  NB-E-Zellen als Indikatorzellen und für rekombinante MVMp-Viren  $2,5 \times 10^5$  A9-Zellen pro 6cm Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das zu titrierende Virus in serumfreiem DMEM-Medium verdünnt. Normalerweise wurden Verdünnungsstufen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  gewählt. Jeweils 2 Schalen wurden mit 0,4 ml der einzelnen Verdünnungen infiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen durch Auflegen an Nitrozellulosemembranen ( $\emptyset$  50 mm, Schleicher & Schuell) gebunden. Diese Membranen wurden dann für jeweils 10 min auf Whatman-Papier (3MM, Schleicher und Schuell) gelegt, das mit Denaturierungs- bzw. Neutralisierungspuffer getränkt war. Die DNA wurde durch Backen bei 80°C für 2 h an die Membran gebunden. Dann wurden die Membranen in 50-100 ml frisch hergestellter Prähybridisierungs-Lösung ü.N. im Wasserbad bei 65°C geschwenkt. Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde (2.3.12) in 50-100 ml frischen Prähybridisierungspuffer gegeben, und die Membranen darin ü.N. im Wasserbad bei 65°C geschwenkt. Die so hybridisierten Membranen wurden zweimal mit  $3 \times$  SSC/1% SDS und zweimal mit  $0,3 \times$  SSC/1% SDS im Wasserbad bei 65°C gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen. Die Membranen wurden auf einem Röntgenfilm (X-Omat AR, Kodak) mit einer Verstärkerfolie einen Tag bei -80°C exponiert. Bei Bedarf wurde die Exposition für eine längere Zeit wiederholt.



Der Virustiter in *plaque forming units* (pfu) wird berechnet nach:

$$\text{Titer (pfu/ml)} = \frac{\text{mittlere Anzahl Plaques}}{\text{Verdünnung}} \times 7,5$$

Überschichtungsmedium: 100 ml 2 x MEM (mit 10% FCS, 2% NEAA, 2% Glutamin, 2% Gentamycin, GIBCO-BRL)  
75 ml Bacto-Agar (in H<sub>2</sub>O)

Neutral-Rot-Medium: 22,5 ml 2 x PBS  
3 ml Neutral-Rot-Lösung (0,33% in H<sub>2</sub>O, steril)  
22,5 ml Bacto-Agar (2% in LB-Medium)

### 2.5.12 Analyse der Infektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop

Die Anzahl infizierter Zellen wurde mit der Anzahl GFP-exprimierender Zellen nach hH1/GFP-Infektion gleichgesetzt. Dazu wurden  $1,5 \times 10^5$  HeLa-Zellen in einer 6cm-Schale mit einer MOI von 1 RU/Zelle mit hH1/GFP infiziert. Von Tag 1 bis Tag 5 nach Infektion (*post infection*, p.i.) wurden von den Zellen Fotos (40-fach-Objektiv) bei Durchlicht und mit Fluoreszenzlicht von 2 unterschiedlichen Feldern der jeweiligen Triplikate aufgenommen. Die Gesamtanzahl der Zellen wurde im Durchlicht in einem Feld und die GFP-positiver Zellen im Fluoreszenzlicht bestimmt. Daraus wurde der Prozentsatz infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl ermittelt.

### 2.5.13 Bestimmung der MCP-3-Produktion *in vitro*

Um die MCP-3-Expression und -Sekretion zu bestimmen, wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 6cm-Schalen mit hH1/MCP-3 oder MVMp/MCP-3 in der gewünschten MOI infiziert. Zur Bestimmung der akkumulierten Menge des Chemokins wurde 1-6 Tage nach Infektion das Zellkulturmedium von Triplikaten bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Für eine Analyse der täglich sekretierten Menge des Proteins wurde jeden Tag das Zellkulturmedium eingefroren und durch frisches Medium ersetzt. Die MCP-3-Bestimmung erfolgte mittels eines Sandwich-ELISAs im Labor von Prof. Van Damme (Katholieke Universiteit Leuven, Rega Institute, Leuven/Belgien).

## 2.6 Durchflußzytometrie (FACS)

Die Durchflußzytometrie (FACS: *fluorescence activated cell sorter*, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung) dient der Zählung und Charakterisierung von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Grundsätzlich können alle Merkmale eines Partikels, die sich über Lichtbeugung oder -streuung, sowie Fluoreszenz charakterisieren lassen, zur durchflußzytometrischen Analyse herangezogen werden. Lichtbeugung und -streuung erlauben eine Charakterisierung der Größe sowie der Binnenstruktur eines Partikels, z. B. von Zellen oder Zellorganellen, während durch Anfärben definierter Strukturen mit farbstoffmarkierten monoklonalen Antikörpern eine weitere Differenzierung möglich ist.

### 2.6.1 Bestimmung der Infektionseffizienz mit Hilfe der Durchflußzytometrie

Hier diente die Anzahl GFP-exprimierender Zellen als Maß für die Zahl infizierter Zellen. Dazu wurden  $4 \times 10^4$  B78/H1-Zellen in einer 6cm-Schale mit verschiedener MOI mit MVMp/GFP infiziert. 1-3 Tage p.i. wurden die Zellen trypsiniert, mit FKS-haltigem Medium das Trypsin neutralisiert und dann mit 5 ml FACS-Medium (1 x PBS, 2% FKS) gewaschen. Die Zellpellets wurden in 1 ml FACS-Medium aufgenommen und die Anzahl GFP-positiver Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen in einem FACS-Gerät (*FACSort<sup>TM</sup>*, Becton Dickenson) mit dem Programm *Cell Quest<sup>TM</sup>* bestimmt.

### 2.6.2 Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen mittels FACS-Analyse

Die FACS-Analyse diente hier zu Identifizierung und Zählung von MHC-I-exprimierenden B78/H1-Melanomzellen nach parvoviraler Infektion. Dazu wurden B78/H1-Zellen, 2 Tage nach Infektion mit einer MOI von 10 mit MVMp, MVMp $\Delta$ 400 oder MVMp/MCP-3, trypsiniert, in 5 ml FACS-Medium aufgenommen und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert. Danach wurden die Zellen für 20 min mit Blockierlösung auf Eis inkubiert und nach Zugabe des FITC-konjugierten monoklonalen anti-H-2K<sup>b</sup> IgG2b-Antikörpers (Pharmingen) durch weitere 30-

minütige Inkubation auf Eis markiert. Vor der Analyse im FACS-Gerät wurde die Zellsuspension mit 5 ml FACS-Medium aufgefüllt, bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml FACS-Medium resuspendiert. Die Anzahl Antikörper-bindender Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl wurde wie zuvor beschrieben bestimmt.

## **2.7 Protein-Präparation und Analyse**

### **2.7.1 Proteinextrakte aus Säugetierzellen**

Zur Untersuchung der Expression der parvoviralen Proteine NS1 und NS2 wurden  $2 \times 10^5$  HeLa- bzw. A9-Zellen pro 6cm-Schale mit einer MOI von 1, sowie B78/H1-Zellen mit einer MOI von 2 RU/Zelle mit den verschiedenen rekombinanten und Wildtyp-Viren infiziert. Nach 24 h bzw. 48 h wurden die Zellen im Kulturmedium von der Kulturschale abgeschabt und durch Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm pelletiert. Das Pellet von einer Schale wurde in 100  $\mu$ l heißem Lyse-Puffer aufgenommen, für 5 min bei 95°C unter Schütteln inkubiert und bis zur Proteinbestimmung (2.7.2) auf Eis gekühlt.

Lyse-Puffer: 58,8 mM Tris/HCl, pH 6,7  
1% SDS  
1  $\mu$ M Pestatin (Sigma)  
10  $\mu$ M PMSF (Sigma)

### **2.7.2 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford mit dem Proteinassay-Farbreagenz von BioRad durchgeführt. Dazu wurden 2-10  $\mu$ l Probe mit 1 ml verdünntem Farbreagenz (1:5 in H<sub>2</sub>O) gemischt und 5-10 min bei RT inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei 595 nm im Photometer gemessen und die Proteinkonzentration der Proben durch Vergleich mit der zuvor durchgeführten Standardreihe betimmt.

### 2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid(PAA)-Gele nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Die Sammelgele enthielten dabei 5% (w/v) Polyacrylamid und die Trenngele 10%. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Das Trenngel wurde sofort mit 0,5% (w/v) SDS überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde die SDS-Lösung entfernt und mit einem Sammelgel überschichtet. Sofort nach dem Gießen wurde ein Gelkamm eingeschoben, so daß nach der Polymerisation des Gels 10 Probestaschen entstanden. Das Gel wurde in die Gelkammer eingespannt und mit Elektrodenpuffer überschichtet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:1 mit 2 x Ladepuffer versetzt und durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Nach Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese ü.N. bei einer Stromstärke von 10 mA pro Gel. Als Protein-Molekulargewichtsstandard diente der *Rainbow*<sup>TM</sup>-Marker (Amersham).

<u>Trenngel</u>	7,5 ml unterer Gelpuffer 10 ml 30% Acrylamid (BioRad) 11,9 ml H <sub>2</sub> O 0,3 ml 10% APS (BioRad) 12 µl TEMED (BioRad)	<u>Unterer Gelpuffer</u>	1,5 M Tris 1% (w/v) SDS pH 8,8
<u>Sammelgel</u>	2,5 ml oberer Gelpuffer 3 ml 30% Acrylamid 14,2 ml H <sub>2</sub> O 0,2 ml 10% APS 2 µl TEMED	<u>Oberer Gelpuffer</u>	0,5 M Tris 0,4% (w/v) SDS pH 6,8
<u>Elektrodenpuffer:</u>	25 mM Tris 192 mM (w/v) Glycin 0,1% (w/v) SDS	<u>Ladepuffer:</u>	500 mM Tris/HCl, pH 6,7 5% SDS 2% β-Mercaptoethanol 20% Glycerol 0,1% Bromphenolblau(Sigma)

### 2.7.4 Western-Blot-Analyse

Der Transfer der bei einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose (Schleicher und Schuell) erfolgte nach dem elektrophoretischen *Tank-Blotting*-Verfahren. Dazu wurden Whatmann-Papier (3MM, Schleicher & Schuell), die Nitrozellulose und das Gel nacheinander

luftblasenfrei übereinandergelegt. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer für 2 h bei 400 mA/65 V.

Transferpuffer:        50 mM Tris  
                              380 mM Glycin  
                              0,1% SDS  
                              20% Methanol

Um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen, wurden die Gele nach dem Transfer mit Coomassie-Lösung für 10 min unter Schütteln angefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde nach mehrfachem Wechsel der Lösung ü. N. mit Entfärbelösung entfernt.

Coomassie-Lösung:        0,1% Coomassie-Brilliantblue G250 (BioRad)  
                                     25% Methanol  
                                     10% Essigsäure

Entfärbelösung:        25% Methanol  
                                     10% Essigsäure

Die Nitrozellulosemembran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT in Blockierlösung geschwenkt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (SP7 für NS1, polyklonal, Kaninchen, Haag *et al.*, 2000) erfolgte bei 4°C ü.N. in Blockierlösung in einer 1:2000-Verdünnung. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 20 min mit 1 x PBS / 0,5% Tween 20 wurde der zweite, Peroxidase-gekoppelte Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-HRP, BioRad, 1:10000-Verdünnung in Blockierlösung) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 20 min mit 1 x PBS / 0,5% Tween 20 gewaschen, bevor eine *enhanced-chemiluminescence* (ECL)-Detektion mit dem ECL-Kit von Amersham nach Angaben des Herstellers erfolgte. Durch unterschiedlich lange Expositionszeiten (30 sec bis 5 min) der Filter auf Röntgenfilme (X-Omat AR, Kodak) wurden die durch die Antikörper markierten Proteinbanden sichtbar gemacht.

Blockierlösung:        10% Trockenmilch (Regilait)  
                                     0,5% Tween 20 (Sigma)  
                                     in 1 x PBS

## 2.8 Tierexperimentelle Methoden

### 2.8.1 Versuchstiere

BALB/c, C57BL6 und C57BL6 *nu/nu*-Mäuse wurden von der Firma Charles River bezogen, sowie Nacktmäuse *nu/nu* vom Stamm „Swiss CD1“ von der Firma Iffa Credo (L'Arbrèsle, Frankreich). Die 4–6 Wochen alten Weibchen wurden in Gruppen von höchstens 5 Tieren in Isolatoren bei 21-24°C, 40-60 % Luftfeuchtigkeit und 12-15 Luftwechseln je Stunde gehalten. Manipulationen an Tieren wurden in S2-Werkbänken durchgeführt. Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation.

### 2.8.2 Induktion von Tumoren mit *in vitro* infizierten Zellen

Am Vortag wurden Zellen in 10cm-Schalen so ausgesät, dass sie für den Versuch subkonfluent zur Verfügung standen. Um die genaue Zellzahl am Tag des Versuchs zu bestimmen, wurden zwei Schalen ausgezählt. Die Virus-Lösung wurde dann so in serumfreiem Medium verdünnt, dass die der MOI entsprechende Menge pro Schale in einem Inokulumvolumen von 1 ml vorlag. Die Zellen wurden infiziert und 5 h später trypsiniert. Das Trypsin wurde mit serumhaltigem Kulturmedium neutralisiert, und die Zellen wurden erneut gezählt. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1 x Hank's-Puffer bzw. 1 x PBS-Puffer gewaschen und auf die gewünschte Zellzahl in 100 µl eingestellt (Injektionsvolumen pro Tier). Die Zellen wurden subcutan im Bereich der rechten Schulter injiziert. Für HeLa-Zellen lag die Konzentration in der Regel bei  $2 \times 10^6$  Zellen/Tier, bei B78/H1- und RENCA-Zellen bei  $3 \times 10^5$  Zellen/Tier. Nach der Injektion der Tiere wurden 100 µl der verbliebenden Zellen wieder in eine Kulturschalen ausgesät und gezählt, um die Anzahl vitaler Zellen nach Injektion zu überprüfen. Außerdem konnte eine mögliche Kontamination der Zellen bei längerer Kultivierung ausgeschlossen werden. Zudem wurden Aliquots des Mediums dieser Zellen eingefroren, um die Fähigkeit der Zellen zur MCP-3-Expression *in vitro* zu überprüfen.

### 2.8.3 Bestimmung des Tumolvolumens

Zur Erfassung des Tumorwachstums wurden 3 bis 5 mal wöchentlich Länge, Breite und Höhe der Tumore mit einer Schieblehre gemessen. Das Tumolvolumen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Tumolvolumen } V = \pi/6 \times \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe}$$

Aus ethischen Gründen wurden Tiere bei einer Tumorgröße von 1,2-2,0 cm<sup>3</sup> getötet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der zweifaktoriellen ANOVA-Analyse (*analysis of variances*) mit Hilfe von Herrn Dr. W. Rittgen (Biostatistik, DKFZ).

### 2.8.4 Infektion etablierter Tumore

Tumore wurden durch subkutane Injektion von  $3 \times 10^5$  B78/H1-Zellen induziert. Sobald die Tumore einen Durchmesser von 2-2,5 mm erreicht hatten, wurde 3 x wöchentlich oder bei einem anderen Versuch täglich das Tumolvolumen bestimmt und 100 µl aufgereinigte, konzentrierte Virussuspension (2.5.5) direkt neben oder unter den Tumor injiziert. Zur statistischen Untersuchung des Tumorwachstums wurde der parameterfreie Wilcoxon-Rangsummentest verwendet.

### 2.8.5 Gewinnung von Blutserum

Unmittelbar nach dem Tod des Tieres wurde Blut durch Herzpunktion entnommen. Zur Gerinnung wurde das Blut 1 h bei RT inkubiert und das Koagulat durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min vom Serum-Überstand getrennt. Das Serum wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

### 2.8.6 Tumor- und Organ-Entnahme

Sofort nach Tod des Tieres wurden Tumore und Organe präpariert und entweder für histologische Untersuchungen in 4%iger Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert oder für

Immunhistochemie-Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur RT-PCR-Analyse und zur MCP-3-Bestimmung *in vivo* wurden frische Tumorpräparate direkt weiterverarbeitet.

### **2.8.7 MCP-3-Proteinbestimmung aus Tumorgewebe**

FrISCHE Tumorgewebestücke von ca. 100 mg wurden auf Eis in einem Homogenisator (Typ „Douncer“) in 1 ml 1 x PBS zerkleinert und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Zur Inaktivierung von Proteasen wurden PMSF (100 µM) und Aprotinin (10 µg/ml) zugesetzt. Das Homogenisat wurde 3 x 10 sec sonifiziert und Bindegewebsstücke durch Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm abgetrennt. Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

### **2.8.8 Bestimmung Makrophagen-vermittelter Zytotoxizität *in vitro***

Hier sollte untersucht werden, ob Makrophagen *in vitro* durch Zugabe von MCP-3 in ihr Kulturmedium zur Abtötung von Tumorzellen aktiviert werden können. Dazu wurden murine peritoneale Exsudatmakrophagen (*peritoneal exudate macrophages* PEM) kultiviert in Gegenwart von MCP-3 im Kulturmedium. Danach wurden Tumorzellen dazugegeben und die Lyse der Zielzellen durch den Nachweis freigesetzter Lactatdehydrogenase (LDH) ermittelt. LDH ist ein stabiles Enzym im Zytoplasma der Zellen, das bei Lyse der Zellen proportional zur Anzahl gestorbener Zellen in den Kulturüberstand übergeht. Die LDH im Kulturmedium wurde durch die enzymatische Umsetzung eines Substrats nachgewiesen. Die Menge des entstehenden Produkts wurde photometrisch bei 490 nm bestimmt.

Zur Ernte peritonealer Makrophagen durch eine sog. *Lavage* wurde bei Nacktmäusen nach zervikaler Dislokation unter sterilen Bedingungen das Peritoneum gut sichtbar freigelegt. Danach wurden 5 ml PBS (GIBCO-BRL) langsam in die Bauchhöhle injiziert, der Bauchraum leicht massiert, bevor die Flüssigkeit mit einer neuen Spritze wieder entnommen wurde. Der Anteil der Makrophagen in dieser Suspension wurde ermittelt, indem 50 µl der Zellsuspension auf einem Objektträger verteilt wurden und der Ausstrich mit Hilfe des *Diff-Quick-Kit* (Dade-Behring) gefärbt wurde. Die Zellen wurden bei 4°C für 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 3 ml DMEM (10% FKS, Glutamin und Antibiotika) auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Danach wurde in absteigender Konzentration von  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$  und  $1,25 \times 10^4$  PEM in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Nach

2,5 h wurden die Zellen gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Die Makrophagen wurden nun in Gegenwart von Kulturüberständen hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Zellen bzw. von Kontrollmedium hH1Δ800-infizierter Zellen kultiviert. Dieses Medium enthielt 40 ng MCP-3, wie zuvor mittels ELISA (2.5.12) bestimmt worden war. Nach 48 h Inkubation wurde das Medium entfernt und durch Zugabe von  $10^3$  HeLa-zellen in 100  $\mu$ l DMEM ersetzt. Nach 16 h Inkubation der Effektorzellen und Zielzellen in einem Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 100:1, 50:1, 25:1 und 12,5:1 wurde die Zytolyse der Zielzellen durch Bestimmung der LDH-Menge im Kulturmedium mit Hilfe des *CytoTox 96 kit* (Promega) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Kontrollen wurden in Triplikaten bestimmt, während die Makrophagen-vermittelte Zytotoxizität in sieben Proben parallel bestimmt wurde. Der Anteil der spezifischen Lyse wurde, wie vom Hersteller angegeben, nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{\text{OD}_{\text{spontan}} (\text{Probe}) - \text{OD}_{\text{spontan}} (\text{Effektoren}) - \text{OD}_{\text{spontan}} (\text{Zielzellen})}{\text{OD}_{\text{maximal}} (\text{Zielzellen}) - \text{OD}_{\text{spontan}} (\text{Zielzellen})} \times 100$$

## 2.8.9 Induktion und Bestimmung der Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) töten Zielzellen auf der Basis von Zelloberflächen-Antigenerkennung. Bei dem  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest werden radioaktiv markierte Zielzellen von zuvor *in vitro* restimulierten CTLs erkannt und lysiert. Die dabei in den Überstand abgegebene Radioaktivität kann bestimmt werden und dient als Maß für die Aktivität der CTLs oder Effektorzellen.

### 2.8.9.1 Stimulierung von Milzellsuspension *in vitro*

Bei C57BL/6-Mäusen, die nach Injektion von MVMp/MCP-3 infizierten B78/H1-Zellen keine Tumorentstehung zeigten und auch nach erneuter Inokulation von B78/H1-Zellen keine Tumore entwickelten, wurde die CTL-abhängige Immunantwort mit Hilfe des Zytotoxizitätstests untersucht. Dazu wurden neben den tumorfreien Mäusen auch die Tiere verwendet, die nach wiederholter Tumorzellgabe Tumore entwickelten, sowie völlig

unbehandelte (naive) Mäuse gleichen Alters und Hygienestatus. Den Tieren wurde unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen und diese dann in MEM-Zellkulturmedium ( $\alpha$ -Modifikation, 10% FKS,  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -Mercaptoethanol, Sigma) mit dem stumpfen Ende eines sterilen Spritzenkolbens zu einer Einzelzellsuspension zerdrückt. Reste von Bindegewebe und größere Zellklumpen wurden durch Filtrieren der Suspension durch sterile Gaze abgetrennt. Zum Waschen wurden die Zellen zweimal durch Zentrifugieren für 5 min bei 1500 rpm pelletiert und in 10 ml Medium aufgenommen. Bei der folgenden Bestimmung der Anzahl lebender Lymphozyten wurden 50  $\mu$ l der Zellsuspension mit 20  $\mu$ l Essigsäure (0,2% in 1 x PBS) verdünnt, um Erythrozyten selektiv zu eliminieren, bevor im Verhältnis 1:1 Trypanblau-Lösung zugegeben wurde. Die Kultivierung von  $2 \times 10^7$  Lymphozyten (Effektorzellen) in 10 ml  $\alpha$ -MEM erfolgte in einer 50 ml-Kulturflasche (Nunc). Zur Stimulierung der T-Zellen wurden pro Kulturflasche  $1 \times 10^6$  Tumorzellen (Stimulatorzellen) gegeben, die zuvor mit  $\gamma$ -Strahlen (B78/H1-Zellen: 4000 rad, RENCA-Zellen: 9000 rad, Milzzellen: 3300 rad) behandelt worden waren. Die Kulturen wurden für 5 Tage im Brutschrank inkubiert.

### 2.8.9.2 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität im $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest

Für die Bestimmung ihrer zytotoxischen Aktivität wurden die Effektorzellen geerntet, mit RPMI-1640 (komplett) gewaschen und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. 100  $\mu$ l der Zellen wurden in Triplikaten in Rundbodenmikrotiterplatten (Nunc) gegeben. Zur Titration wurden nun mit einer 12-Kanalpipette 1:2-Verdünnungen durch Übertragung von jeweils 100  $\mu$ l hergestellt. Danach wurden zur Markierung  $2 \times 10^6$  frische Zielzellen mit  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung (50  $\mu$ Ci, Amersham) versetzt und 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit RPMI-1640 wurde die Zellkonzentration auf  $1 \times 10^5/\text{ml}$  eingestellt und 100  $\mu$ l zu den vorgelegten Effektorzellen gegeben. Die maximale  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l 10% SDS zu 100  $\mu$ l chromierten Zielzellen bestimmt. Um die spontane Isotopenfreisetzung zu erfassen, wurden 100  $\mu$ l Zielzellen ohne Zugabe von Effektorzellen inkubiert. Danach wurde der Ansatz 4 h im Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert und dann 50  $\mu$ l der Überstände auf eine Luma-Platte (Canberra Packard) überführt und getrocknet. Die Menge freigesetzten Isotops in den Proben wurde in einem  $\gamma$ -Zähler (Canberra Packard) bestimmt.

Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spez. Lyse} = \frac{\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (Spontanfreisetzung)}}{\text{cpm (max. Freisetzung)} - \text{cpm (Spontanfreisetzung)}} \times 100$$

## 2.9 Immunhistochemische Analyse von Tumoren

Diese Methode bietet die Möglichkeit, Zellkomponenten oder einzelne Zellen in histologischen Präparaten sichtbar zu machen und diente in dieser Arbeit zum Nachweis bestimmter Leukozyten in Tumoren.

### 2.9.1 Herstellung der Tumorgewebeschnitte

Dazu wurden  $5 \times 10^6$  HeLa-Zellen in Nacktmäuse injiziert, die *in vitro* mit einer MOI = 1 mit hH1/MCP-3, hH1Δ800 oder mock-infiziert worden waren. Die Tumore wurden 3 und 5 Tage nach Implantation entnommen und teils in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren, teils in Formaldehyd-Lösung (4%) fixiert und dann in Paraffin eingebettet. Paraffinschnitte (5µm) auf Objektträgern, die mit APES3-(Triethoxysilyl)-propylamin (Merck) beschichtet sind, wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Um die Schnitte zu fixieren und Antigene besser für die Antikörperbindung zugänglich zu machen, wurden sie in Citrat-Puffer in der Mikrowelle bei 600 Watt zweimal für 10 min behandelt. Gefrierschnitte (5µm) wurden auf die beschichteten Objektträger gelegt und für 2 min luftgetrocknet. Zur Fixierung wurden die Präparate dann für 10 min in Zamboni-Lösung fixiert.

Citrat-Puffer:            1,8 mM Citronensäure  
                                  8,2 mM Na-Citrat  
                                  pH 6,0

Herstellung der Zamboni-Lösung:

Für 1 l dieser Lösung 20 g Paraformaldehyd in 150 ml gesättigter Pikrinsäure für 2 h bei 60°C inkubieren. Dann mit 2,5 M NaOH neutralisieren und die Lösung filtrieren. Mit Sørensen-Puffer auf pH 7,2 einstellen und bei RT lagern.

Sørensen-Puffer:        0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                  0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## 2.9.2 Färbeverfahren

Die fixierten Präparate wurden dreimal mit 1 x PBS gespült. Nun wurde endogene Peroxidase durch 10-minütige Inkubation mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neutralisiert. Die folgende Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte ü.N. bei 4°C. Paraffinschnitte wurden mit Mac-3 (monoklonaler anti-Mac-3-Antikörper, 1 : 200-Verdünnung, Pharmingen) behandelt. Dieser Antikörper erkennt v. a. Makrophagen, sowie eine Subpopulation dendritischer und endothelialer Zellen. Die Gefrierschnitte wurden mit DEC205 (anti-DEC205 monoklonaler Antikörper; Jiang *et al.*, 1995, 1:2-Verdünnung, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Sozzani, Mario Negri Institute, Mailand/Italien) inkubiert, der an aktivierte dendritische Zellen bindet. Alle nun folgenden Schritte erfolgten bei RT. Endogenes Biotin wurde durch Zugabe von 0,1% Avidin (Vector) für 20 min blockiert. Überschüssig eingesetztes Avidin wurde durch 20-minütige Inkubation mit 0,01% Biotin abgesättigt, bevor die Schnitte mit biotinyliertem Maus anti-Ratte IgG (1:200-Verdünnung, Pharmingen Klon G15-337) als Zweitantikörper für 1 h inkubiert wurden. Es folgte die Zugabe Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase (Vector) für 1 h. Die Antikörper-bindung wurde danach durch Umsetzung des Substrats 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) sichtbar gemacht.

Alle verwendeten Substanzen waren in 1 x PBS gelöst bzw. verdünnt. Jedem einzelnen Schritt folgte dreimaliges Spülen der Schnitte mit 1 x PBS. Als Negativkontrolle wurden jeweils Schnitte ohne Zugabe des Primärantikörpers nach dem gleichen Protokoll behandelt.

### Substrat:

4 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) werden in 1 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Unter Rühren werden 14 ml 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,2) zugegeben. Nach Zugabe von 150 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird der Ansatz 40 min bei RT inkubiert.

Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger für 2 min in ein Färbegefäß mit Mayer's Hämatoxylin (Sigma) eingelegt. Zum Bläuen des Hämatoxylins wurden die Präparate für 5 min mit Leitungswasser gespült. Das bei Verwendung von AEC als Substrat entstehende Reaktionsprodukt ist in Alkoholen und organischen Lösungsmitteln löslich. Deshalb wurden die noch feuchten Schnitte mit Glyceringelatine (DAKO) eingedeckelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines 1 mm<sup>2</sup>-Gitter (Leica) unter einem 100x-Objektiv (Fluoreszenzmikroskop DMRD, Leica). Gezählt wurden positive Zellen in 20 Feldern auf Schnitten zweier unterschiedlicher Tumore.

## 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden MCP-3-rekombinante Parvoviren auf ihre antineoplastische Wirkung hin untersucht. Im ersten Teil wurde der Effekt von MVMp/MCP-3 auf das Wachstum der B78/H1-Melanomzellen in syngenen C57BL/6-Mäusen untersucht, im Vergleich zum Einfluß des Vektors ohne Transgen und dem des MVMp-Wildtypvirus.

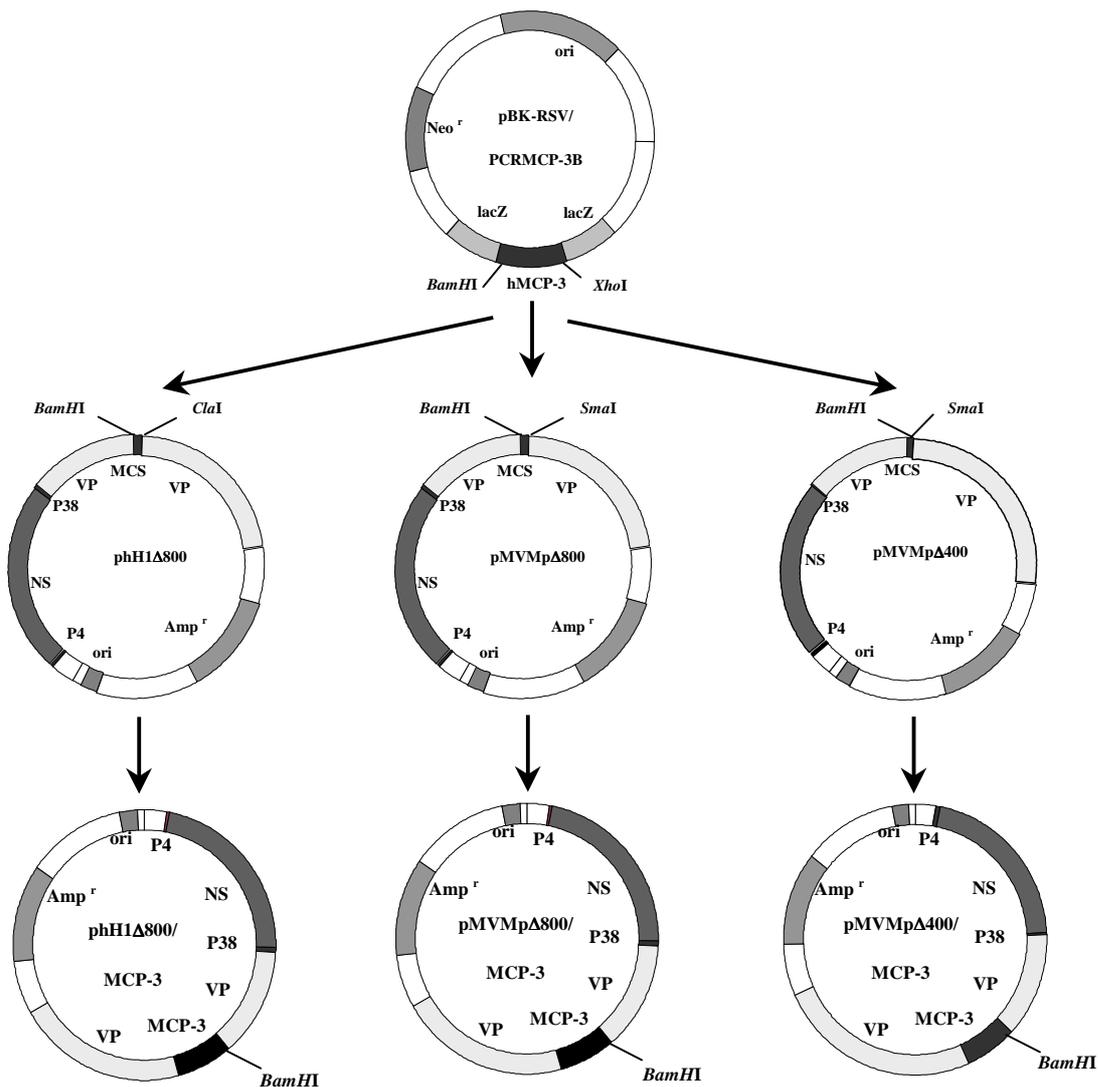
Im Hinblick auf eine klinische Anwendung parvoviraler Vektoren befaßt sich der zweite Teil der Arbeit mit der antionkogenen Wirkung von hH1/MCP-3 in humanen Zellen im HeLa/Nacktmaus-Tumormodell.

### 3.1 Herstellung rekombinanter Parvoviren

#### 3.1.1 Klonierung der cDNA des humanen MCP-3 in parvovirale Vektoren

Zur Untersuchung der antineoplastischen Wirkung MCP-3 rekombinanter Parvoviren wurde die cDNA des humanen MCP-3 in H-1- und MVMp-verwandte Vektoren pH1 $\Delta$ 800, MVMp $\Delta$ 400 bzw. MVMp $\Delta$ 800 kloniert (Kestler *et al.*, 1999).

Dazu wurde das MCP-3-Fragment von 437 bp durch *XhoI/BamHI*-Restriktionsverdau aus dem Plasmid pBK-RSV/PCRMCP-3B (Opdenakker *et al.*, 1993) heraus geschnitten und in die parvoviralen Vektoren nach Restriktion mit *Clal/BamHI* bzw. *SmaI/BamHI* ligiert (Abb. 3-1). Die Ligationsprodukte wurden in chemokompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue transformiert und die korrekte Verknüpfung von Vektor und Insert durch Sequenzierung verifiziert. Um Mutationen oder Deletionen durch Rekombination zu vermeiden, wurde DNA der gewünschten Klone in SURE-Bakterien transformiert.

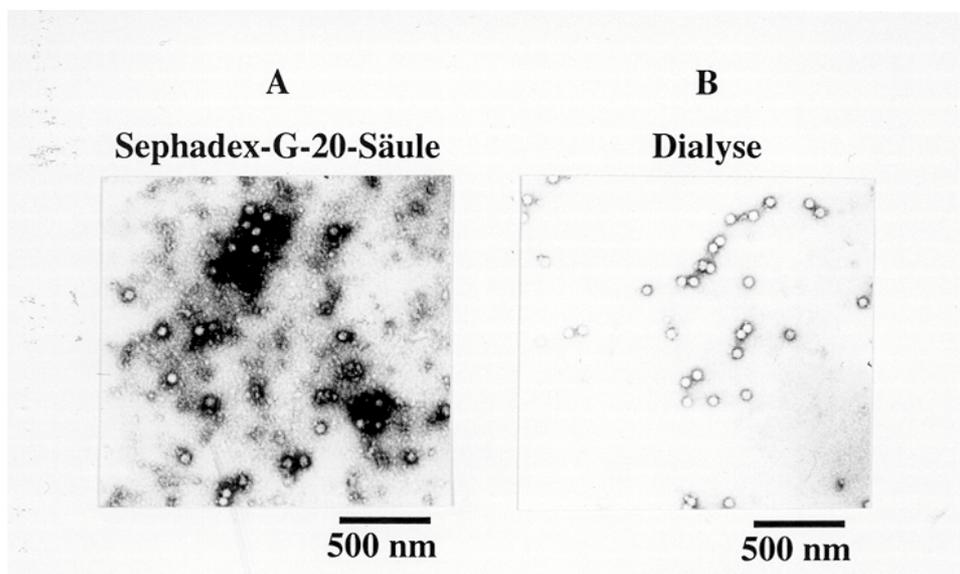


**Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Klonierung der cDNA des humanen MCP-3 in parvovirale Vektoren.**

Die in einem pUC19-Plasmid vorliegenden doppelsträngigen parvoviralen Genome von pH1Δ800, MVMpΔ400 und MVMpΔ800 wurden durch Restriktion mit *ClaI* bzw. *SmaI* linearisiert, und mit *BamHI* geschnitten. Dann wurde das MCP-3-Fragment, das durch Restriktion des Vektors pBK-RSV/PCRMCP-3B mit *XhoI*, Auffüllen der überhängenden Enden mit Klenow-Fragment und *BamHI*-Verdau isoliert worden war, in die geöffneten Vektoren ligiert. Damit wird die Transkription des Transgens über den parvoviralen P38-Promotor reguliert. Amp<sup>r</sup>: Ampicillinresistenzgen; lacZ: β-Galactosidasereportergen zur blau/weiß-Selektion; hMCP-3: cDNA des humanen MCP-3; MCS: multiple Klonierungsstelle; Neo<sup>r</sup>: Resistenzgen für Neomycin; NS: virale Nichtstrukturproteingene; ori: in Bakterien verwendeter Replikationsursprung; P4: früher viraler Promotor; P38: später viraler Promotor; VP: virale Kapsidproteingene.

### 3.1.2 Produktion und Aufreinigung rekombinanter H-1-Viren

Für die Herstellung der rekombinanten Viren hH1 $\Delta$ 800, hH1 $\Delta$ 800/MCP-3 und hH1 $\Delta$ 800/GFP wurden 293T-Zellen mit den Plasmiden, die das jeweilige rekombinante parvovirale Genom enthalten (Abb. 3-1) zusammen mit dem Verpackungshelferplasmid pBK-CMVVP, welches die H-1-Kapsidproteingene trägt, kotransfiziert. Die Zellen wurden 56-64 h nach Transfektion geerntet und in VTE-Puffer durch 3-5 Frier/Tau-Zyklen lysiert. Die Trennung der vollen Partikel von leeren Kapsiden und Zellresten erfolgte durch Auftrennung dieser Rohextrakte mittels Zentrifugation über Cäsiumchlorid-Gradienten. Nach Fraktionierung der Gradienten wurden durch Dichtebestimmung und Hämagglutinationstest diejenigen Proben identifiziert, die volle Partikel enthielten und vereinigt. Um bei späterer Infektion von Zellkulturen eine toxische Wirkung des CsCl zu vermeiden, wurde das CsCl entweder über eine Sephadex-Säule entfernt oder durch Dialyse gegen VTE-Puffer. Elektronenmikroskopaufnahmen der Virussuspensionen nach Uranylacetat-Kontrastfärbung zeigten nach Verwendung der Sephadex-Säulen (Abb. 3-2 A), im Gegensatz zu dialysierten Virussuspensionen (Abb. 3-2 B), Partikel in der Virussuspension, bei denen es sich wahrscheinlich um Bruchstücke der Sephadex-Matrix handelt.



**Abb. 3-2: Elektronenmikroskopaufnahmen von rekombinanten H-1-Viren**

Nach Verwendung von **A**) Sephadex-G-20-Säulen oder **B**) Dialyse wurden Virussuspensionen auf kohlebedampften Kupfergittern mit Uranylacetat gegengefärbt und bei 20000-facher Vergrößerung im Elektronenmikroskop fotografiert.

Um Einflüsse dieser Verunreinigungen auf die Ergebnisse, vor allem der Tierversuche zu vermeiden, wurden alle weiteren Virussuspensionen dialysiert. Uranylacetat hat eine höhere Elektronendichte als z. B. Kapsidproteine oder DNA. Deshalb erscheinen volle Viren im Elektronenmikroskop als weiße Partikel, während leere Kapsidhüllen durch die Einlagerung von Uranylacetat anstelle der DNA einen dunklen Kern aufweisen. Zur Überprüfung der Effizienz der Abtrennung leerer Kapside wurden 30 Elektronenmikroskopaufnahmen (10 Felder pro Virus, 20000-fache Vergrößerung) ausgezählt. Dialysierte Virussuspensionen zeigten zu mindestens 97% volle Partikel und sehr geringe bis keine Verunreinigungen der Lösungen (Abb. 3-2 B).

Die Titer der rekombinanten H-1-Viren wurden mittels Filterhybridisierungstest bestimmt. Sie lagen zwischen  $1-7 \times 10^7$  RU/ml, was einer Produktion von 0,6 – 6 RU pro transfizierter 293T-Zelle entspricht. Die Virussuspensionen wiesen eine RCV-Kontamination, die über Plaque-Assay bestimmt wurde, von maximal 0,02% auf. Zur Vereinfachung der Nomenklatur werden die rekombinanten H-1-Viren im folgenden als hH1/MCP-3 und hH1/GFP bezeichnet.

### **3.1.3 Produktion und Aufreinigung MVMP-verwandter Viren**

Zur Produktion der rekombinanten Viren MVMP $\Delta$ 400/MCP-3, MVMP $\Delta$ 800/MCP-3, MVMP $\Delta$ 400 und MVMP $\Delta$ 800 wurden 293T-Zellen mit den Plasmiden, welche die entsprechenden parvoviralen Genome tragen (Abb. 3-1) zusammen mit dem verpackungshelferplasmid pVMCMVVP kotransfiziert. Nach Ernte der Zellen wurde vom abgetrennten Medium 1 ml aufbewahrt zur späteren Bestimmung der darin enthaltenen Virusmenge. Nach CsCl-Aufreinigung, Fraktionierung und Vereinigung der gewünschten Fraktionen wurden die entstandenen Virussuspensionen gegen VTE-Puffer dialysiert. Den Zellysaten vor CsCl-Aufreinigung wurden jeweils 0,5 ml entnommen, um bei späterer Titration den Virusverlust im CsCl-Gradienten zu analysieren. Vor und nach Dialyse wurde ebenfalls jeweils 0,1 ml für die folgenden Virustiterbestimmung durch Filterhybridisierungstests entnommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 aufgelistet, berechnet auf das Gesamtvolumen der jeweiligen Lösung.

	<b>MVMpΔ400 in RU</b>	<b>MVMpΔ400/MCP-3 in RU</b>	<b>MVMpΔ800 in RU</b>	<b>MVMpΔ800/MCP-3 in RU</b>
<b>Zellmedium</b>	3,4 x 10 <sup>6</sup>	6,0 x 10 <sup>5</sup>	-	-
<b>Zellysat vor CsCl-Gradient</b>	6,6 x 10 <sup>8</sup>	7,8 x 10 <sup>7</sup>	-	-
<b>Virussuspension nach CsCl-Gradient</b>	1,1 x 10 <sup>8</sup>	1,4 x 10 <sup>7</sup>	-	-
<b>Virussuspension nach Dialyse</b>	9,0 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	3,5 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>4</sup>

**Tab. 3-1: Die Menge rekombinanter Viren der einzelnen Schritte während der Aufreinigung mit einem CsCl-Gradienten**

Zur Produktion von rekombinanten Viren wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und die Zellen nach 2-3 Tagen lysiert. Die Zellysate wurden über Cäsiumchloridgradienten aufgereinigt, gefolgt von einer Dialyse. Die angegebene Anzahl RU entspricht der Menge der Viren der Gesamtlösung der einzelnen Schritte während der Produktion der Viren. RU: *replication unit*

Aufgrund der fehlenden Virusproduktion wurden die Konstrukte pMVMpΔ800 und pMVMpΔ800/MCP-3 nicht weiter verwendet. Der Vektor pMVMpΔ400/MCP-3 wird im weiteren als pMVMp/MCP-3 bezeichnet. Der Anteil rekombinanter Viren im Zellkulturmedium der transfizierten Zellen an der Gesamtproduktion (Menge im Zellmedium zusammen mit der im Zellysat vor CsCl-Gradientenaufreinigung, Tab. 3-1) lag zwischen 4% (MVMpΔ400) und 5% (MVMp/MCP-3). Der Verlust während der Aufreinigung durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation betrug 82% (MVMp/MCP-3) bis 84% (MVMpΔ400) der Gesamtproduktion. Die Rückgewinnung nach Dialyse erfolgte zu 86% für MVMpΔ400 bis 92% für MVMp/MCP-3. Die produzierte Menge gereinigter Viren war nicht ausreichend, um die geplanten Tierversuche damit durchführen zu können.

### **3.1.4 Höhere Ausbeuten rekombinanter MVMp-Viren durch die Verwendung eines Iodixanolgradienten**

Während der Zeit dieser Doktorarbeit wurde ein Iodixanolgradient alternativ zur CsCl-Gradienten für die Aufreinigung rekombinanter AAV-Partikel beschrieben (Zolothukin *et al.*,

1999). Dieser diskontinuierliche Gradient wird vorgefertigt durch Unterschichten von 15%, 25%, 40% und 60% Iodixanol-Lösungen. Bei der Zentrifugation sammeln sich leere AAV-Kapside und Zellreste in der 25%-Phase und volle Partikel in der 40%-Phase.

Da autonome Parvoviren eine Dichte von  $\sim 1,3$  g/ml in einer 40%igen Iodixanolllösung besitzen (diese Arbeit), die vergleichbar mit derjenigen der AAV ist (Zolothukin *et al.*, 1999), liegt eine ähnliche Verteilung beider Viren im Iodixanolgradient nahe. Daraufhin wurde der Aufbau des Gradienten zur Aufreinigung rekombinanter autonomer Parvoviren übernommen und die Zentrifugationsgeschwindigkeit und -zeit adaptiert. Eine Veränderung im Vergleich zu dem beschriebenen Gradienten bestand in der Reduktion des Volumens der einzelnen Iodixanol-Lösungen auf je 1,5 ml. Dadurch konnten die vorgefertigten Gradienten mit einem größeren Volumen (bis 6,5 ml) an Zellysats überschichtet werden.

Um zu analysieren, ob die Verwendung des beschriebenen Iodixanolgradienten zu einer Reduktion der Virusverluste beitragen kann, wurden Rohextrakte transfizierter 293T-Zellen zur Produktion von MVMp/MCP-3, MVMp $\Delta$ 400 und MVMp/GFP über vorgefertigte Iodixanolgradienten aufgereinigt. Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs sind in Tabelle 3-2 aufgelistet, berechnet auf das Gesamtvolumen der jeweiligen Lösung.

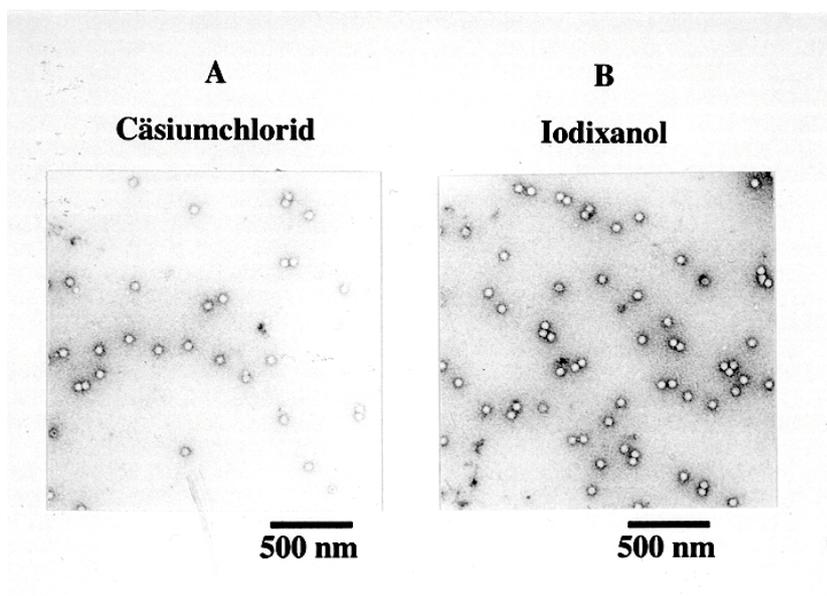
	MVMp $\Delta$ 400 (RU)	MVMp/MCP-3 (RU)	MVMp/GFP (RU)
<b>Zellmedium</b>	$1,2 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$
<b>Zellysats vor Iodixanolgradient</b>	$8,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
<b>Virussuspension nach Iodixanolgradient</b>	$6,8 \times 10^8$	$9,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$

**Tab. 3-2: Menge rekombinanter Viren bei Aufreinigung mit einem Iodixanolgradienten**

Transfizierte 293T-Zellen zur Produktion der rekombinanten Parvoviren MVMp $\Delta$ 400, MVMp/MCP-3 und MVMp/GFP wurden nach 2 Tagen lysiert. Zur Aufreinigung der Viren aus den Zellextrakte wurden Iodixanolgradienten verwendet. Die angegebene Anzahl RU entspricht der Menge der Gesamtlösung zu den Schritten bei der Aufreinigung. RU: *Replication Unit*; Replikative Einheiten

Die Virusmengen im Zellkulturmedium entsprachen erwartungsgemäß weniger als 10% der Gesamtproduktion. Bei Verwendung der Iodixanolgradienten zur Aufreinigung der rekombinanten Viren lag die Rückgewinnung der Virusmenge zwischen 80% (MVMp $\Delta$ 400, MVMp/MCP-3) und 84% (MVMp/GFP). Damit konnte die Ausbeute der Virusproduktion, im Vergleich zur Verwendung von CsCl-Gradienten, um mindestens 50% gesteigert werden.

Da eine Infektion von Zellkulturen in Gegenwart von Iodixanol aufgrund seiner inerten Eigenschaften durchgeführt werden kann (Hermens *et al.*, 1999) entstanden keine weiteren Verluste infektiöser Partikel durch Dialyse. In Elektronenmikroskopaufnahmen der einzelnen Fraktionen waren volle Partikel in der 40%-Phase und zu einem geringen Teil im 40/60%-Übergang nachzuweisen, während leere Kapside und Zellreste ausschließlich in der 25%-Phase zu beobachten waren (ohne Abbildung). Damit entspricht die Reinheit der Iodixanol-aufgereinigte Viren derjenigen nach CsCl-Gradienten, wie Abbildung 3-3 zeigt. Bei den rekombinanten MVMp-Viren lag die Kontamination der Virussuspensionen mit RCVs bei 0,01-0,1%.



**Abb. 3-3: Elektronenmikroskopaufnahmen von rekombinanten MVMp-Viren**

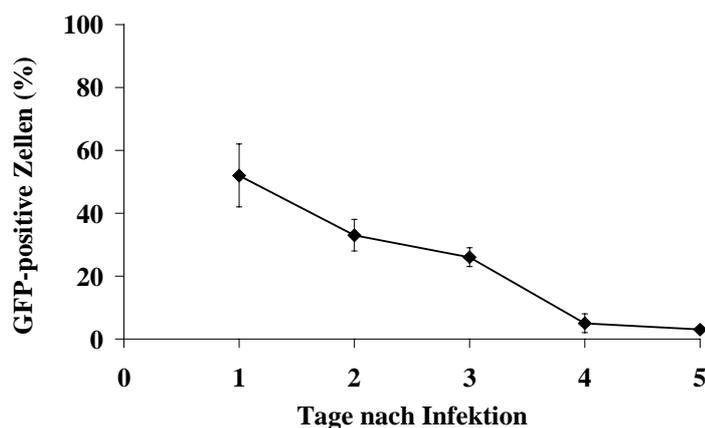
Nach Aufreinigung von MVMp/MCP-3 mit **A** Cäsiumchlorid oder **B** Iodixanol als Dichtezentrifugationsmedium wurden Virussuspensionen 1:3 mit 1 x PBS verdünnt, auf kohlebedampften Kupfergittern mit Uranylacetat gegengefärbt und bei 20000-facher Vergrößerung im Elektronenmikroskop fotografiert.

Die Verwendung von Iodixanol führte zu einer Verbesserung der Ausbeute und damit zu einer Steigerung der Menge gereinigter rekombinanter MVMP-Viren, die für Tierexperimente zur Verfügung standen. Außerdem verkürzte sich die Zeit zur Virusaufreinigung um 2 Tage.

## 3.2 Rekombinante Parvoviren *in vitro*

### 3.2.1 Anzahl transduzierter Tumorzellen

Im Hinblick auf spätere Tierversuche sollte die Fähigkeit der rekombinanten Parvoviren untersucht werden, die entsprechenden Tumorzellen zu transduzieren. Zur Bestimmung der Transduktionskapazität H-1-rekombinanter Viren wurden HeLa-Zellen mit hH1/GFP bei einer MOI von 1RU/Zelle infiziert und GFP-positive Zellen 1–5 Tage p.i. in 10 fluoreszenzmikroskopischen Feldern (40-fache Vergrößerung) in drei parallelen Kulturschalen ausgezählt. Die niedrige Infektionsmultiplizität wurde gewählt, da HeLa-Zellen sehr empfindlich gegenüber einer H-1-Infektion sind (Haag et al., 2000). Der Anteil GFP-exprimierender Zellen an der Gesamtkultur ist in Abbildung 3-4 dargestellt.



**Abb. 3-4: Anteil GFP-positiver HeLa-Zellen an der Gesamtpopulation nach Infektion mit hH1/GFP (MOI = 1 RU/Zelle)**

HeLa-Zellen wurden mit hH1/GFP bei einer MOI von 1 RU/Zelle infiziert und die Anzahl GFP-positiver Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in jeweils 10 randomisierten Feldern von drei Kulturen ausgezählt. Dargestellt ist der Anteil GFP-positiver Zellen in % mit Standardabweichung, berechnet auf die Gesamtzellzahl.

Am ersten Tag nach Infektion war bei der Hälfte der Zellen eine deutliche GFP-Expression zu erkennen. Der Anteil GFP-positiver Zellen sank im folgenden kontinuierlich bis Tag 5 p.i. auf 3 % an der Gesamtpopulation (Abb. 3-4). Diese Abnahme läßt sich sowohl mit der Vermehrung nicht-infizierter Zellen, als auch mit einer Reduktion der absoluten Anzahl GFP-positiver Zellen bis Tag 5 p.i. erklären (ohne Abbildung). Der Rückgang der absoluten Anzahl kann auf den zytotoxischen Einfluß des Virus zurückgeführt werden (s. 3.2.2).

Zur Bestimmung der Anzahl infizierter B78/H1-Zellen wurden die Melanomzellen mit MVMP/GFP bei einer MOI von 1, 3 oder 10 RU/Zelle infiziert. Nach 1, 2 und 3 Tagen p.i. wurden die Zellen geerntet, die Gesamtzahl der lebenden Zellen bestimmt und der Anteil GFP-exprimierender Zellen an der Gesamtpopulation durch FACS-Analyse bestimmt. Die Anteile GFP-positiver Zellen an der Gesamtpopulation und die absoluten Zahlen GFP-exprimierender Zellen, die aus der Gesamtzellzahl errechnet wurden, sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

<b>Zeitpunkt</b>	<b>GFP- positive Zellen bei angegebener MOI</b>		
<b>Tage nach Infektion</b>	<b>MOI = 1</b> % (Anzahl)	<b>MOI = 3</b> % (Anzahl)	<b>MOI =10</b> % (Anzahl)
<b>1</b>	<b>1,3</b> ( $1,3 \times 10^3$ )	<b>2,2</b> ( $2,2 \times 10^3$ )	<b>3,2</b> ( $3,2 \times 10^3$ )
<b>2</b>	<b>1,3</b> ( $4,3 \times 10^3$ )	<b>3,6</b> ( $1,2 \times 10^4$ )	<b>8,1</b> ( $2,6 \times 10^4$ )
<b>3</b>	<b>0,7</b> ( $7,1 \times 10^3$ )	<b>2,1</b> ( $2,3 \times 10^4$ )	<b>4,0</b> ( $4,4 \times 10^4$ )

**Tab 3-3: Anteil GFP-exprimierender B78/H1-Zellen an der Gesamtpopulation nach Infektion mit MVMP/GFP bei unterschiedlicher MOI**

B78/H1-Zellen wurden mit MVMP/GFP bei einer MOI von 1, 3 und 10 RU/Zelle infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Anzahl GFP-exprimierender Zellen wurde per FACS-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Anteile GFP-exprimierender Zellen in % an der Gesamtpopulation, sowie die errechneten absoluten Zahlen GFP-positiver Zellen.

Mit steigender MOI nahm zu den einzelnen Zeitpunkten der Anteil GFP-exprimierender Zellen an der Gesamtpopulation zu. Der Anstieg infizierter Zellen korrelierte jedoch nicht direkt proportional zum Anstieg der MOI. Bei Infektion mit gleicher MOI stieg der Prozentsatz infizierter Zellen von Tag 1 zu Tag 2 nach Infektion zu und nahm von Tag 2 zu

Tag 3 p.i. ab. Da rekombinante Viren keine Nachkommen produzieren, können nur Zellen lysiert werden, die am Tag der Virusgabe infiziert worden sind. Nicht-infizierte Zellen teilen sich jedoch weiterhin. Dardurch verringert sich der Anteil infizierter Zellen über die Zeit.

Die Anzahl GFP-positiver Zellen stieg über den Untersuchungszeitraum an. Die Replikation der viralen DNA und damit die Transgenexpression ist abhängig von der S-Phase des Wirtszellzyklus. Da hier keine synchronisierten Zellen eingesetzt worden waren, spiegelt der steigende Anteil GFP-positiver Zellen vermutlich den steigenden Anteil der Zellen wider, die mit beginnender S-Phase Transgenexpression ermöglichen und durch die Aktivität von NS1 in dieser Zellzyklusphase akkumulieren.

Bei dieser Untersuchung wurde die Anzahl GFP-positiver Zellen mit der Anzahl infizierter Zellen gleichgesetzt. Der Anteil der Zellen, bei denen nach Eindringen des Virus keine meßbare Transgenexpression erfolgte, wurden vernachlässigt, da in dieser Arbeit der Effekt von MCP-3-transduzierenden Viren untersucht werden soll.

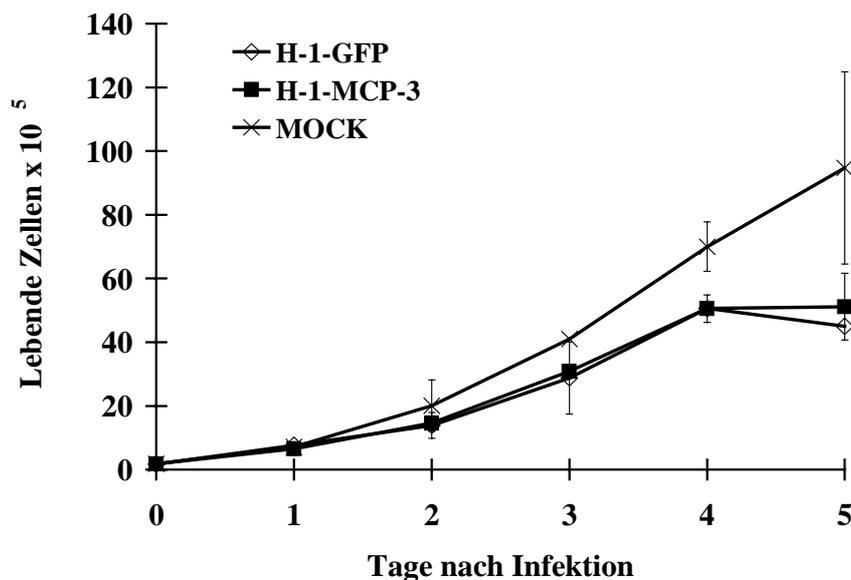
In diesem Versuch war eine höhere Sensitivität von HeLa-Zellen gegenüber einer Infektion mit hH1/GFP festzustellen als B78/H1-Zellen gegenüber MVMp/GFP.

### 3.2.2 Wachstum infizierter Zellkulturen *in vitro*

Um die onkolytische Aktivität der rekombinanten Viren zu erhalten, sind in den verwendeten parvoviralen Vektoren die Nichtstrukturproteingene enthalten. Zur Überprüfung der lytischen Aktivität der rekombinanten Viren wurde das Wachstum *in vitro*-infizierter Zellen über einen Zeitraum von 5 Tagen beobachtet. Dazu wurden HeLa-Zellen mit hH1/MCP-3 oder mit hH1/GFP bei einer MOI von 1 RU/Zelle infiziert bzw. mock-infiziert und die Lebendzellzahl 1 – 5 Tage p.i. nach Trypan-Blau-Färbung gezählt (Triplikate je Virus und Zeitpunkt). Die Abbildung 3-5 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs.

Erwartungsgemäß vermehrten sich mock-infizierte Zellen (X) stark. Die große Varianz am 5. Tag p.i. ist vermutlich die Folge der hohen Zelldichte und auf das damit verbundene beginnende Absterben der Zellen zurückzuführen. Im Vergleich dazu zeigten die infizierten Kulturen einen geringeren Anstieg der Wachstumskurve. Die Lebendzellzahl virusinfizierter Populationen lag 5 Tage p.i. durchschnittlich bei etwa 50% derjenigen der mock-infizierten.

Durch den Vergleich der Lebendzellzahl infizierter Kulturen mit der nicht-infizierter Populationen wird zwischen einem zytostatischen und zytotoxischen Effekt nicht unterschieden. Eine parvovirale Zytolyse wurde durch LDH-Tests in unserem Labor bestätigt (LDH: Lactatdehydrogenase).



**Abb. 3-5: Wachstum von HeLa-Zellkulturen nach Infektion mit rekombinanten H-1-Viren**

HeLa-Zellen wurden mock-infiziert (X) bzw. mit hH1/GFP( $\diamond$ ) oder hH1/MVP-3 ( $\blacktriangle$ ) bei einer MOI von 1 RU/Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die Anzahl lebender Zellen durch Trypan-Blau-Färbung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten mit Standardabweichung.

Auch der Einfluß rekombinanter MVMP-Viren auf das Wachstum von B78/H1-Zellen wurde untersucht. Dazu wurden B78/H1-Zellen mit MVMP, MVMP/MCP-3 oder MVMP $\Delta$ 400 bei einer MOI von 1, 3 oder 10 RU bzw. pfu/Zelle infiziert oder mock-infiziert und die lebenden Zellen nach 1-5 Tagen p.i. nach Trypan-Blau-Färbung gezählt (Triplikate pro Zeitpunkt, Virus und MOI).

Im Vergleich zu mock-infizierten Zellen zeigte eine Infektion mit den verwendeten Viren bei einer MOI von 1 RU/Zelle keinen mit dieser Methode meßbaren Einfluß auf das Wachstum der Zellkulturen (Daten nicht gezeigt). Bei einer Infektionsmultiplizität von 3 RU/Zelle waren am 2. und 3. Tag p.i. 5% (MVMP/MCP-3) bis 7% (MVMP, MVMP $\Delta$ 400) weniger lebende Zellen in den infizierten Kulturen als in den mock-infizierten Kulturen zu beobachten (Daten

nicht gezeigt). Die Infektion bei einer MOI von 10 RU/Zellen ergab vergleichbare Resultate (Daten nicht gezeigt).

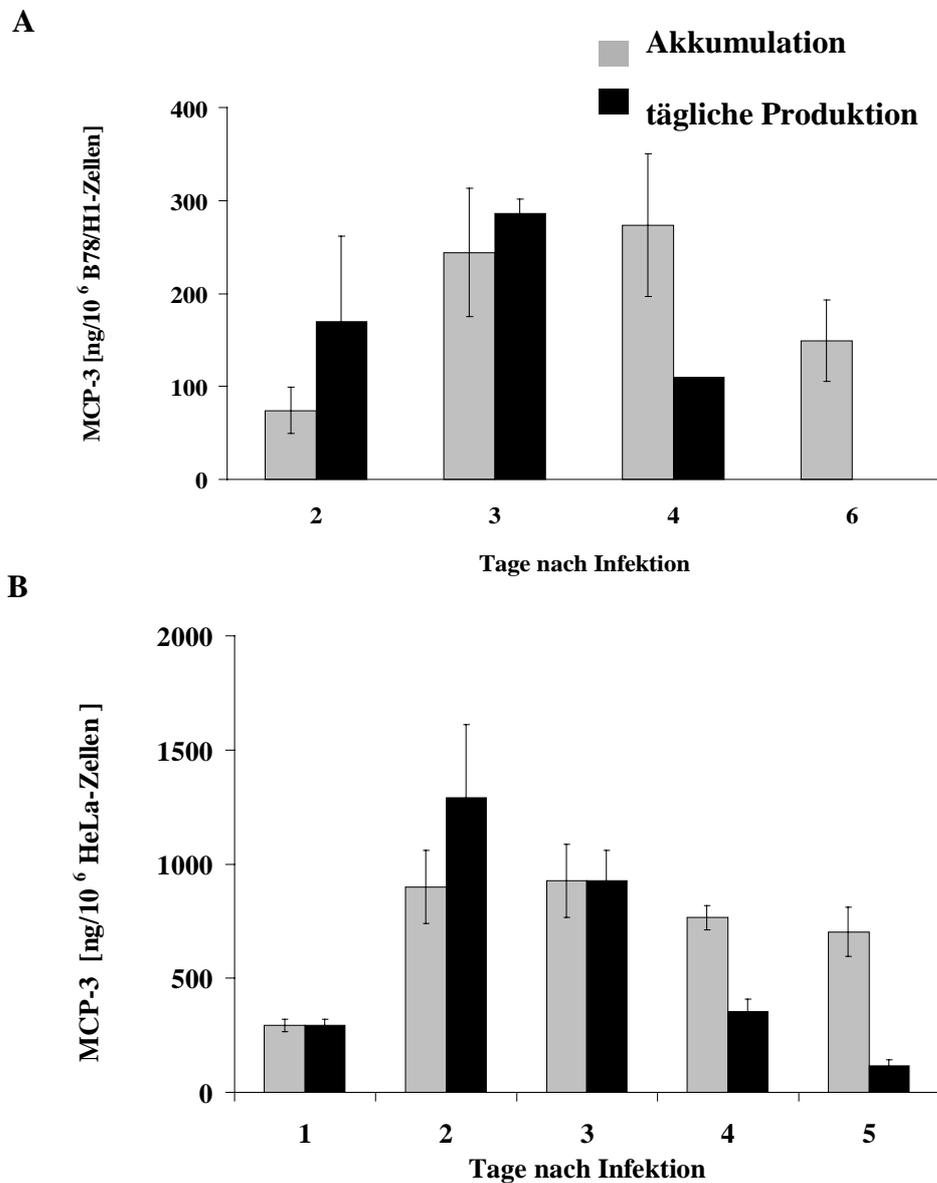
Die Größenordnung der geringeren Lebendzellzahl infizierter Zellpopulationen im Vergleich zu mock-infizierten Zellen entsprach bei beiden Zelllinien dem Anteil transduzierter Zellen (3.2.1). Dies zeigt, daß Zellen beider Linien, die permissiv für eine Expression der parvoviralen Gene sind, auch für die lytische Wirkung der Viren empfindlich sind. Der Einfluß rekombinanter H-1-Viren auf das Wachstum von HeLa-Zellen war ausgeprägter, als derjenige der MVMp-Viren auf das Wachstum der B78/H1-Zellen.

Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Effekten der verschiedenen rekombinanten Viren festzustellen. Die MCP-3-Produktion hat demnach keinen Einfluß auf das Wachstum der infizierten HeLa- oder Melanomzellen. Eine mögliche antineoplastische Wirkung der MCP-3-rekombinanten Vektoren in späteren Tierversuchen kann also nicht auf einen direkten Einfluß der MCP-3-Produktion auf das Wachstum der Zellen zurückgeführt werden.

### **3.2.3 MCP-3-Abgabe *in vitro* nach Infektion mit MCP-3-rekombinanten Parvoviren**

Da ein antitumoraler Effekt der MCP-3-rekombinanten Vektoren nur bei einer deutlichen Transgenexpression zu erwarten ist, wurde die MCP-3-Abgabe *in vitro* quantifiziert. Dazu wurden B78/H1-Zellen mit MVMp/MCP-3 bei einer MOI von 3 RU/Zelle infiziert und HeLa-Zellen mit hH1/MCP-3 bei einer MOI von 1 RU/Zelle. Um die kumulative MCP-3-Menge zu bestimmen, wurden zum gegebenen Zeitpunkt das Kulturmedium (je drei Schalen pro Zeitpunkt) auf den MCP-3-Gehalt mittels ELISA (Menten *et al.*, 1999) in Zusammenarbeit mit Prof. Van Damme (Rega Institute Universität Leuven, Belgien) untersucht. Außerdem wurde die täglich produzierte MCP-3-Menge analysiert, indem im Abstand von 24 h der Überstand von parallel infizierten Zellen vollständig entnommen und durch frisches Medium ersetzt wurde. Die Ergebnisse wurden auf die Produktion von  $10^6$  Zellen berechnet, sie mit Literaturwerten vergleichen zu können. Die tägliche MCP-3-Abgabe (Abb. 3-6 A, schwarze Säulen) der Melanomzellen wurde vom 2. Tag p.i. meßbar und erreichte ihr Maximum am 4. Tag p.i. mit einer Produktion etwa 270 ng MCP-3, berechnet auf  $10^6$  Zellen. Bis zum 6. Tag nach Infektion nahm die tägliche MCP-3-Sekretion auf ungefähr 110 ng pro  $10^6$  Zellen ab.

Die akkumulierte MCP-3-Menge (Abb. 3-6 A, graue Säulen) in Überständen infizierter B78/H1-Zellen stieg während der ersten 4 Tage nach Infektion auf einen Wert etwa 270 ng pro  $10^6$  Zellen und sank ungefähr auf 150 ng/ $10^6$  Zellen bis Tag 6 nach Infektion.



**Abb. 3-6: MCP-3-Abgabe von HeLa- und B78/H1-Zellen nach *in vitro* Infektion mit hH1/MCP-3 bzw. MVMp/MCP-3**

Die akkumulierte (graue Säulen) und tägliche (schwarze Säulen) MCP-3-Produktion wurde mittels ELISA (Menten *et al.*, 1999) bestimmt. Dazu wurden **A**  $1,5 \times 10^5$  B78/H1-Zellen mit MVMp/MCP-3 bei einer MOI von 3 RU/Zelle und **B**  $1,5 \times 10^5$  HeLa-Zellen mit hH1/MCP-3 bei einer MOI von 1 RU/Zelle infiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von Triplikaten, berechnet auf  $10^6$  Zellen eines repräsentativen Versuchs.

Nach Infektion mit MVMp/MCP-3 bei einer MOI von 10 RU/Zelle ergab sich keine meßbare Steigerung der MCP-3-Produktion.

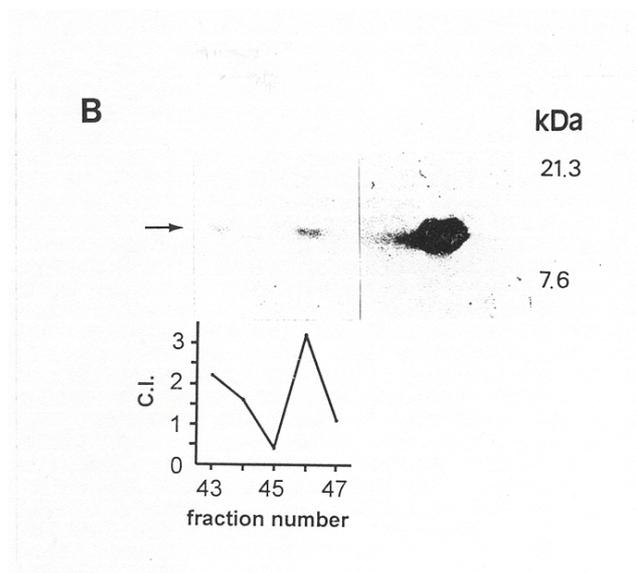
Wie in Abbildung 3-6 B zu erkennen, erreichte die tägliche MCP-3-Produktion (graue Säulen) der HeLa-Zellen am 2. Tag p.i. ihr Maximum im Bereich von 1,3 µg MCP-3, berechnet auf  $10^6$  Zellen und nahm dann bis zum 5. Tag nach Infektion auf etwa 120 ng pro  $10^6$  Zellen ab. Damit lag die maximale Produktion infizierter HeLa-Zellen etwa bei dem 4-fachen Wert der B78/H1-Zellen. Dies kann auf den höheren Anteil H-1-transduzierbarer HeLa-Zellen zurückgeführt werden. Die MCP-3-Akkumulation (schwarze Säulen) stieg bis Tag 2 p.i. auf ungefähr 720 ng je  $10^6$  HeLa-Zellen an und blieb bis 5 Tage nach Infektion in diesem Bereich. Die MCP-3-Menge in Kulturmedien von hH1/GFP- oder mock-infizierten HeLa-Zellen betrug 0,8 ng/ $10^6$  Zellen, womit eine konstitutive MCP-3-Produktion der HeLa-Zellen ausgeschlossen werden kann. Die MCP-3-Produktion von hH1/MCP-3-infizierten HeLa-Zellen wurde in 4 unabhängigen Versuchen bestimmt, wobei die maximale tägliche Abgabe berechnet auf  $10^6$  Zellen an Tag 2 p.i. zwischen 900 – 1600 ng lag und die kumulative Menge bei 500 – 1000 ng pro  $10^6$  Zellen. Die mittlere täglich Produktion lag am 2.Tag p.i. teilweise höher als die mittlere kumulative MCP-3-Menge, was sich durch eine Stimulierung der Zellen durch die tägliche Zugabe frischen Mediums erklären läßt.

Durch die MCP-3-Abgabe der HeLa-Zellen in einem Tier können mononukleäre Zellen zur Abgabe von weiteren Zytokinen aktiviert werden. Auch allein eine parvovirale Infektion könnte HeLa-Zellen zur Abgabe von Zytokinen indizieren, die eine Immunantwort im Tier beeinflussen können. Um die Abgabe von IL-6, IL-8 oder TNF- $\alpha$  zu untersuchen, wurden (im Labor von Prof. Van Damme) frisch isolierte humanen mononukleäre Zellen mit dem Kulturmedium hH1/MCP-3 bzw. hH1 $\Delta$ 800-infizierter HeLa-Zellen inkubiert. Im Medium der mononukleären Zellen wurde keine Abgabe von IL-6, IL-8 oder TNF- $\alpha$  festgestellt (ohne Abbildung).

### **3.2.4 Parvoviral transduziertes MCP-3 ist biologisch aktiv**

Hinsichtlich späterer Tierversuche sollten die biochemischen und chemotaktischen Eigenschaften des parvoviral transduzierten MCP-3 untersucht werden. Dazu wurde das von HeLa-Zellen sekretierte Chemokin durch Antikörper-Affinitätschromatographie und

nachfolgende *Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography* (RP-HPLC) aus dem Kulturmedium aufgereinigt (im Labor von Prof. Van Damme; nach Proost *et al.*, 1998). Die letzte RP-HPLC-Fraktionierung resultierte in der Elution von zwei Formen des MCP-3-Proteins (Abb. 3-7). In der *Western-Blot-Analyse* zeigten beide MCP-3-Moleküle ein Molekulargewicht von 11 kDa wie synthetisiertes MCP-3 (Abb. 3-7, oberer Teil). HPLC-gereinigtes MCP-3 wurde auf seine chemotaktische Aktivität gegenüber THP-1-Zellen hin in einem Chemotaxistest untersucht (Opendakker *et al.*, 1993). Das Ergebnis zeigt (Abb. 3-7, unterer Teil), daß parvoviral transduziertes, HPLC-gereinigtes MCP-3 ab einer Konzentration von 1 ng/ml chemotaktisch aktiv ist.

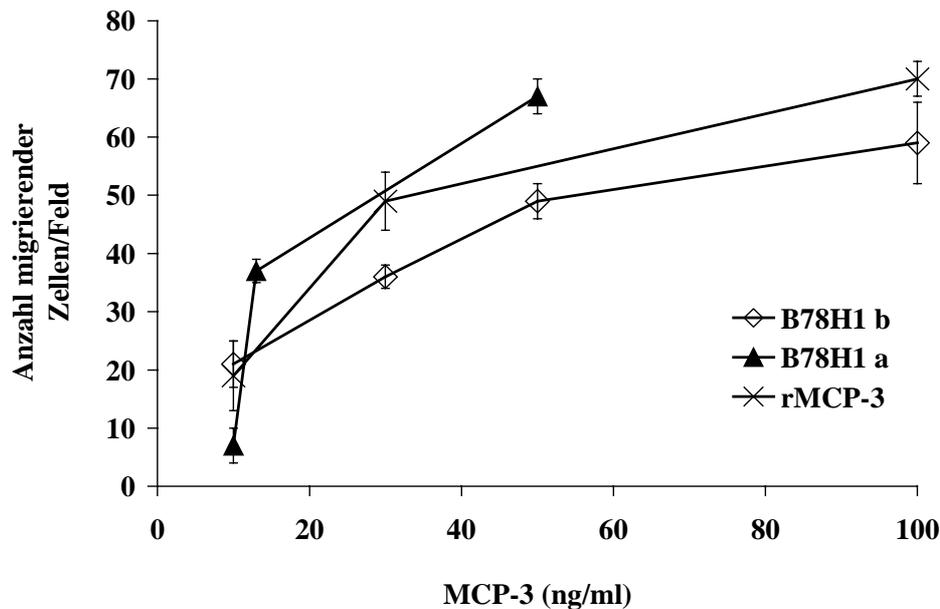


**Abb. 3-7: Aufreinigung und biologische Aktivität des parvoviral transduzierten MCP-3**

Aus Kulturüberständen hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Zellen wurde MCP-3 durch RP-HPLC aufgereinigt (Proost *et al.*, 1988). Nach *Western-Blot-Analyse* mit einem polyklonalen anti-MCP-3-Antikörper waren zwei MCP-3-Formen zu erkennen. Als Vergleich diente synthetisches Protein. Die HPLC-Fraktionen 43–47 wurden vereinigt und das rekombinante MCP-3 auf seine chemotaktische Aktivität gegenüber THP-1-Zellen untersucht. Dargestellt ist der Chemotaxis-Index von zwei unabhängigen Versuchen. Chemotaxis-Index CI: induzierte Migration abzüglich Hintergrundmigration.

Auch das von B78/H1-Zellen nach Infektion mit MVMp/MCP-3 sekretierte MCP-3 wurde auf seine chemotaktische Wirkung untersucht. Dazu wurde in einem Chemotaxistest im Labor von Dr. Sozzani (Mario-Negri-Institut, Mailand, Italien) die Migration frisch isolierter humaner Monozyten in einer Chemotaxiskammer nach Zugabe MCP-3-haltiger Zellkulturüberstände von B78/H1-Zellen untersucht. Die Konzentration des Chemokins im Medium wurde zuvor mittels ELISA bestimmt. Als Vergleich diente synthetisches MCP-3.

Abbildung 3-8 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl gewanderter Monozyten pro Mikroskopfeld (5 Felder, 100-fache Vergrößerung) in Abhängigkeit von der MCP-3-Konzentration, abzüglich der Basalmigration. Der Chemotaxis-Index C.I. wurde berechnet nach folgender Formel: C.I. = Anzahl Monozyten (MCP-3-haltiges Medium) - Anzahl Monozyten (Kontrollmedium)



**Abb. 3-8: Chemotaktische Aktivität des rekombinanten MCP-3 auf humane Monozyten**

Gezeigt ist die Migration frisch isolierter humaner Monozyten in einer Chemotaxiskammer nach Zugabe MCP-3-haltiger Zellkulturüberstände von B78/H1-Zellen (a:▲, b:◇), sowie synthetisches rekombinantes rMCP-3 (x). Dargestellt ist die mittlere Anzahl Monozyten/Mikroskopfeld bei 100-facher Vergrößerung von 5 Feldern in Abhängigkeit von der MCP-3-Konzentration, abzüglich der Basalmigration.

Das parvoviral transduzierte, von B78/H1-Zellen sekretierte Chemokin zeigte eine chemotaktische Aktivität vergleichbar derjenigen des synthetischen MCP-3. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml unaufgereinigtem MCP-3 war eine signifikante Migration von Monozyten festzustellen, die bis auf eine Konzentration von 50 ng/ml stark zunahm. Eine weitere Steigerung der MCP-3-Konzentration ergab eine geringe Zunahme der Anzahl migrierender Monozyten. Dieses Resultat wurde durch zwei weitere unabhängige Versuche bestätigt. Der Versuch zeigt, daß die infizierten Tumorzellen chemotaktisch aktives MCP-3 abgeben.

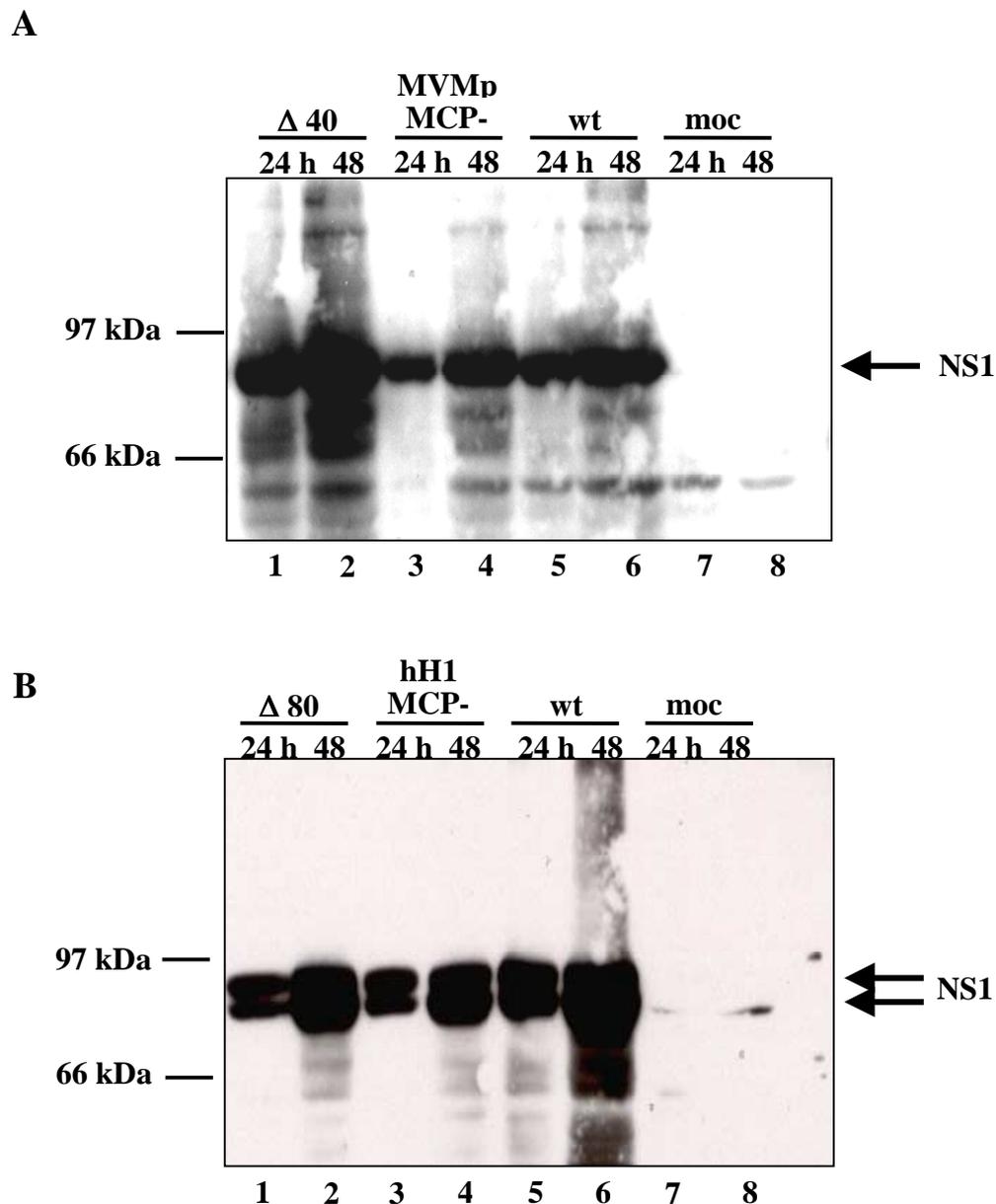
### 3.2.5 NS1-Expression *in vitro* nach Infektion mit rekombinanten Parvoviren

Um auszuschließen, daß eine antitumorale Wirkung der MCP-3-rekombinanten Vektoren gegenüber den Kontrollviren auf eine höhere NS1-Expression zurückzuführen ist, wurde die NS1-Menge in B78/H1- und HeLa-Zellen nach Infektion mit den verschiedenen Parvoviren verglichen. Dazu wurden B78/H1-Zellen mit einer MOI von 3 mit MVMp, MVMp $\Delta$ 400, MVM/GFP und MVMp/MCP-3 infiziert. Die Infektion der HeLa-Zellen mit hH1/MCP-3, hH1 $\Delta$ 800 und dem Wildtypvirus erfolgte bei einer MOI von 1.

Die Zellen wurden nach 24 h und 48 h in heißem Lyse-Puffer aufgeschlossen und die Proteine über ein 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Abbildung 3-9 zeigt das Ergebnis der anschließenden *Western-Blot*-Analyse von Extrakten infizierter Zellen mit einem NS1-spezifischen Antikörper (SP7).

Die NS1-Expression stieg von 24 h auf 48 h erwartungsgemäß leicht an. In Lysaten MVMp- (Spur 5, 6) und MVMp/MCP-3-infizierter Zellen (Spur 3, 4) wurden vergleichbare Mengen NS1 beobachtet. In MVMp $\Delta$ 400-infizierten Zellen (Spur 1, 2) wurde eine geringfügig höhere NS1-Expression festgestellt, was möglicherweise auf eine etwas höhere Infektionsmultiplizität aufgrund der Varianz in der Titerbestimmung zurückzuführen sein kann.

Insgesamt kann nach diesem Ergebnis eine stärkere NS1-Expression nach Infektion mit den MCP-3-rekombinanten Vektoren im Vergleich zu den anderen Vektoren ausgeschlossen werden.



**Abb. 3-9: Western-Blot-Analyse der NS1-Expression in Extrakten infizierter Zellen**

B78/H1-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit Wildtyp-Virus oder rekombinanten Viren infiziert und nach 24 h bzw. 48 h p.i. mit Lyse-Puffer extrahiert. Auf einem 10%-SDS-PAA-Gel wurden je 40 µg Gesamtextrakt pro Spur aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und anschließend durch Inkubation mit anti-NS1-Antikörper (SP7, 1:2000) und einem HRP-konjugierten Ziege anti-Kaninchen-Antikörper (1:10000) und anschließender ECL-Reaktion detektiert.

**A** B78/H1-Zellen wurden mit MVMpΔ400 (Spur 1, 2), MVMp/MCP-3 (Spur 3, 4), MVMp (Spur 5, 6) oder mock-infiziert (Spur 7, 8) bei einer MOI von 3 RU/Zelle infiziert.

**B** HeLa-Zellen wurden mit hH1Δ800 (Spur 1, 2), hH1/MCP-3 (Spur 3, 4) oder H-1-Wildtyp (Spur 5, 6), bzw. mock-infiziert (Spur 7, 8) infiziert.

### **3.3 Die antineoplastische Wirkung von MVMp/MCP-3 in immunkompetenten Mäusen im syngenem Tumormodell**

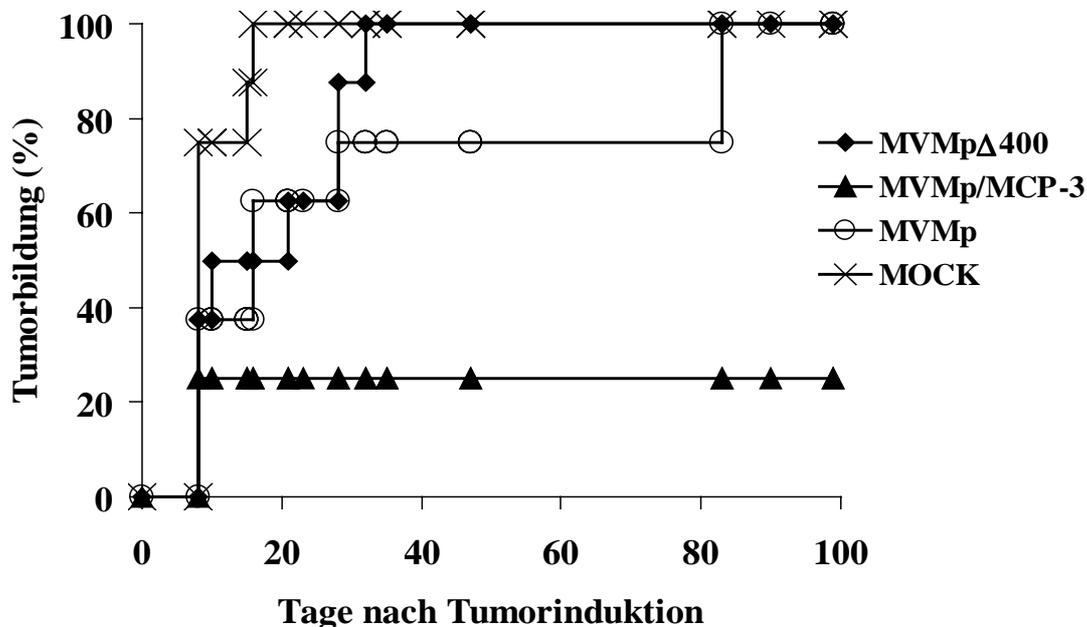
#### **3.3.1 MHC-Klasse-I-Expression der Melanomzellen wird durch eine parvovirale Infektion nicht induziert**

In FACS-Analysen läßt sich bei B78/H1-Zellen keine Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen nachweisen (Nanni *et al.*, 1998). Zur Klärung der Frage, ob eine parvovirale Infektion oder die Expression von MCP-3 zu einer Induktion der MHC-Klasse-I-Expression in B78/H1-Zellen führt, wurden *in vitro* infizierte Zellen mit einem FITC-konjugierten monoklonalen anti-H-2K<sup>b</sup> IgG2b-Antikörper inkubiert. In der anschließenden FACS-Analyse konnte keine Expression der H-2-Glycoproteine bei mock- oder Virus-infizierten B78/H1-Zellen nachgewiesen werden. Demnach führt weder die parvovirale Infektion noch die MCP-3-Produktion zu einer Induktion der MHC-Klasse-I-Moleküle (ohne Abbildung).

#### **3.3.2 MVMp/MCP-3-Infektion von B78/H1-Zellen reduziert die Tumorentstehung um 75%**

Der antineoplastische Effekt von MVMp/MCP-3 wurde mit dem von MVMp $\Delta$ 400 und dem des Wildtypvirus MVMp verglichen. Dazu wurden B78/H1-Zellen mit den unterschiedlichen MVMp-Viren *in vitro* bei einer MOI von 3 infiziert bzw. mock-infiziert und dann subkutan im Bereich der rechten Schulter syngener immunkompetenter C57BL/6-Mäuse injiziert, jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen pro Tier bei 8 Tieren pro Gruppe. Nach Transplantation wurden die restlichen Zellen aus der Spritze in Kulturschalen ausgesät und die Lebendzellzahl bestimmt, um zu verifizieren, daß in allen Gruppen gleiche Anzahl vitaler Zellen pro Tier inokuliert worden waren. Zusätzlich konnte während der folgenden Kultivierung der Zellen *in vitro* die MCP-3-Produktion der MVMp/MCP-3-infizierten Zellen überprüft werden. Die Resultate (Daten nicht gezeigt) lagen im Bereich der in Abbildung 3-6 gezeigten MCP-3-Mengen, womit eine MCP-3-Produktion der transplantierten Zellen *in vitro* bestätigt wurde.

In Abbildung 3-10 ist der Anteil tumortragender Mäuse in % im Zeitverlauf dargestellt. Nach Inokulation mock-infizierter B78/H1-Zellen (X) wurden bei allen Tieren nach 8 bis 16 Tagen Tumoren sichtbar.



**Abb. 3-10: Tumorbildung nach Inokulation infizierter B78/H1-Zellen (MOI = 3) in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen**

B78/H1-Zellen wurden mit MVMpΔ400 (◆), MVMp/MCP-3 (▲) und MVMp (O) infiziert bei einer MOI von 3 RU/Zelle, bzw. mock-infiziert (X). Pro Tier wurden  $3 \times 10^5$  infizierte Zellen subkutan injiziert. Dargestellt ist die Tumorbildung in % im Zeitverlauf bei 8 Tieren pro Gruppe.

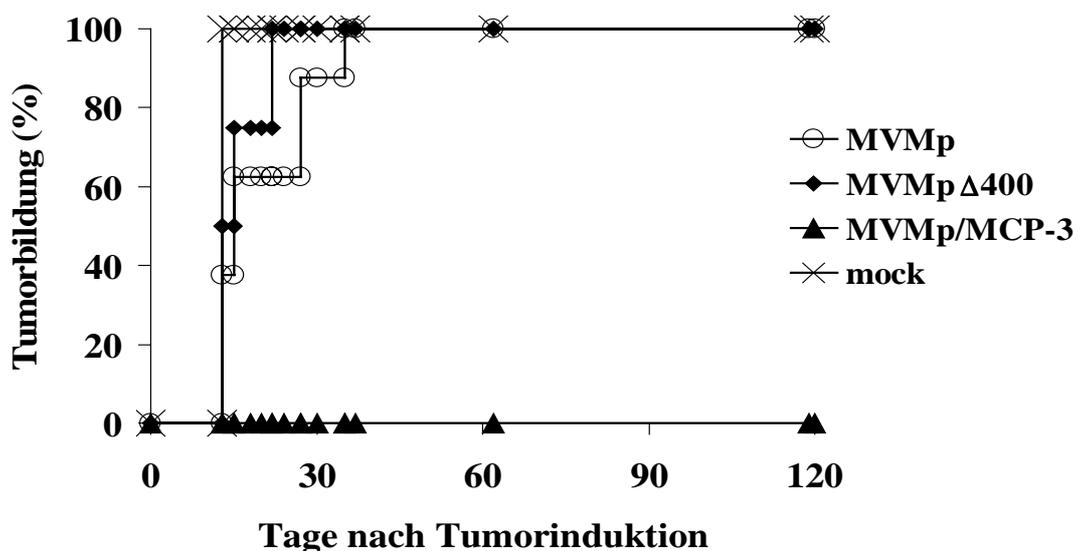
Im Vergleich dazu verzögerte die Infektion mit MVMp (O) und MVMpΔ400 (◆) vor Inokulation der Zellen die Tumorentwicklung: Nach Infektion mit MVMpΔ400 waren bei der Hälfte der Tiere 16-32 Tage nach Melanomzellimplantation Tumoren zu beobachten. Bei Infektion mit MVMp entwickelten sich bei 6 der 8 Tiere die Tumoren 8-28 Tage nach Tumorinduktion und bei den verbleibenden 2 Tieren nach 80 Tagen. Im Unterschied dazu wuchsen nach Infektion der Melanomzellen mit MVMp/MCP-3 (▲) bei 6 von 8 Tieren überhaupt keine Tumoren an. Die Wachstumsraten der entstandenen Tumoren aller Tiere unterschieden sich nicht (ohne Abbildung).

Die Infektion mit MVMp/MCP-3 bei einer MOI von 3 RU/Zelle verhinderte bei 75% der Tiere eine Tumorbildung. Um zu untersuchen, ob bei den tumorfreien Mäusen eine B78/H1-spezifische Immunität entstanden war, wurden diesen Mäuse 11 Wochen nach Inokulation der

infizierten Zellen  $3 \times 10^5$  unbehandelte B78/H1-Zellen im Bereich der linken Schulter appliziert. Zur Kontrolle der Tumorbildung und deren Wachstum wurde die gleiche Zahl Melanomzellen in unbehandelte Mäuse gleichen Alters und Hygienestatus inokuliert. Nach dieser zweiten Tumorzellimplantation bildeten alle Tiere Tumoren, die sich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit nicht unterschieden (ohne Abbildung). Daher kann bei diesen Tieren eine erworbene Immunität gegenüber B78/H1-Zellen ausgeschlossen werden.

### 3.3.3 MVMp/MCP-3-Infektion bei MOI von 10 RU/Zelle verhindert die Bildung von B78/H1-Tumoren vollständig

Durch Infektion der Melanomzellen mit MVMp/MCP-3 bei einer Infektionsmultiplizität von 3 RU/Zelle unterblieb die Tumorbildung bereits bei 75% der Tiere. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob eine höhere MVMp/MCP-3-Menge die Tumorentstehung vollständig verhindern kann. Dazu wurden B78/H1-Zellen mit MVMp/MCP-3, MVMp $\Delta$ 400 und MVMp bei einer MOI von 10 infiziert bzw. mock-infiziert und in C57BL/6-Mäuse implantiert. Danach wurden auch hier die Anzahl vitaler Zellen und die MCP-3-Produktion der infizierten Zellen kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Die Tumorbildungsraten sind in Abbildung 3-11 gezeigt.



**Abb. 3-11: Tumorbildung nach Inokulation infizierter B78/H1-Zellen (MOI = 10)**

B78/H1-Zellen wurden *in vitro* bei einer MOI von 10 RU/Zelle mit MVMp $\Delta$ 400 (◆), MVMp/MCP-3 (▲) und MVMp (O) infiziert, bzw. mock-infiziert (X). Danach wurden die infizierte Zellen subkutan in C57BL/6-Mäuse implantiert ( $3 \times 10^5$  /Tier). Dargestellt ist die Anteil der Tumorenstehung in % bei 8 Tieren je Gruppe.

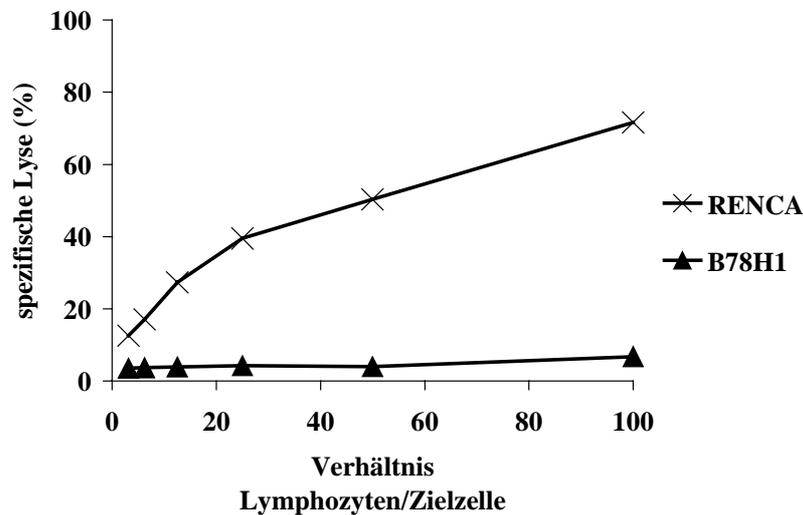
Nach Inokulation von MVMp $\Delta$ 400- (Abb.3-11,  $\blacklozenge$ ), MVMp- (O) und mock-infizierten Zellen (X) entwickelten alle Tiere Tumoren. Erwartungsgemäß führte die Infektion mit beiden Kontrollviren zu einer zeitlich verzögerten Tumorentstehung. Erneut war kein Einfluß der Virusinfektion auf die Wachstumsgeschwindigkeit der entstandenen Tumoren festzustellen (ohne Abbildung). Im Gegensatz dazu verhinderte die Infektion mit MVMp/MCP-3 ( $\blacktriangle$ ) die Tumorbildung vollständig. Dieses Ergebnis bestätigte sich in einer Wiederholung des Versuchs unter Verwendung unabhängiger Viruspräparationen.

Auch hier wurde untersucht, ob bei den 16 tumorfreien Mäusen beider Versuche eine erworbene B78/H1-spezifische Immunität vorlag. Dazu wurden 100 bzw. 120 Tage nach der Injektion infizierter Tumorzellen unbehandelte B78/H1-Zellen unter die linke Schulter der Tiere transplantiert. Zur Kontrolle des Tumorwachstums dienten wiederum unbehandelte Mäuse. Nach der zweiten Tumorzellimplantation bildeten sich bei 12 der 16 Mäuse der MVMp/MCP-3-Gruppe Tumoren zur gleichen Zeit mit gleicher Wachstumsgeschwindigkeit wie bei den Kontrolltieren. Dagegen wuchsen bei den verbleibenden 4 Tieren kein Tumoren an. Da es sich bei der erneuten Inokulation um nicht-infizierte Tumorzellen handelte, kann die Abstoßung der Tumorzellen bei den 4 Tieren nicht auf eine erworbene Immunität gegenüber dem Virus oder gegenüber dem humanen Protein (MCP-3) zurückgeführt werden.

### 3.3.4 Untersuchung der CTL-Aktivität in tumorfreien Mäusen

Bei 4 Mäusen wuchsen nach Injektion von MVMp/MCP-3-infizierten B78/H1-Zellen keine Tumoren an und auch nach erneuter Inokulation von B78/H1-Zellen entwickelten sich keine Tumoren. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob bei diesen Tieren B78/H1-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTLs) nachzuweisen waren. Dazu wurden diesen Tieren 60 Tage nach der zweiten Tumorzellgabe die Milz entnommen. Die Milzzellen der einzelnen Tiere wurden *in vitro* mit B78/H1-Zellen (H-2<sup>b</sup>) restimuliert und nach 5 Tagen in einem <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest auf eine B78/H1-spezifische zytotoxische Aktivität untersucht. Als Negativkontrolle wurden Milzzellen unbehandelter C57BL/6-Mäuse verwendet. Zur internen Positivkontrolle des Versuchs diente eine getrennte *in vitro*-Stimulierung der Milzzellen der einzelnen Tiere mit allogenen Milzzellen von BALB/c-Mäusen (H-2<sup>d</sup>). Wie in Abbildung 3-12 exemplarisch an einem Beispiel zu sehen, zeigten die Milzzellen aller Versuchstiere nach

*in vitro*-Stimulierung mit allogenen Milzzellen (BALB/c-Mäuse, H-2<sup>d</sup>) eine allo-spezifische CTL-Antwort gegenüber RENCA-Zellen (H-2<sup>d</sup>, Abb. 3-12, X). Dagegen lysierten die Milzzellen von keinem der Tiere B78/H1-Zielzellen (▲).



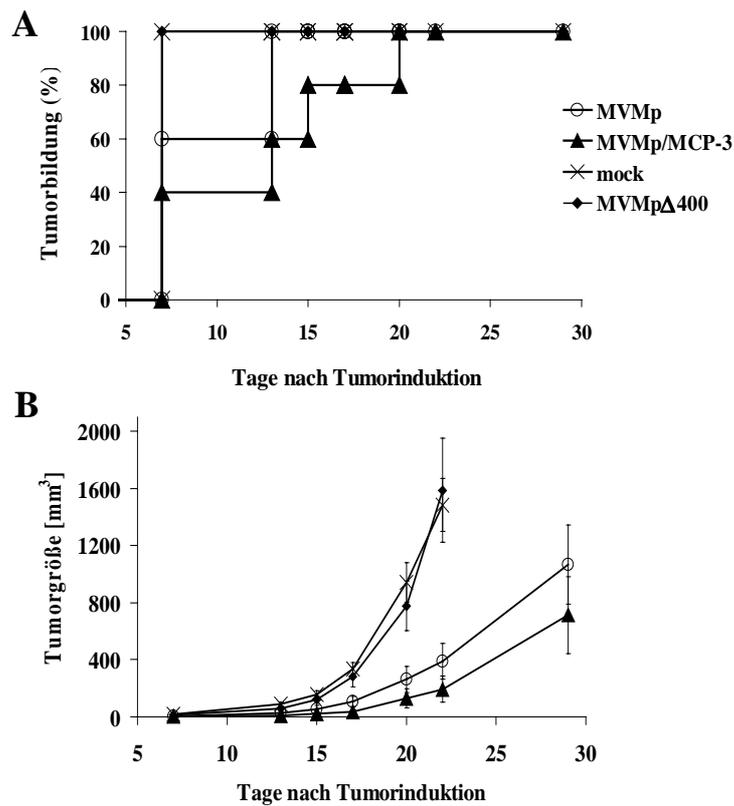
**Abb. 3-12: Zytotoxische Aktivität der Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen nach *in vitro* Stimulierung**

Milzzellen aus Mäusen, die nach Inokulation mit MVMp/MCP-3-infizierter B78/H1-Zellen und nach weiterer B78/H1-Injektion tumorfrei waren, wurden *in vitro* mit inaktivierten B78/H1-Zellen (H-2<sup>b</sup>) oder allogenen BALB/c-Milzzellen (H-2<sup>d</sup>) stimuliert und anschließend in einem <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber B78/H1-Zellen (▲) und allogenen RENCA-Zellen (X) untersucht. Dargestellt ist die spezifische Lyse in % bei aufsteigendem Lymphozyten-zu-Zielzell-Verhältnis, exemplarisch anhand von Milzzellen eines Tieres.

Im <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest konnten keine B78/H1-spezifische zytotoxische T-Zellen bei tumorfreien Mäusen der MVMp/MCP-3-Gruppe nach *in vitro*-Stimulierung nachgewiesen werden.

### 3.3.5 Wachstum präinfizierter B78/H1-Zellen in Nacktmäusen

Zur Beantwortung der Frage, ob T-Zellen an der vollständigen Suppression der Tumorbildung nach Inokulation MVMp/MCP-3-infizierter B78/H1-Zellen beteiligt sind, wurden Melanomzellen nach Infektion (MOI = 10) in T-Zell-defiziente C57BL/6-Nacktmäuse inokuliert. Abbildung 3-13 zeigt das Ergebnis eines Versuches mit 5 Tieren je Gruppe.



**Abb. 3-13: Tumorwachstum nach Inokulation präinfizierter B78/H1-Zellen in Nacktmäusen**

Nach Infektion von B78/H1-Zellen mit MVMpΔ400 (◆), MVMp/MCP-3 (▲) und MVMp (○) bei einer MOI von 10, bzw. mock-Infektion (X) wurden die infizierten Zellen subkutan in C57BL/6-Nacktmäuse implantiert ( $3 \times 10^5$  Zellen/Tier), bei 5 Tieren je Gruppe. **A)** zeigt Tumorbildung in % im Zeitverlauf. **B)** Das Tumolvolumen in  $\text{mm}^3$  wurde nach der Formel  $V = \Pi/6 \times \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe}$  errechnet.

Nach Applikation mock-infizierter Zellen (X) waren nach 7 Tagen schnell wachsende Tumoren zu beobachten. Tumoren, die aus MVMpΔ400-infizierten Zellen (◆) entstanden, unterschieden sich weder bezüglich der Tumorentstehung noch des Tumorwachstums von denen der mock-Kontrollen. Im Vergleich dazu wuchsen die Tumoren von MVMp-infizierten Zellen (○) langsamer. Auch nach Transplantation MVMp/MCP-3-infizierter Zellen (▲) entwickelten sich bei allen C57BL/6-Nacktmäusen Tumoren. Die Infektion mit MVMp/MCP-3 führte zu einem deutlich verlangsamten Tumorwachstum. Dies bedeutet, daß für die vollständige Suppression der Tumorentstehung MVMp/MCP-3-infizierter B78/H1-Zellen in immunkompetenten Mäusen T-Zellen notwendig sind. Das langsamere Wachstum

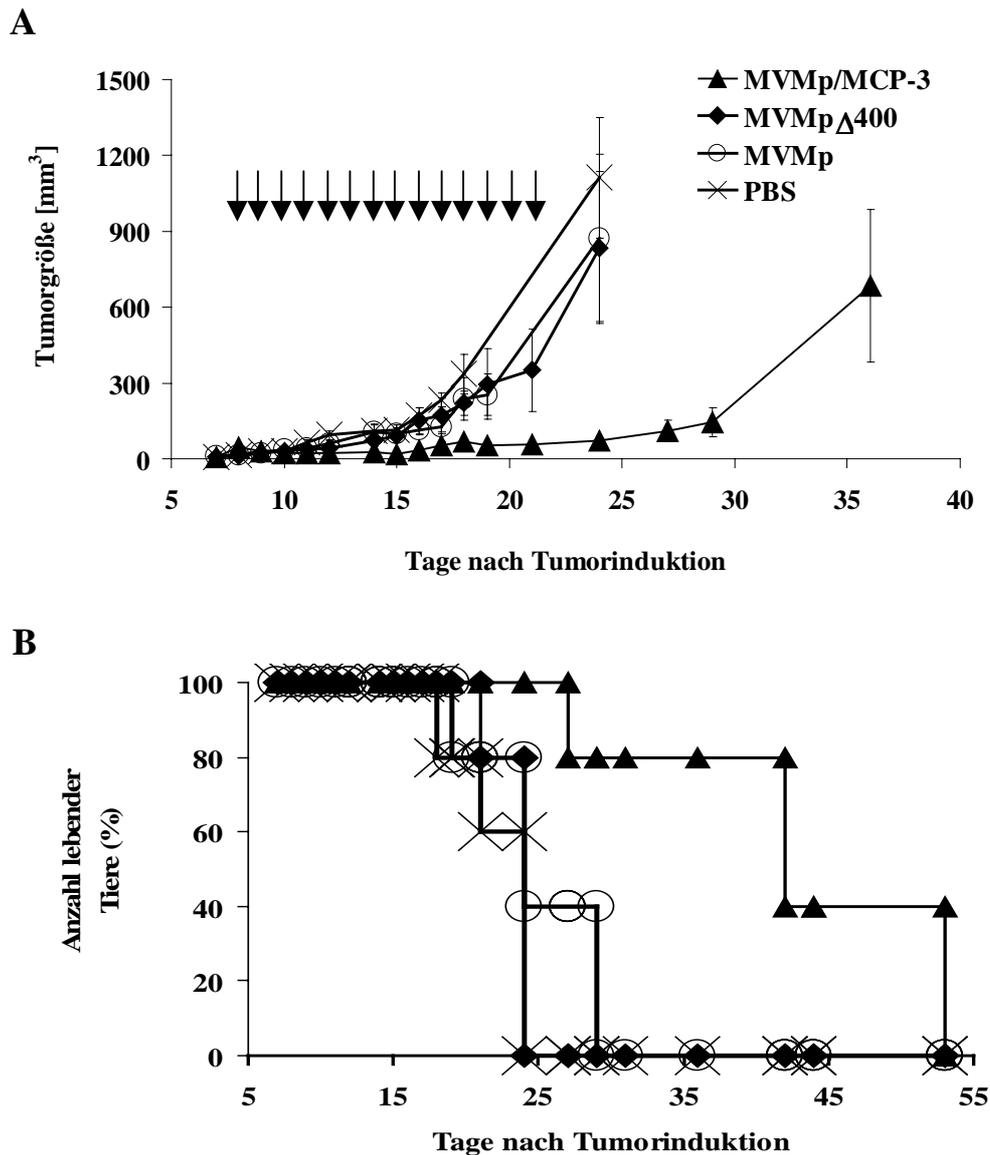
dieser Tumoren in Nacktmäusen weißt daraufhin, daß auch andere Effektoren an der antineoplastischen Wirkung von MVMp/MCP-3 beteiligt sind.

### **3.3.6 MVMp/MCP-3 inhibiert das Tumorwachstum etablierter B78/H1-Tumoren**

Die Infektion der Tumorzellen vor ihrer Implantation in Mäuse stellt eine Idealsituation dar, da beispielsweise unter *in vitro*-Bedingungen die maximale Anzahl an Zellen infiziert werden kann. Nun sollte die antitumorale Wirkung von MVMp/MCP-3 auf bereits etablierte Tumoren untersucht werden. Dazu wurden B78/H1-Melanomtumoren bei einer Größe von 2,5–3 mm<sup>3</sup> 14 Tage lang mit täglichen, peritumoralen Virusinjektionen behandelt. Bei dem in Abbildung 3-14 gezeigten Versuch mit 5 Tieren pro Gruppe lag die applizierte Gesamtdosis von MVMp (O), MVMpΔ400 (◆) und MVMp/MCP-3 (▲) bei  $2 \times 10^8$  Viruseinheiten (RU bzw. pfu) pro Tier. Dazu wurden die Virussuspensionen zur Tumorbehandlung vor Gebrauch durch Succrosegradienten von Iodixanol separiert. Zur Darstellung des normalen Tumorwachstums unter den gegebenen Bedingungen diente die Applikation von 1 x PBS.

Die Applikation von MVMp oder MVMpΔ400 zeigte keinen statistisch signifikanten Einfluß auf das Wachstum der Melanomtumoren (Wilcoxon-Rangsummentest). Einzig die Applikation von MVMp/MCP-3 führte zu einem Stillstand des weiteren Tumorwachstums. Eine Woche nach Ende der MVMp/MCP-3-Therapie begann das Tumolvolumen wieder anzusteigen. Dieser onkostatistische Effekt, d. h. die Hemmung des weiteren Tumorwachstums, führte zu einer Verdopplung der mittleren Überlebenszeit der Versuchstiere auf  $43,7 \pm 10,7$  Tage nach Tumorinduktion, anstelle von  $23,4 \pm 1,3$  Tagen (MVMpΔ400) bzw.  $25,0 \pm 4,2$  Tagen (MVMp).

Allen Tieren wurde nach zervikaler Dislokation Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Magen, Dünndarm und Lymphknoten entnommen und zur pathologischen Begutachtung gegeben. Dabei wurden keine histologischen Veränderungen der Gewebe festgestellt, die auf das Virus oder MCP-3 zurückzuführen sind (Pathologieberichte, Amelung & Gröhne, DKFZ).

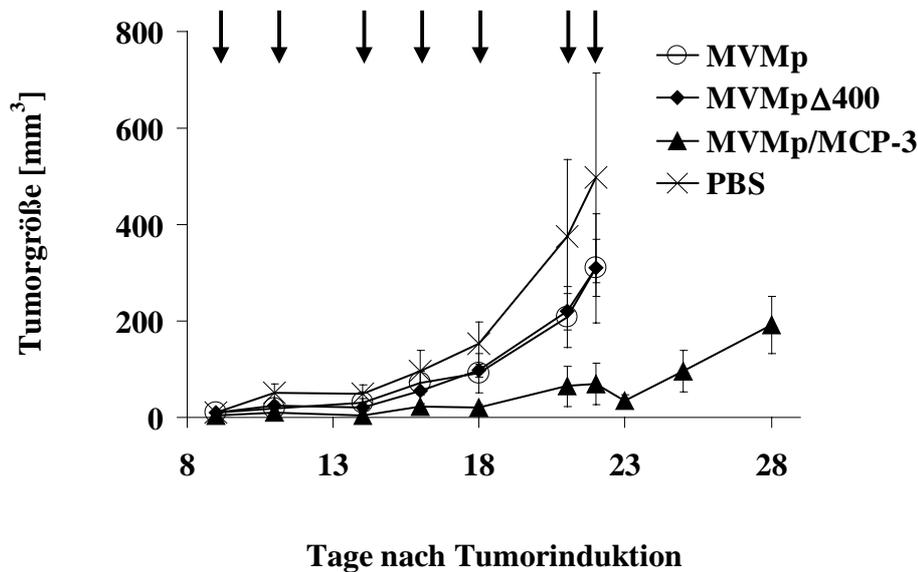


**Abb. 3-14: Behandlung etablierter B78/H1-Tumore mit täglichen Injektionen mit MVMp, MVMp/MCP-3 und MVMpΔ400**

Melanomtumoren wurden bei einer Größe von 2,5-3 mm<sup>3</sup> durch 14 tägliche peritumorale Virusinjektionen behandelt. Dabei lag die Gesamtdosis MVMp (O), MVMpΔ400 (◆) und MVMp/MCP-3 (▲) bei  $2 \times 10^8$  RU bzw. pfu pro Tier, neben einer Applikation von 1 x PBS (X), bei 5 Tieren je Gruppe. Gezeigt ist **A**) das mittlere Tumolvolumen mit Standardabweichung und **B**) Anzahl lebender Tiere in % im Zeitverlauf. Das Tumolvolumen  $V$  wurde errechnet nach  $V = \Pi/6 \times \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe}$ . RU: Replikative Einheiten, pfu: *plaque forming unit*

Um zu untersuchen, ob der gleiche onkostatistische Effekt von MVMp/MCP-3 auch mit geringerer Virusmenge zu erzielen ist, wurde der Versuch mit  $4 \times 10^7$  RU bzw. pfu/Tier wiederholt, neben einer Injektion von 1 x PBS. Bei dem zweiten Versuch, dessen Ergebnis in

Abbildung 3-15 gezeigt ist, wurde die Virusmenge auf 7 Injektionen innerhalb von 2 Wochen verteilt. Grundsätzlich konnte bei dem hier gezeigten Versuch die Hemmung des Tumorwachstums durch peritumorale MVMp/MCP-3-Injektionen bestätigt werden.



**Abb. 3-15: Behandlung etablierter B78/H1-Tumoren mit MVMp und den rekombinanten Derivaten (Gesamtdosis:  $4 \times 10^7$  Viruseinheiten)**

Melanomtumoren einer Größe von etwa  $3 \text{ mm}^3$  wurden innerhalb von 14 Tagen mit 7 peritumorale Virusinjektionen behandelt, neben einer Applikation von  $1 \times \text{PBS}$  (X). Die Gesamtvirusmenge von MVMp (O), MVMpΔ400 (◆) und MVMp/MCP-3 (▲) lag bei  $4 \times 10^7$  RU bzw. pfu pro Tier bei 5 Tieren je Gruppe. Gezeigt ist das mittlere Tumolvolumen mit Standardabweichung. Das Tumolvolumen V wurde errechnet nach  $V = \Pi/6 \times \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe}$ .

### 3.3.7 Nachweis von T-Zellen und NK-Zellen in MVMp/MCP-3-infizierten Tumoren

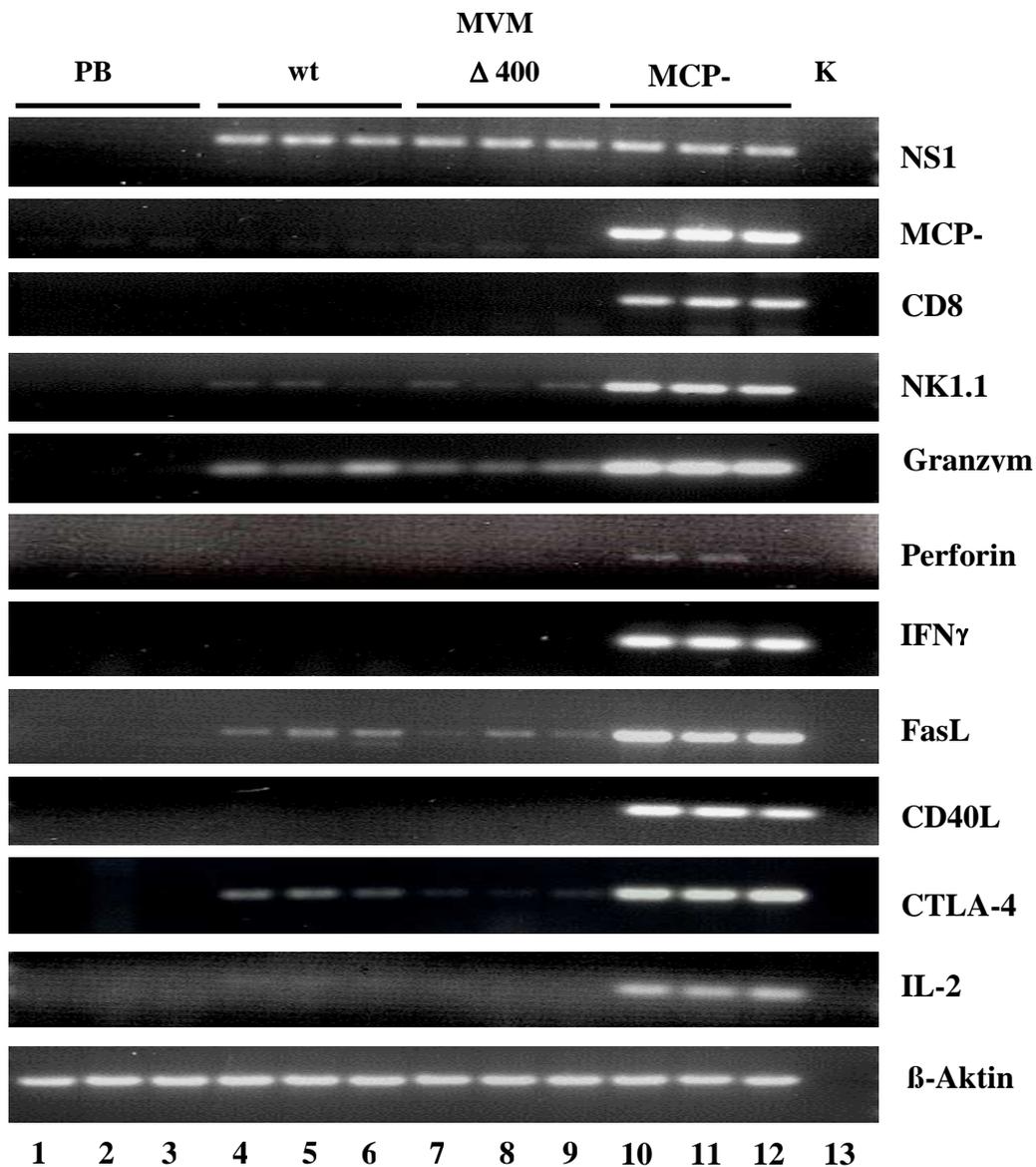
Um die Frage zu beantworten, welche Leukozytenpopulationen an der antitumoralen Wirkung von MVMp/MCP-3 auf B78/H1-Tumoren beteiligt sein können, wurde durch eine RT-PCR-Analyse *in vivo* infizierter Tumoren die Expression verschiedener Indikator- und Effektormoleküle untersucht. Dazu wurden Melanomtumoren, beginnend bei einer Tumorgöße von etwa  $5 \text{ mm}^3$ , täglich mit MVMp, MVMpΔ400 oder MVMp/MCP-3 bzw. mit

1 x PBS über einen Zeitraum von 10 Tagen mit einer Gesamtmenge von  $3 \times 10^7$  Viruseinheiten injiziert und am 11. Tag entnommen (3 Tumoren je Gruppe). Die Gesamt-RNA der Tumoren wurde in cDNA umgeschrieben, welche dann für die PCR verwendet wurde (Abb. 3-16). Die Funktionen der einzelnen Transkripte sind in der folgenden Liste aufgeführt.

<b>Transkript</b>	<b>Marker</b>
NS1, MCP-3	Virale Transkripte
CD8, NK1.1	Infiltration mononukleärer Zellen
Granzym A, Perforin, FasL, IFN- $\gamma$	Effektormoleküle von NK-Zellen und zytotoxisch aktivierter T-Zellen
CD40L, CTLA-4, IFN- $\alpha$ , IL-2	T-Zellaktivierung
COX-2, IL-12, INOS, IP-10	Makrophagen-Aktivierung
$\beta$ -Aktin	Haushaltsgen

**Tab. 3-4: Die unterschiedlichen Transkripte dienen dem Nachweis verschiedener Leukozytenpopulation bzw. ihrem Aktivierungszustandes**

$\beta$ -Aktin diene als interne Kontrolle der Verwendung gleicher cDNA-Mengen. Erwartungsgemäß konnten in allen virusinfizierten Proben (Spur 4-12) NS1-Transkripte detektiert werden und in MVMp/MCP-3-behandelten Tumoren (Spur 10–12) diejenigen von MCP-3. Die höhere Menge der CD8- und NK1.1-mRNA in Spur 10-12 läßt auf eine Rekrutierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und NK-Zellen in MCP-3-transduzierten Tumoren schließen. Der Nachweis einer höhere Transkriptmenge von CD40L und CTLA-4 in MCP-3-exprimierenden Tumoren ist ein Indiz für die Anwesenheit von aktivierten T-Zellen in diesen Tumoren. In diesen Tieren können sowohl aktivierte T-Zellen als auch aktivierte NK-Zellen Zielzellen durch Sekretion von Perforin zusammen mit Granzymen lysieren. Die deutlich höhere Amplifikation der cDNA dieser Marker zusammen mit einer höheren Transkription von FasL, IFN- $\gamma$  und IL-2 in den Proben 10-12 deutet auf die Aktivierung von T-Zellen bzw. NK-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen in MVMp/MCP-3-infizierten Tumoren hin.



**Abb. 3-16: Expression von Indikator- und Effektormolekülen verschiedener Leukozyten in B78/H1-Tumoren nach *in vivo* Infektion mit verschiedenen MVMp-Viren.**

Etablierte B78/H1-Tumore wurden mit 10 täglichen Injektionen von insgesamt  $3 \times 10^7$  Viruseinheiten MVMp (Spur 4 - 6), MVMp $\Delta$ 400 (Spur 7 - 9) oder MVMp/MCP-3 (Spur 10 - 12) bzw. mit PBS (Spur 1- 3) behandelt. Nach Entnahme der Tumore wurde die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und diese danach für PCR eingesetzt. K: Gesamt-RNA anstelle von cDNA MVMp/MCP-3-infizierter Tumore

In dieser Untersuchung konnten keine Transkripte von COX-2, IL-12p40, IFN- $\alpha$  oder iNOS beobachtet werden (ohne Abbildung), womit eine Aktivierung von Makrophagen nicht nachgewiesen werden konnte. IP-10 wird konstitutiv von B78/H1-Zellen exprimiert. Eine zusätzliche Induktion durch eine Infektion war nicht zu beobachten (ohne Abbildung).

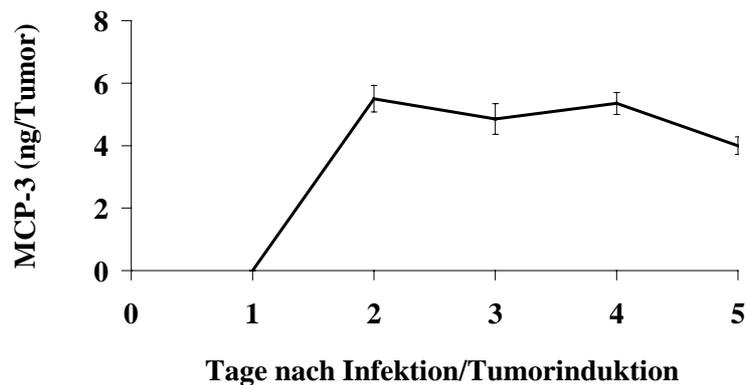
Zusammenfassend ist eine MVMp/MCP-3-Behandlung etablierter B78/H1-Tumore mit der Anwesenheit aktivierter T-Zellen und NK-Zellen verbunden. Diese Leukozyten können sowohl durch Sekretion von Perforin und Granzym A, als auch über Fas/FasL-Bindung Apoptose in den Zielzellen induzieren.

### **3.4 Die antineoplastische Wirkung von pH1/MCP-3 in Nacktmäusen**

Bisher konnten die antitumoralen Eigenschaften von MVMp-MCP-3 im syngenem B78H1-Tumormodell gezeigt werden. Hinsichtlich einer späteren klinischen Anwendung wurden im HeLa/Nacktmaus-Tumormodell H-1-Derivate verwendet, da H-1 in Menschen eine Virämie auslöst, im Gegensatz zu MVMp. Der Effekt des MCP-3-rekombinanten Vektors hH1/MCP-3 wurde mit dem des transgenfreien oder GFP-tragenden Äquivalent verglichen.

#### **3.4.1 MCP-3-Expression in vivo**

Bisher konnte gezeigt werden, daß HeLa-Zellen *in vitro* nach hH1/MCP-3-Infektion MCP-3 produzieren. Zum Nachweis, daß diese Zellen auch im Tier MCP-3 sekretieren, wurden mit hH1/MCP-3-, hH1/GFP- bzw. mock-infizierte HeLa-Zellen in Nacktmäuse transplantiert ( $2 \times 10^6$  Zellen/Tier). Die Tumoren wurden 1–5 Tage nach Inokulation entnommen und homogenisiert, wonach die MCP-3-Menge mittels ELISA in den Extrakten bestimmt wurde. In Homogenaten mock- bzw. hH1/GFP-infizierter Tumoren konnte kein humanes MCP-3 nachgewiesen werden. In Extrakten hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Tumoren waren von Tag 2 an bis Tag 5 nach Inokulation signifikante MCP-3-Mengen nachweisbar (Abb. 3-17). Der MCP-3-Gehalt lag zwischen 5,6–4,0 ng/Tumor bis Tag 5 nach Inokulation. Damit konnte die MCP-3-Produktion hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Zellen *in vivo* nachgewiesen werden. Im Blutserum der Tiere war kein MCP-3 nachzuweisen.



**Abb. 3-17: MCP-3-Expression hH1/MCP-3-infizierten HeLa-Zellen im Tier**

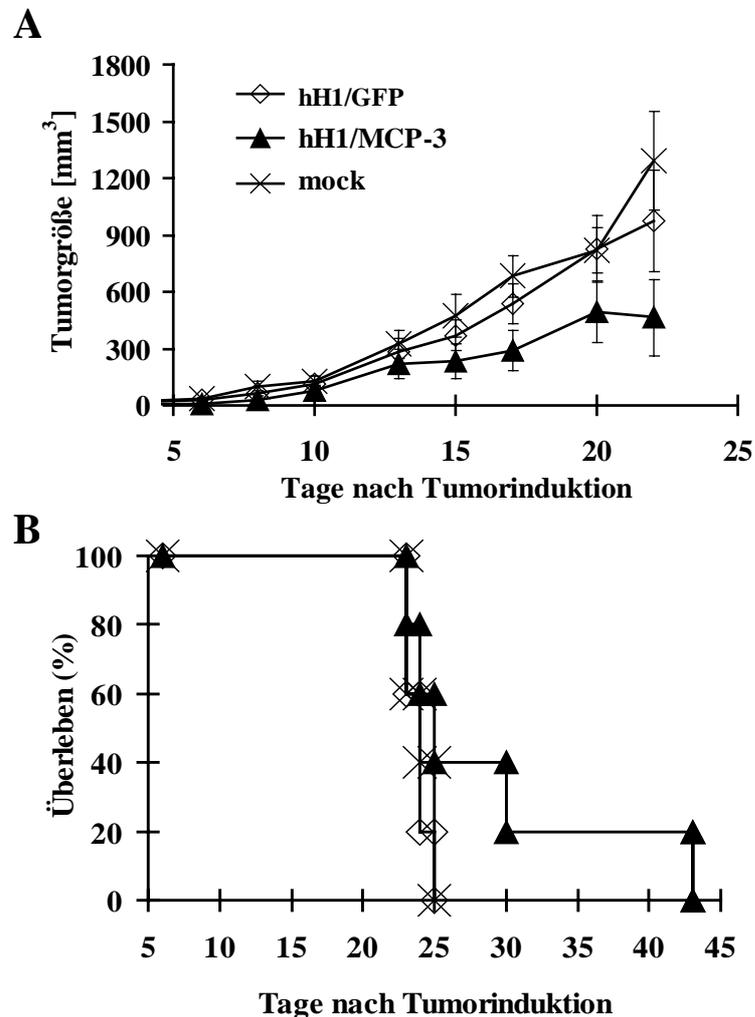
$2 \times 10^6$  hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Zellen wurden in Nacktmäuse implantiert. Nach 1–5 Tagen wurden die Tumoren entnommen, homogenisiert und in den Extrakten die MCP-3-Menge mittels ELISA bestimmt.

### **3.4.2 Retardiertes Tumorwachstum von hH1/MCP-3-infizierten HeLa-Zellen in Nacktmäusen**

Nachdem *in vitro* ein hoher Anteil infizierter HeLa-Zellen und eine Transgenexpression *in vivo* nachgewiesen worden war, sollte als nächstes die Wirkung des MCP-3-rekombinanten parvoviralen Vektors hH1/MCP-3 auf Tumorbildung und -wachstum nach Applikation infizierter HeLa-Zellen in Swiss CD1 *nu/nu*-Mäusen untersucht werden. Dazu wurden HeLa-Zellen *in vitro* mit hH1/MCP-3 bei einer Infektionsmultiplizität von 1 RU/Zelle infiziert und subkutan im Bereich der rechten Schulter der Nacktmäuse inokuliert ( $2 \times 10^6$  Zellen pro Tier). Zur Darstellung des Tumorwachstums von HeLa-Zellen in Nacktmäusen unter den gegebenen Bedingungen dienten mock-infizierte Zellen. hH1/GFP wurde als Kontrollvirus verwendet, um den Einfluß des Vektors bzw. der NS-vermittelten Lyse zu bestimmen.

Nach der Transplantation wurden die restlichen Zellen aus der Spritze in Kulturschalen ausgesät und die Lebendzellzahl bestimmt, um die applizierte Zellzahl zu kontrollieren. Das Medium der hH1/MCP-3-infizierten Zellen wurde auf seinen MCP-3-Gehalt getestet, wobei die Resultate (ohne Abbildung) im Bereich der in Abbildung 3-6 gezeigten MCP-3-Mengen lagen.

Abbildung 3-18 zeigt das Ergebnis eines Versuchs mit 5 Mäusen pro Behandlungsgruppe. Alle Tiere entwickelten 6–8 Tage nach Induktion sichtbare Tumoren, woraufhin das Tumolvolumen 3 mal pro Woche bestimmt wurde.



**Abb. 3-18: Retardiertes Tumorwachstums nach Inokulation hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Zellen in Nacktmäusen**

HeLa-Zellen wurden *in vitro* mock-infiziert (X) bzw. mit hH1/MCP-3 (▲) oder hH1/GFP (◇) bei einer MOI von 1 RU/Zelle infiziert und dann subkutan in Swiss CD1-Nacktmäuse implantiert (2 x 10<sup>6</sup> Zellen/Tier) bei 5 Tieren pro Gruppe.

**A)** Tumorgroße mit SEM (*standard error of the mean*) in mm<sup>3</sup> **B)** Überleben in % im Zeitverlauf. Die Mäuse wurden bei einer Tumorgroße von 1,2 – 1,5 cm<sup>3</sup> getötet.

Die Inokulation mock-infizierter HeLa-Zellen (X) führte erwartungsgemäß zur Bildung schnell wachsender Tumoren. Im Vergleich dazu führte die Verwendung von hH1/GFP (◇) zu einem geringfügig langsameren Tumorwachstum. Aufgrund der niedrigen Tierzahl pro Gruppe war dieser Unterschied nach dem ANOVA-Test jedoch nicht statistisch signifikant.

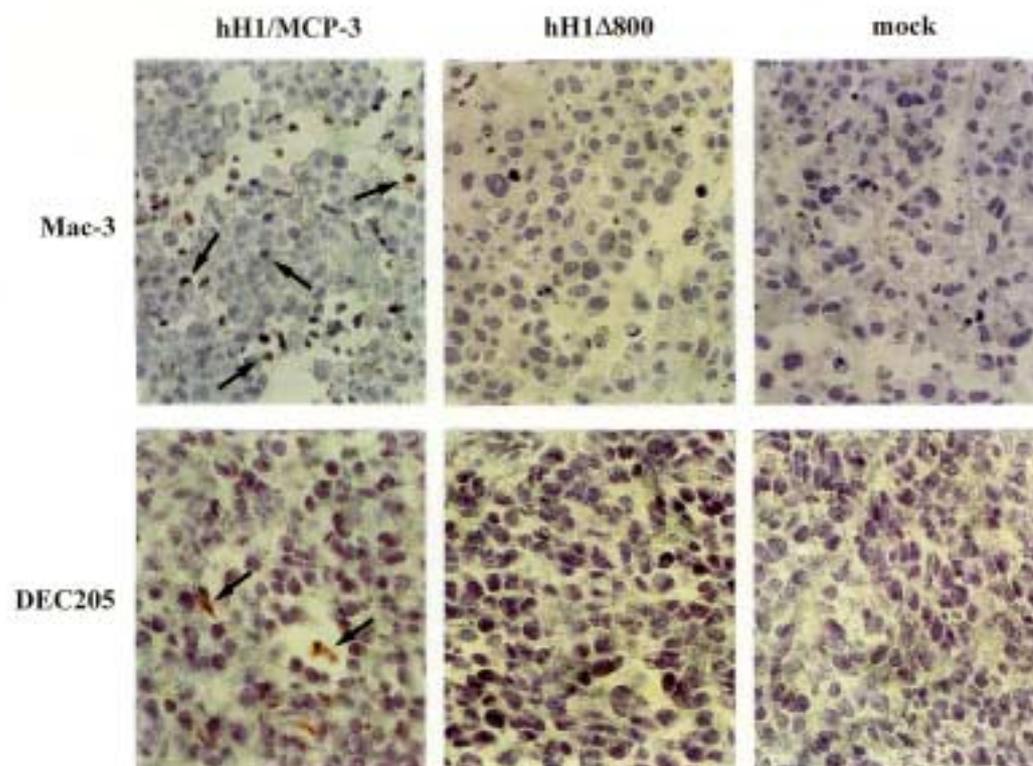
Im Gegensatz dazu wuchsen die Tumoren, die aus hH1/MCP-3-infizierten HeLa-Zellen (▲) entstanden waren, mit einer signifikant niedrigeren Wachstumsrate ( $p < 0,001$ ; ANOVA-Test, Rittgen, DKFZ) deutlich langsamer als diejenigen der Kontrolltiere. Daraus resultierte eine Verlängerung der Überlebenszeit bei 2 von 5 Tieren der hH1/MCP-3-Gruppe, gegenüber hH1/GFP- bzw. mock-Infektion, die bei einer Tumorgroße von  $1,2 - 1,5 \text{ cm}^3$  getötet wurden (Abb. 3-18 B). Zwei weitere Versuche unter Verwendung unabhängiger Viruspräparationen mit hH1 $\Delta$ 800 als Vergleichsvirus bestätigten die Ergebnisse. Die Infektion mit hH1/MCP-3 der humanen Zervixkarzinomzellen bei einer geringen MOI von 1 RU/Zelle vor Implantation in Nacktmäusen führt zu einem retardierten Tumorwachstum.

### **3.4.3 Infiltration von Makrophagen und DC in Tumoren hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Zellen**

Zur immunhistochemischen Untersuchung *ex vivo* infizierter HeLa-Tumoren wurden Zellen bei einer MOI von 1 RU/Zelle mit hH1/MCP-3, hH1 $\Delta$ 800 bzw. mock-infiziert und subkutan in Swiss CD1-Nacktmäuse injiziert. Von 3 und 5 Tage alten Tumoren wurden Paraffin- und Gefrierschnitte hergestellt und immunhistochemisch untersucht. Paraffinschnitte wurden unter Verwendung eines Mac-3-spezifischen Antikörpers immunhistochemisch gefärbt. Die Kryostatschnitte wurden mit einem gegen DEC205 gerichteten Antikörper behandelt. Zellen, die Mac-3 bzw. DEC205-Antigen exprimieren, sind an der bräunlichen Färbung zu erkennen (Abb. 3-19). Zusätzlich diente eine Haematoxilin-färbung der Paraffinschnitte zur Differenzierung von polymorphen und mononukleären Zellen.

In der Tumorperipherie aller Tumoren waren eine Vielzahl neutrophiler Granulozyten, mononukleärer Zellen und Mac-3<sup>+</sup>-Zellen zu beobachten (ohne Abbildung). Dies deutet auf eine inflammatorische Reaktion durch die Injektion der Tumorzellen hin.

Bei einer Untersuchung der zentralen Tumormasse war ein deutlicher Unterschied zwischen Tumoren mock- bzw. hH1 $\Delta$ 800-infizierter HeLa-Zellen und denen hH1/MCP-3-infizierter Zellen zu erkennen. Im Inneren der Kontrolltumoren waren im wesentlichen keine Mac-3<sup>+</sup> Zellen zu erkennen (Abb.3-19, oberer Teil). Dagegen führte die hH1/MCP-3-Infektion zu einer ausgeprägten Infiltration von Mac-3<sup>+</sup> Zellen in das Tumorzentrum. Mac-3 wird neben Makrophagen auch von Endothelzellen und dendritischen Zellen exprimiert.



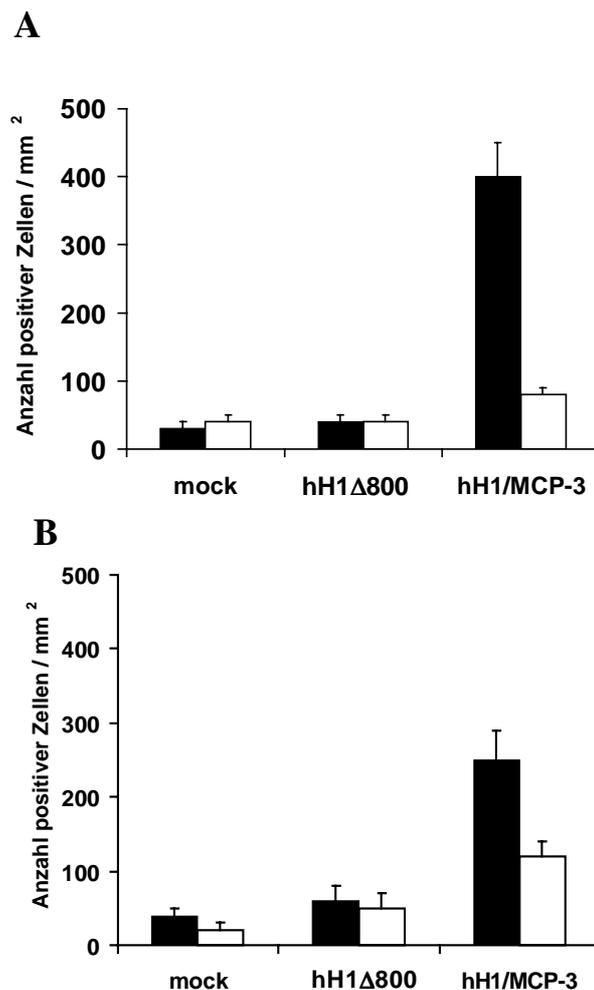
**Abb. 3-19: Immunhistochemische Analyse *ex vivo* infizierter HeLa-Tumore**

Nach Infektion mit hH1/MCP-3 oder hH1 $\Delta$ 800 bei einer MOI von 1 RU/Zelle, bzw. mock-Infektion, wurden  $5 \times 10^6$  HeLa-Zellen pro Nacktmaus injiziert. Von 3 Tage alten Tumore (3 Tumoren pro Gruppe) wurden Paraffin- und Gefrierschnitte immunhistochemisch gefärbt

Obere Reihe: Paraffinschnitte, nach Behandlung mit monoklonalem anti-Mac-3 Rattenantikörper.

Untere Reihe: Kryostatschnitte, nach Behandlung mit monoklonalem anti-DEC205 Rattenantikörper. Die Antikörperbindung wurde nach Inkubation mit biotinyliertem anti-Ratte Zweitantikörper durch Umsetzung des Substrats (AEC) Streptavidin-gekoppelter Peroxidase sichtbar gemacht.

Aufgrund der Morphologie der gefärbten Zellen können endotheliale Zellen ausgeschlossen werden und dendritische Zellen sind in dieser Häufigkeit nicht anzutreffen, wie auch die DEC205-Färbung belegt (Abb. 3-19, unterer Teil). Der DEC205-Antikörper erkennt in Nacktmausgeweben spezifisch dendritische Zellen. DEC205<sup>+</sup>-Zellen waren nur in MCP-3-transduzierten Tumoren nachzuweisen. Diese Ergebnisse wurden 5 Tage alten Tumoren nach Induktion bestätigt.



**Abb. 3-20: Quantifizierung der Infiltration von Mac-3<sup>+</sup>- und DEC205<sup>+</sup>-Zellen in HeLa-Tumoren**

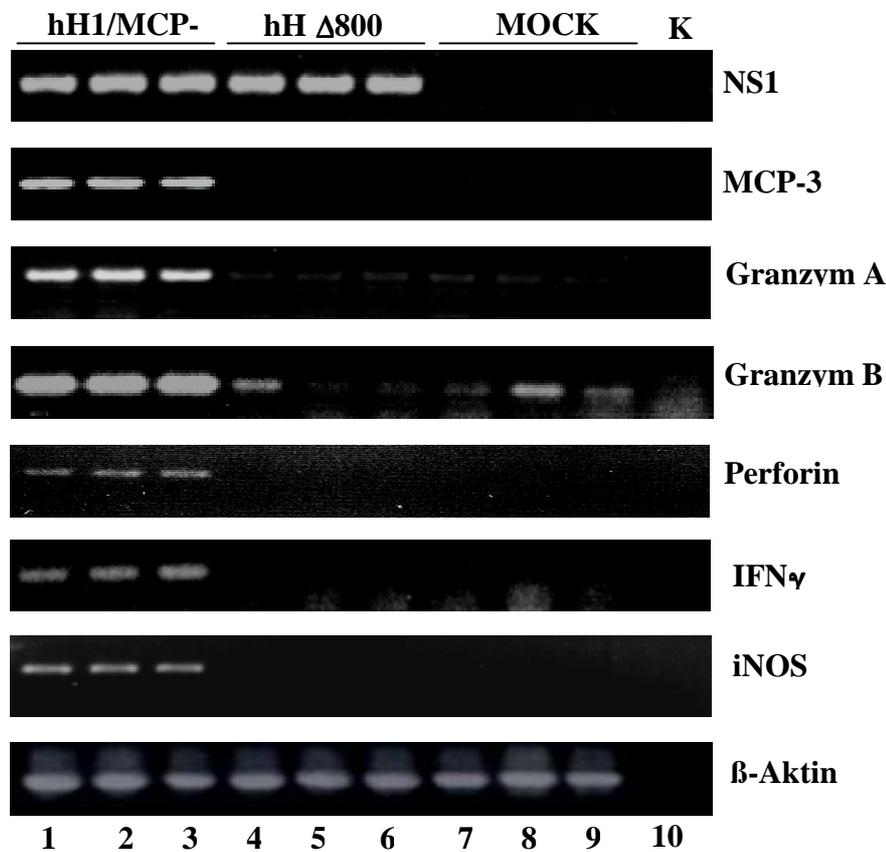
Mac-3<sup>+</sup>-Zellen (schwarze Säulen) und DEC205<sup>+</sup>-Zellen (weiße Säulen) in Tumoren, die aus hH1Δ800, hH1/MCP-3 oder mock-infizierten HeLa-Zellen entstanden. Bei 100-facher Vergrößerung wurden 2 Tumoren einer Gruppe je 10 randomisierten Felder ausgezählt. Dargestellt sind die Anzahl Zellen/mm<sup>3</sup> mit Standardabweichung für Tumoren **A**) 3 Tage und **B**) 5 Tage nach Inokulation. Immunhistologie mit monoklonalem anti-Mac-3 und anti-DEC205 Antikörpern.

Zur Quantifizierung dieser Beobachtungen wurden positive Zellen in 2 Tumoren einer Behandlungsgruppe in jeweils 10 randomisierten Feldern bei 100-facher Vergrößerung in einem 1 mm<sup>3</sup>-Gitter gezählt. Dabei zeigte sich (Abb. 3-20), daß Mac-3<sup>+</sup>-Zellen (schwarze Säulen) zu beiden Zeitpunkten in hH1/MCP-3-infizierten Tumoren zehnmal häufiger anzutreffen waren, als in hH1Δ800-infizierten HeLa-Tumoren. Die Anzahl dendritischer Zellen (graue Säulen) lag in Tumoren hH1/MCP-3-infizierter Zellen fünfmal höher als in den Kontrolltumoren.

Das retardierte Tumorwachstum hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Zellen ist demnach mit einer massiven Infiltration von Makrophagen und einer Einwanderung von dendritischen Zellen in das Tumorrinnere verbunden.

#### **3.4.4 RT-PCR-Analyse zum Nachweis der Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen**

Aufgrund des Zielzellspektrums von MCP-3 wurde nun untersucht, ob eine Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen in MCP-3-transduzierten HeLa-Zelltumoren vorlag. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Tumoren isoliert, die 3 Tage nach Transplantation *ex vivo* infizierter Zellen entnommen worden waren, und für RT-PCR-Analyse eingesetzt. β-Aktin diente als interne Kontrolle der Verwendung gleicher Mengen cDNA. Erwartungsgemäß konnten in den virusinfizierten Proben (Abb. 3-21, Spur 1-6) NS1-Transkripte und bei Verwendung von hH1/MCP-3 (Spur 1-3) MCP-3-mRNA nachgewiesen werden. Die deutlich höhere Amplifikation der cDNA von Perforin, Granzym A und B, sowie IFN-γ in MCP-3-exprimierenden Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen läßt auf die Anwesenheit aktivierter NK-Zellen schließen. In Tumoren hH1Δ800- und mock-infizierter Zellen war eine geringe Transkription der Granzyme nachweisbar. Außerdem waren iNOS-Transkripte ausschließlich in MCP-3-transduzierten Tumoren nachgewiesen werden, was ein starkes Indiz für die Anwesenheit aktivierter Makrophagen in diesen Tumoren ist.

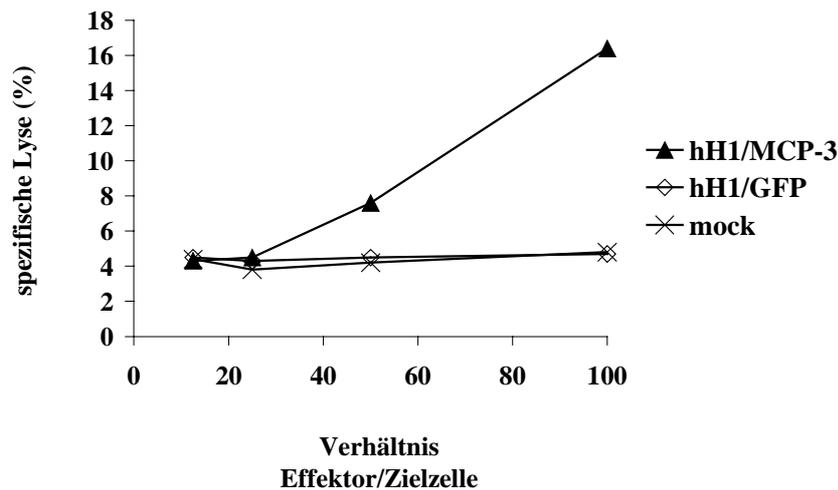


**Abb. 3-21: RT-PCR-Analyse zum Nachweis der Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen**

$2 \times 10^7$  HeLa-Zellen, *in vitro* infiziert mit hH1/MCP-3 (Spur 1 - 3), hH1 $\Delta$ 800 (Spur 4 - 6) bzw. mock-infiziert (Spur 1 - 3) wurden in Swiss CD1-Nacktmäuse transplantiert. Nach Entnahme der Tumore 3 Tage nach Tumorinduktion wurde die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und diese danach für PCR eingesetzt. K: Vollständiger Versuch ohne Gesamt-RNA.

Die Aktivierung von Makrophagen zu lytischen Effektorzellen durch parvoviral transduziertes MCP-3 konnte auch *in vitro* nachgewiesen werden. Dazu wurden Makrophagen durch *Lavage* des Peritoneums von Nacktmäusen isoliert und *in vitro* stimuliert durch Inkubation mit MCP-3-haltigem (40 ng) Medium hH1/MCP-3 infizierter HeLa-Zellen oder Medium von hH1 $\Delta$ 800-infizierter Zellen, bzw. nicht-konditionierten Medium. Die lytische Aktivierung der stimulierten Makrophagen wurde nach Kultivierung mit HeLa-Zellen anhand der durch abgestorbene Zellen freiwerdenden LDH-Menge bestimmt (Abb. 3-22).

Medium hH1Δ800-infizierter HeLa-Zellen (◇) führte zu keiner Stimulierung der lytischen Eigenschaften der PEM, im Vergleich zu unkonditioniertem Medium (X). Dagegen erreichte die spezifische Lyse der Makrophagen, die mit MCP-3-haltigen Medium stimuliert worden waren, 16% (Abb. 3-22, ▲) bei einem Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 100:1, im Vergleich zu 4 - 5% im Falle der Kontrollen.



**Abb. 3-22: Die lytische Aktivität peritonealer Exsudatmakrophagen aus Nacktmäusen nach Stimulierung mit MCP-3 gegenüber HeLa-Zellen**

Peritoneale Exsudat-Makrophagen (PEM) aus Swiss CD1-*nu/nu*-Mäusen wurden *in vitro* stimuliert mit Medium, welches von hH1/MCP-3 (▲), hH1Δ800 (◇) bzw. mock-infiziert (X) infizierten HeLa-Zellen stammte. Nach Kokultivierung mit frischen HeLa-Zellen wurde die zytolytische Aktivität der PEM anhand der LDH-Menge im Kulturmedium bestimmt. von HeLa-Zellen, worden waren. Dargestellt ist die spezifische Lyse in % bei aufsteigendem Effektor(PEM)/Zielzell(HeLa)-Verhältnis.

Die Steigerung der spezifischen Lyse um das 3- bis 4-fache durch Stimulierung der PEM mit MCP-3-haltigem Medium konnte in zwei weiteren Versuchen bestätigt werden. Das Ergebnis zeigt, daß MCP-3-haltiges Medium hH1/MCP-3-infizierter HeLa-Zellen Makrophagen von Swiss CD1 *nu/nu*-Nacktmäusen stimulieren kann, HeLa-Zellen abzutöten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß in diesem Tumormodell die Infektion von HeLa-Zellen mit hH1/MCP-3 bei einer niedrigen Infektionsmultiplizität von 1 RU/Zelle zu einem verlangsamten Tumorwachstum in Nacktmäusen führt, das mit einer Anlockung und Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen assoziiert ist.

## 4 Diskussion

### 4.1 Überblick

In dieser Arbeit wurde die antitumorale Wirkung MCP-3-rekombinanter Parvoviren, im Vergleich zu MVMp und MVMp $\Delta$ 400, auf schwach immunogene B78/H1-Melanomtumoren in immunkompetenten Mäusen untersucht. Außerdem wurde der Einfluß von hH1/MCP-3 auf humane Zervixkarzinomzellen in Nacktmäusen bestimmt, verglichen mit dem von hH1 $\Delta$ 800.

Zu Beginn dieser Untersuchung zeigte sich bei der Virusproduktion, daß eine Verwendung eines Iodixanolgradienten zur Aufreinigung rekombinanter MVMp-Viren zu einer entscheidend höheren Ausbeute führt. In der vorliegenden Arbeit bestätigte sich *in vitro* eine hohe Transgenexpression nach einer parvoviraler Infektion. Die Ergebnisse diese Arbeit zeigen aber vor allem die ausgeprägte antitumorale Wirkung MCP-3-rekombinanter parvoviraler Vektoren:

- 1) Die Infektion von B78/H1-Zellen mit MVMp/MCP-3 (MOI 10) vor Implantation in immunkompetente Mäuse verhinderte das Anwachsen der Tumoren, während nach Infektion mit MVMp oder MVMp $\Delta$ 400 bei allen Tieren mit zeitlicher Verzögerung Tumoren entstanden.
- 2) Die Behandlung bereits etablierter B78/H1-Melanomtumoren mit MVMp/MCP-3 führte zum Stillstand des Tumorwachstums über den Behandlungszeitraum. Die Applikation der Kontrollviren zeigte dagegen keine Wirkung.
- 3) Dieser antitumorale Effekt von MVMp/MCP-3 auf B78/H1-Melanomtumoren war T-Zell-abhängig und verbunden mit einer Anlockung und Aktivierung von NK-Zellen.
- 4) Die hH1/MCP-3-Infektion der HeLa-Zellen führte bereits bei einer MOI von 1 RU/Zelle zu einem deutlich retardierten Tumorwachstum nach Implantation in Nacktmäuse, während die Infektion mit dem transgenfreien Vektor keinen signifikanten Einfluß auf das

---

Tumorwachstum hatte. Der antitumorale Effekt von hH1/MCP-3 korrelierte mit einer Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen.

## **4.2 Die Verwendung eines Iodixanolgradienten zur Aufreinigung verbessert die Ausbeute rekombinanter MVMP-Viren**

Der limitierende Faktor für experimentelle und therapeutische Anwendungen viraler Vektoren ist die Verfügbarkeit ausreichender Mengen rekombinanter Viren. In der vorliegenden Arbeit lag die Produktion aufgereinigter rekombinanter H-1- und MVMP-Viren (3.1.2/3.1.3) im Bereich von  $10^7$  infektiösen Partikeln pro ml Virussuspension und damit bis zu  $10^4$ -fach höher, als bisher für vergleichbare MVMP-Vektoren beschrieben (Brandenburger & Russell, 1996, Avalosse *et al.*, 1996). Die hier verwendeten Viruspräparationen waren zu maximal 0,1% mit replikationskompetenten Viren kontaminiert. Damit lag die Kontamination wesentlich niedriger, als sie für ähnliche MVMP-Vektoren mit bis zu 47% beschrieben wurde (Brandenburger & Russell, 1996; Russell *et al.*, 1992).

Aufgrund der hohen Sensitivität von HeLa-Zellen gegenüber einer H-1-Infektion konnten hinreichende Mengen H-1-Derivate für die Untersuchungen dieser Arbeit hergestellt werden. Im Falle der MVMP-Viren war dies jedoch nicht gegeben. Als Alternative zu Cäsiumchlorid wurde in dieser Arbeit Iodixanol als Dichtezentrifugationsmedium zur Aufreinigung von MVMP-Derivaten verwendet. Im wesentlichen wurde ein diskontinuierlicher Iodixanolgradient eingesetzt, der zur Aufreinigung von AAV-Partikeln beschrieben worden war (Zolotukhin *et al.*, 1999). Der Gradient wurde für die Bedingungen im Labor adaptiert und soweit verbessert, daß größere Mengen Virussuspension pro Gradient aufgereinigt werden konnten, um eine weitere Konzentrierung der Viren zu erreichen. Die Verwendung dieses Gradienten führte zu einer reproduzierbaren Verminderung der Verluste infektiöser Partikel von mehr als 50% gegenüber der Verwendung von CsCl-Gradienten, ohne Einbußen der Reinheit der Virussuspension (3.1.4). Darüber hinaus verkürzt sich die Aufreinigung rekombinanter Viren um 2 Tage.

### 4.3 Rekombinante Parvoviren vermitteln eine hohen Transgenproduktion der infizierten Zellen

In dieser Arbeit wurde MCP-3 als Transgen ausgewählt. Obwohl Murakami *et al.* (1997) von einer geringen MCP-3-Transkription in HeLa-Zellen berichteten, konnte in dieser Arbeit weder auf Ebene der Transkription (3.4.4) noch auf Proteinebene (3.2.3) eine MCP-3-Expression der HeLa-Zellen festgestellt werden.

Haag *et al.* (2000) berichteten von einer transient hohe Transgenproduktion nach Infektion mit parvoviralen Vektoren. Die Produktion entsprach dabei derjenigen nach Infektion mit Adenoviren. Die Chemokinmenge, die nach hH1/MCP-3-Infektion von HeLa-Zellen sekretiert wurde, lag auf vergleichbar hohem Niveau, wie die bei Haag *et al.* (2000) beschriebene (3.2.3). Der transiente Verlauf der Transgenproduktion wurde in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt und ist wahrscheinlich auf die NS-vermittelte Zytotoxizität der Viren zurückzuführen. Die MCP-3-Sekretion infizierter B78/H1-Zellen erreichte ungefähr  $\frac{1}{4}$  der Produktion der HeLa-Zellen. Damit lag sie immer noch 50-mal höher, als die durch *Semliki Forest Virus*-Vektoren vermittelte Transgenproduktion (Asselin-Paturel *et al.*, 1998). Die Fähigkeit rekombinanter Parvoviren zur DNA-Amplifikation zusammen mit der starken NS1-Transaktivierung des viralen P38-Promotors, der die MCP-3-Transkription steuert, sind wahrscheinlich für die hohe Transgenexpression verantwortlich (Kestler *et al.*, 1999).

Auch im Tier konnte die Produktion signifikanter Mengen des Chemokins von hH1/MCP-3-infizierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden (3.1.4). Da Chemokine Gradienten bilden, ist die geringe nachgewiesene MCP-3-Menge auf eine schnelle Verteilung des Chemokins in der Maus zurückzuführen.

B78/H1-Zellen zeigten gegenüber einer parvoviralen Infektion eine geringere Sensitivität im Vergleich zu HeLa-Zellen (3.2.1/3.2.2). Eine mögliche Erklärung dafür kann in einer Expression des funktionellen p53-Proteins in den Melanomzellen bestehen. Es wurde gezeigt, daß humane K562-Leukämiezellen, die resistent gegenüber einer H-1-Infektion waren, Wildtyp-p53-Protein exprimierten, im Gegensatz zu den K562-Zellen, die permissiv für eine H-1-Infektion waren. Die Inaktivierung von funktionellem p53-Protein in embryonalen Rattenfibroblasten führte zu einer hohen Sensitivität dieser Zellen gegenüber einer parvoviralen Lyse. Die Expression des Wildtyp-p53-Proteins kann demnach zu einer

zellulären Resistenz gegenüber einer parvoviralen Infektion führen (Telerman *et al.*, 1993). Zumindest für die parentale B16-Zelllinie konnte die Expression des Wildtyp-p53 gezeigt werden (David-Pfeuty *et al.*, 1996).

## 4.4 Parvovirale Vektoren im Tierversuch

### 4.4.1 Der Einfluß der Parentalviren und ihrer Derivate auf das Wachstum von Tumorzellen

Die Infektion mit rekombinanten und Wildtyp-Parvoviren führte *in vitro* zu einer Wachstumsinhibierung der Zellkulturen (3.2.2; Haag *et al.*, 2000). Im Tier zeigte hH1Δ800 bei der geringen verwendeten Virusmenge (MOI = 1 RU/Zelle) einen marginalen Einfluß auf das Tumorstadium, verglichen mit dem Wachstum mock-infizierter HeLa-Zellen (3.4.2). Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen überein, die Haag *et al.* (2000) von Versuchen mit hH1Δ800 und Wildtyp-H-1 berichteten. Bei dieser Infektionsmultiplizität wird maximal die Hälfte der Zellen abgetötet, während der verbleibende Teil ohne Verzögerung einen Tumor bildet. Bei einer höheren MOI (5 RU/Zelle) dagegen verhindern Wildtyp-H-1 und hH1Δ800 eine Tumorentstehung infizierter HeLa-Zellen, da vermutlich die Anzahl der Zellen, die der viralen Lyse entgingen (etwa 2%), zu gering für eine Tumorbildung war.

Die Implantation MVMp- und MVMpΔ400-infizierter B78/H1-Zellen führte zu einer zeitlich deutlich verzögerten Tumorentstehung, im Vergleich zur Inokulation nicht-infizierter Zellen, während die Wachstumsrate der später entstandenen Tumoren dagegen unbeeinflusst blieb (3.3.2/3.3.3). Die Lyse infizierter neoplastischer Zellen in den ersten Tagen nach Infektion verzögert die Tumorentstehung, während im weiteren Verlauf das Wachstum der verbleibenden Zellen zu einem normalen Tumorstadium führt (Giese *et al.*, 2000, Guetta *et al.*, 1986).

Neben der NS1-vermittelten Lyse an der onkosuppressiven Wirkung der Parvoviren *in vivo* (Dupressoir *et al.*, 1989; Faisst *et al.*, 1998) wird eine Beteiligung von aktivierten T- und B-Lymphozyten diskutiert (Guetta *et al.*, 1986; McKisic *et al.*, 1996; Toolan *et al.*, 1986). In der vorliegenden Arbeit ergab sich aufgrund der fehlenden CD8-Transkription in MVMp- bzw. MVMpΔ400-infizierten Tumoren aber kein hinreichender Anhaltspunkt für eine Aktivierung

einer zellulären Immunantwort gegen das Virus in C57BL/6-Mäusen (3.3.7). Zudem konnte ein protektiver Effekt einer MVMP-Wildtypinfektion gegenüber einer Tumorbildung in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Wachstumsrate MVMP- oder MVMP $\Delta$ 400-infizierter Melanomtumoren blieb in immunkompetenten Mäusen unbeeinflusst, während sich in Nacktmäusen ein deutlich stärkerer Einfluß der Infektion des Wildtypvirus MVMP gegenüber MVMP $\Delta$ 400 zeigte (3.3.5). Im Unterschied zu MVMP $\Delta$ 400 enthält das MVMP-Genom die Kapsidproteingene und ist deshalb vermehrungsfähig. Somit könnten T-Zellen entweder aufgrund der Produktion von Kapsidproteinen oder Nachkommenpartikel mit infizierten Zellen interferieren. In der RT-PCR-Analyse MVMP- bzw. MVMP $\Delta$ 400-infizierter Tumoren waren Transkripte von NK1.1, Granzym A, CTLA-4 und FasL nachzuweisen (3.3.7), was auf eine geringfügige virusvermittelte Aktivierung von NK-Zellen und T-Zellen hindeuten kann.

#### **4.4.2 MCP-3-rekombinante Vektoren besitzen ein stärkeres antineoplastisches Potential als die Parentalviren**

Der antitumorale Effekt der MCP-3-tragenden Vektoren übertraf bei weitem die Wirkung des Wildtypvirus bzw. des transgenfreien Vektors in beiden Tumormodellen der vorliegenden Arbeit. Eine erhöhte NS1-Expression der MCP-3-Konstrukte gegenüber den anderen Vektoren, als Ursache für den entscheidend stärkeren antitumoralen Effekt der MCP-3-rekombinanten Viren, ist aufgrund der *Western-Blot*-Analyse auszuschließen (3.2.5).

In FACS-Analysen konnte keine MHC-Klasse-I-Expression auf B78/H1-Melanomzellen nachgewiesen werden (Lollini *et al.*, 1990) und sie wird weder durch IFN- $\gamma$ -Behandlung (Nanni *et al.*, 1998; De Giovanni *et al.*, 1994), noch durch eine parvovirale Infektion oder eine MCP-3-Produktion induziert (3.3.1). Damit ist der antitumorale Einfluß des MCP-3-transduzierenden Parvovirus auf B78/H1-Tumoren nicht auf eine Induktion der MHC-Klasse-I-Expression zurückzuführen.

Die höhere antineoplastische Wirkung der MCP-3-tragenden Vektoren ist demnach dem Einfluß des Transgens zuzuschreiben. Dabei wird hier zwischen dem Einfluß des Transgens alleine und der additiven oder synergistischen Wirkung der parvoviralen Komponente nicht unterschieden. Die separate Bestimmung des Effekts des MCP-3-Proteins ist jedoch schwierig. Stabile MCP-3-Transfektanten würden nicht diese hohe, transiente

Chemokinproduktion ermöglichen, da die MCP-3-Produktion nach MVMp/MCP-3-Infektion bis zu 100-mal höher war als z. B. diejenige MCP-3-transfizierter P815-Zellen (Fioretti *et al.*, 1998). Auch die Applikation des Proteins könnte die transiente MCP-3-Abgabe kaum simulieren.

#### **4.4.3 Die Beteiligung verschiedener Leukozytenpopulationen an der antitumoralen Wirkung MCP-3-rekombinanter Parvoviren**

Da MCP-3 *in vitro* eine chemotaktische Wirkung auf Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen, DC, eosinophile und basophile Granulozyten zeigt, könnten diese Leukozyten zum antineoplastischen Effekt der MCP-3-rekombinanten Parvoviren beitragen (Van Coillie *et al.*, 1999). Ergebnisse *in vitro* reflektieren aber nicht unbedingt den Immunstatus in einem komplexen zellulären Kontext *in vivo* (Faure *et al.*, 1998). Die MCP-3-Transduktion führte bei immunogenen Tumoren zu einer Tumorabstoßung durch die Aktivierung einer T-Zellantwort und in geringem Maße durch die Aktivität von Makrophagen und Granulozyten (Biragyn *et al.*, 1999; Fioretti *et al.*, 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß durch die Infektion der B78/H1-Zellen mit MVMp/MCP-3 in immunkompetenten Mäusen keine Tumoren anwuchsen, während sich in T-Zell-defizienten Mäusen in allen Fällen Tumoren entwickelten (3.3.3/3.3.5). Demnach sind T-Zellen essentiell für die Hemmung der Tumorentstehung. Eine Beteiligung von T-Zellen an einer antineoplastischen Wirkung auf B78/H1-Zellen wurde bereits beschrieben (Nanni *et al.*, 1998). Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse MCP-3-transduzierter B78/H1-Tumoren (3.3.7): Der Nachweis der CD8-Transkripte läßt auf die Anwesenheit von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen schließen. CD40L wird vor allem von aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert. Unter bestimmten Bedingungen kann eine geringe CD40L-Expression auch bei einer kleinen Subpopulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Makrophagen oder DC beobachtet werden (Stout & Suttles, 1996; Hermann *et al.*, 1993). Der Nachweis der Transkripte von CTLA-4 bestätigt die Anlockung aktivierter T-Zellen. Weitere Hinweise auf die Anwesenheit aktivierter T-Zellen in MVMp/MCP-3-infizierten Tumoren könnte die erhöhte Transkription von Perforin, Granzym A, FasL und IFN- $\gamma$  sein. *In vivo* ist die Sekretion von Perforin und Granzymen ein wichtiger Bestandteil der zytotoxischen Aktivität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, während bei CD4<sup>+</sup>-CTLs der Fas/FasL-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle spielt (Graubert *et al.*, 1997; Kägi *et al.*, 1994; Shresta *et al.*, 1995; Lowin *et al.*, 1994).

Diese Effektormoleküle werden aber ebenso von aktivierten NK-Zellen exprimiert. Die RT-PCR-Analyse der HeLa-Zelltumoren aus Nacktmäusen zeigte ebenfalls eine höhere oder ausschließliche Transkription von Perforin, Granzym A und B, sowie IFN- $\gamma$  bei den MCP-3-exprimierenden Tumoren (3.4.4). Da bei Nacktmäusen diese Proteine ausschließlich von aktivierten NK-Zellen abgegeben werden, ist dies ein starkes Argument für die Aktivierung von NK-Zellen in MCP-3-transduzierten Tumoren. Der Nachweis der NK1.1-Transkripte in MVMp/MCP-3-infizierten B78/H1-Tumoren läßt auch in diesen Tumoren auf die Infiltration von NK-Zellen schließen (3.3.7). Nach MCP-3-Transduktion in P815-Mastozytomtumoren war keine Infiltration von NK-Zellen zu beobachten (Fioretti *et al.*, 1998). Eine wesentlich höhere MCP-3-Produktion nach parvoviraler Infektion und ein additiver Effekt des Virus auf eine Anlockung bzw. Aktivierung von NK-Zellen können diesen Unterschied erklären.

In histologischen Schnitten der Zervixkarzinomtumoren wurde eine starke Infiltration von Makrophagen in MCP-3-transduzierten Tumoren, aber nicht in Kontrolltumoren, festgestellt (3.4.3). Die ausschließliche Transkription von iNOS in MCP-3-transduzierten Tumoren deutet auf die Anwesenheit aktivierter Makrophagen hin (3.4.4). Außerdem konnte eine spezifische Lyse von HeLa-Zellen durch peritoneale Exsudat-Makrophagen aus Nacktmäusen nach *in vitro*-Stimulation durch MCP-3 festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Makrophagen zu der hH1/MCP-3-vermittelten Wachstumsretardierung beitragen. Eine Aktivierung von Makrophagen in MCP-3-exprimierenden Melanomtumoren konnte nicht beobachtet werden, da in der RT-PCR-Analyse keine Transkripte von COX-2, IL-12p40, IFN- $\alpha$  oder iNOS nachzuweisen waren (3.3.7). Eine Erklärung für die Tatsache, daß aktivierte Makrophagen nur in einem Tumormodell nachzuweisen sind, kann im unterschiedlichen Zeitpunkt der Detektion liegen: MCP-3 agiert bevorzugt über CCR2 der Monozyten/Makrophagen (Sozzani *et al.*, 1994). In Gegenwart von IFN- $\gamma$  kommt es zu einer selektiven Inhibierung der Expression des CCR2 in Monozyten (Peton-Rol *et al.*, 1998). In Gegenwart von IFN- $\gamma$  können also Monozyten/Makrophagen gegenüber einer chemotaktischen Anlockung von MCP-3 desensibilisiert werden. Während in MCP-3-transduzierten HeLa-Zelltumoren nach 3 Tagen aktivierte Makrophagen nachzuweisen sind, führt die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  in Melanomtumoren bis zum 11. Tag zu einer Inhibierung der chemotaktischen Wirkung von MCP-3 auf Makrophagen. Eine anfängliche Beteiligung von Makrophagen an der antineoplastischen Wirkung von MVMp/MCP-3 auf B78/H1-Melanomtumoren ist also nicht auszuschließen. Insgesamt bestätigen sich jedoch

Beobachtungen, daß Makrophagen eine untergeordnete Rolle im antitumoralen Einfluß von MCP-3 spielen (Fioretti *et al.*, 1998).

In MCP-3-exprimierenden P815-Tumoren zeigte sich eine Infiltration der verschiedenen Granulozyten (Fioretti *et al.*, 1998). Insgesamt beeinflußten sie das Tumorstadium aber nicht in entscheidendem Maße. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Beteiligung von Granulozyten nicht untersucht.

In histologischen Schnitten hH1/MCP-3-infizierten HeLa-Zelltumore wurde die Infiltration von DC festgestellt (3.4.3). Auch in immunkompetenten Mäusen ist eine Rekrutierung von DC durch MCP-3-Transduktion beschrieben worden (Fioretti *et al.*, 1998). DC spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung einer tumorspezifischen Immunantwort. Im Gegensatz zu Makrophagen sind DC in der Lage, Peptide exogener Antigene (z. B. von Tumorzellen) nicht nur über MHC-Klasse-II-Moleküle an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, sondern auch über MHC-Klasse-I-Moleküle an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu präsentieren. Dieses Phänomen wird als *cross-priming* bezeichnet (Heath & Carbone, 1999). Auf diesem Weg können auch tumorspezifische CTLs gegen MHC-negative Tumorzellen entstehen. Ob und wie CTLs ihrerseits mit MHC-negativen Tumorzellen interagieren können, wird im nächsten Kapitel besprochen.

Reifende DC wandern zur Antigenpräsentation an T-Zellen in die drainierenden Lymphknoten (Yang *et al.*, 1997). Da DC durch MCP-3 zum Tumor rekrutiert werden, stellt sich die Frage, wie reife DC zur Antigenpräsentation in die Lymphknoten gelangen. Nach der bestehenden Hypothese exprimieren unreife DC ein charakteristisches Spektrum von CCR, darunter CCR1-3 (Dieu *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1997). Nach Antigenaufnahme kommt es zur Internalisierung der CCR und damit zu einer Desensibilisierung gegenüber dem bisherigen Liganden. Bei der folgenden Reifung der DC wird die CCR7-Expression induziert, wodurch die Wanderung zu den sekundären lymphoiden Organen über den CCR7-Ligand 6Chine reguliert wird (Dieu-Nosjean *et al.*, 1999). Im Lymphknoten werden die beiden CCR7-Liganden MIP-3 $\beta$  und 6Chine in der T-Zellzone produziert und können reife DC und T-Zellen rekrutieren, womit sie wahrscheinlich den Kontakt beider Zellen erleichtern (Dieu-Nosjean *et al.*, 1999).

#### 4.4.4 Mechanismus der MVMp/MCP-3-vermittelten Tumorzellyse durch die verschiedenen Effektorzellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß für eine vollständige antionkogene Wirkung von MVMp/MCP-3 in diesem schwach immunogenen Tumormodell eine Aktivität von T-Zellen essentiell ist. Aktivierte T-Zellen können unterschiedliche Funktionen ausüben: A) Zytotoxisch aktivierte T-Zellen können Tumorzellen direkt lysieren. B) Aktivierte T-Zellen wirken aber auch immunregulatorisch.

##### A) T-Zellen als lytische Effektorzellen

Für eine Lyse durch CTLs ist ihre Bindung an MHC-Moleküle der Zielzellen notwendig. Eine MHC-Klasse-I-Expression konnte bei B78/H1-Zellen in FACS-Analysen aber nicht nachgewiesen werden. Nach einer bestehenden Ansicht kommt es jedoch nur in seltenen Fällen zu einem vollständigen Verlust der MHC-Klasse-I-Expression (Hellström *et al.*, 1998). Diese Ansicht entspricht Beobachtungen, nach denen die Expression der MHC-Proteine unter der Nachweisgrenze der FACS-Analyse liegen, aber ausreichend für eine T-Zellerkennung sein kann (Porgador *et al.*, 1995). Auch im Falle der B78/H1-Zellen wurde über eine geringe MHC-Expression spekuliert (Sfondrini *et al.*, 2000).

Darüber hinaus zeigen Untersuchungen von Nakao *et al.* (1997), daß  $CD3^+ CD4^+ CD8^-$  Zellen mit ihren Zielzellen auch über andere Oberflächenstrukturen interagieren können als MHC-Moleküle. Des weiteren wurde gezeigt, daß NKT-Zellen die invariante  $V\alpha 14-J\alpha 281$ -Kette des T-Zellrezeptors exprimieren, der an  $CD1\delta$  (MHC-ähnliches Molekül) der APCs bindet (Lantz & Bendelac 1994). NKT-Zellen sind  $CD3^+$  T-Zellen, die auch NK-Marker exprimieren (Cui *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde zwischen den Effekten von  $NK^+ - CD3^-$  -Zellen,  $NK^+ - CD3^+$  NKT-Zellen und  $CD4^+ / CD3^+$  -T-Zellen nicht unterschieden. Das bedeutet, daß T-Zellen bzw. NKT-Zellen auch über nicht-MHC-Moleküle mit Zielzellen interagieren können.

##### B) Immunregulatorische Funktion der T-Zellen

Aktivierte  $CD4^+$ -T-Lymphozyten haben Helferfunktion in der Aktivierung von  $CD8^+$ -CTLs (Th1-Antwort) und der Aktivierung von B-Zellen (Th2-Antwort). Th1-Zellen sind ebenfalls in der Lage durch die Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  NK-Zellen anzulocken und zu aktivieren. Es konnte gezeigt werden, daß MCP-3 eine Th1-Antwort vermitteln kann (Fioretti *et al.*, 1998). Auch in dieser Arbeit waren in MVMp/MCP-3-infizierten Melanomtumoren die Transkripte

der Th1-assoziierten Moleküle IFN- $\gamma$  und IL-2 nachweisbar (3.3.7). NK-Zellen lysieren bevorzugt „MHC-Klasse-I-negative“ Zellen (Williams *et al.*, 1997). Die Ergebnisse von Porgador *et al.* (1995) zeigen, daß NK-Zellen entscheidend zur Eliminierung von schwach immunogenen B16-Melanommetastasen *in vivo* beitragen. Dies führt zu der Vermutung, daß auch im Melanomtumormodell dieser Arbeit der Einfluß aktivierter T-Zellen darin besteht, daß sie durch die Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  zu einer Aktivierung von NK-Zellen führen, die ihrerseits die Melanomzellen als die eigentlichen Effektoren in diesem System lysieren. Die Tatsache, daß Tumoren MVMp/MCP-3-infizierter Melanomzellen in T-Zell-defizienten Mäusen anwuchsen, läßt darauf schließen, daß die Stimulierung durch T-Zellen für die Entfaltung der vollen Aktivität der NK-Zellen notwendig ist (3.3.5). *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, daß NK-Zellen nach IL-2-Stimulierung eine wesentlich stärkere Reaktion auf MCP-3 zeigten, die neben einer Migration in der Abgabe von Granzym A bestand (Allavena *et al.*, 1994; Loetscher *et al.*, 1996).

Der Mechanismus der T-Zell-vermittelten Aktivierung von NK-Zellen zur Tumorzellyse stimmt auch mit Ergebnissen von Nanni *et al.* (1998) im B78/H1-Tumormodell überein und wurde bereits für andere schwach immunogene Melanomtumoren beschrieben (Porgador *et al.*, 1997).

Eine Wirkung der aktivierten T-Zellen über die Stimulierung von NK-Zellen würde auch erklären, warum in einem  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest die Entstehung von tumorspezifischen Gedächtnis-T-Zellen nicht nachzuweisen war, obwohl nach erneuter B78/H1-Zellinokulation keine Tumoren anwuchsen (3.3.4). Gedächtnis-T-Zellen würden die Tumorzellen aufgrund der zu geringen MHC-Expression nicht effizient abtöten. Wenn die T-Zellen jedoch hauptsächlich NK-Zellen zu den maßgeblichen lytischen Effektoren in diesem Tumormodell aktivieren, würde dies *in vivo* zu einer Tumorzellyse führen. In diesem *in vitro*-Test wäre dieser Weg aber nicht nachzuweisen. Die Tatsache, daß bei 25% der Tiere nach erneuter B78/H1-Zellinokulation keine Tumoren anwuchsen, kann darauf hindeuten, daß MVMp/MCP-3 grundsätzlich in der Lage ist, eine tumorspezifische Immunität in diesem Tumormodell zu vermitteln. Eine erworbene Immunität gegenüber schwach immunogenen Tumoren wurde bereits in einem anderen Tumormodell festgestellt (Braun *et al.*, 2000).

Zusammenfassend besteht der Einfluß der T-Zellen in diesem Tumormodell also vorwiegend in einer Stimulierung von NK-Zellen über die Abgabe von IL-2 und IFN- $\gamma$ .

Die Behandlung etablierter Melanomtumoren mit MVMp/MCP-3 führte zu einem Stillstand des Tumorwachstums, der an einen antiangiogenischen Effekt erinnert (3.3.6). Die Abgabe von IFN- $\gamma$  in MCP-3-transduzierten Melanomtumoren (3.3.7) könnte alleine an der Stabilisierung des Tumorwachstums etablierter Melanomtumore beteiligt sein, da IFN- $\gamma$  eine antiproliferative Wirkung auf B78/H1-Zellen zugeschrieben wurde (Lollini *et al.*, 1990). Nach einer These von Yao *et al.* (1999) wird der antiangiogenische Effekt von IL-12 letztendlich dadurch vermittelt, daß durch IFN- $\gamma$  und IP-10 NK-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen aktiviert werden, die benachbarte Endothelzellen lysieren und so die (Neo-)Vaskularisierung verhindern. In der RT-PCR-Analyse konnte keine Induktion der IL-12p40-Transkription und keine Änderung der konstitutiven Transkription von IP-10 beobachtet werden. Eine hohe MCP-3- und IFN- $\gamma$ -Konzentration zur Rekrutierung und Aktivierung der NK-Zellen könnte hier IP-10 und IL-12 ersetzen (3.3.7). So besteht die Möglichkeit, daß ein Effekt von NK-Zellen im Melanomtumormodell dieser Arbeit nicht alleine in einer Lyse von Tumorzellen, sondern auch zu einem antiangiogenischen Effekt führen könnten. Die Initiation der Angiogenese war bereits als einer der kritischen Schritte der Tumorentstehung beschrieben worden. Bei einer Tumorgröße unter 2 mm<sup>3</sup> hängt die Entscheidung über ein weiteres Tumorwachstum von der Rekrutierung neuer Gefäße ab (Folkman, 1990).

Damit ist das Szenario vorstellbar, das in Abb. 4-1 verdeutlicht ist. Die in dieser Arbeit belegten Fakten sind mit roten Zeichen markiert: Die MCP-3-Sekretion im Tumor, zusammen mit einem noch nicht definierten Effekt des Virus, führen zu einer Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen. Dazu könnte die fehlende oder niedrige MHC-Expression der B78/H1-Zellen ebenfalls beitragen (Williams, 1997). Durch die Abgabe von Perforin und Granzymen aktivierter NK-Zellen wird ein Teil der Melanomzellen durch Apoptose abgetötet.

Des Weiteren werden DC durch MCP-3 angelockt, die bevorzugt Fragmente apoptotisch gestorbener Zellen aufnehmen. Außerdem stellt die virusbedingte Zellyse weiteres Tumorantigen zu Verfügung. Zusätzlich könnten Makrophagen und Granulozyten zu einer primären Tumorzellyse beitragen.

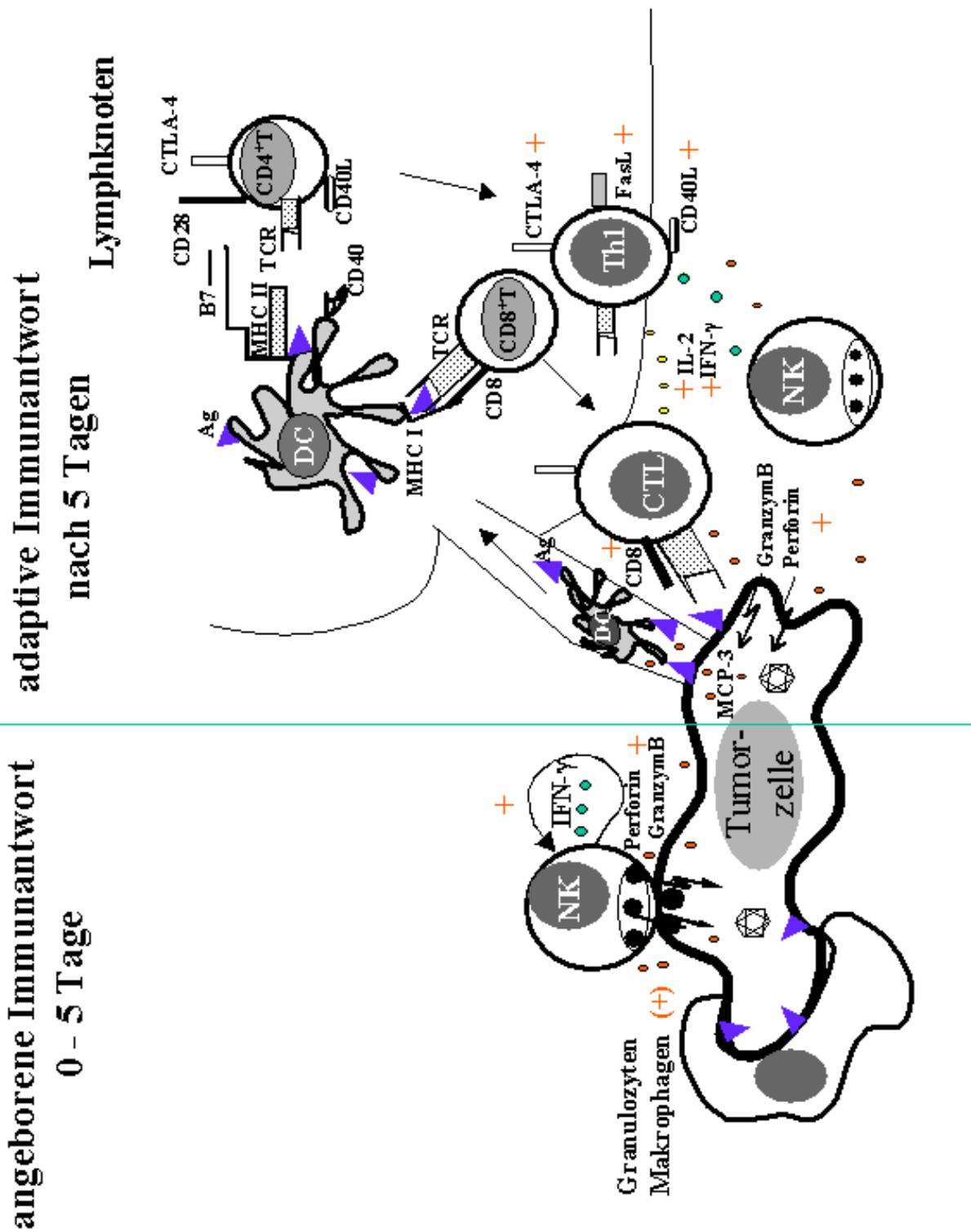


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der MVMp/MCP-3-vermittelten Immunantwort.

Nähere Erklärungen werden im Text gegeben. Ag: Tumorantigen, CTL: zytotoxische T-Zelle, DC: Dendritische Zelle, NK: Natürliche Killer-Zelle, grüner Punkt: IFN- $\gamma$ , gelber Punkt: IL-2, roter Punkt: MCP-3, TCR: T-Zellrezeptor

Nach Antigenaufnahme kommt es durch autokrin negative Rückkopplung zur Desensibilisierung der DC gegenüber der chemotaktischen Anlockung durch MCP-3. Reifende DC wandern in die drainierenden Lymphknoten, wo sie Peptide aufgenommener Tumorantigene an T-Zellen präsentieren. Aktivierte T-Zellen werden durch weitere MCP-3-Sekretion zum Tumor dirigiert. Bei der Annahme einer niedrigen Expression von MHC-Klasse-I/II-Molekülen der Tumorzellen könnte eine Möglichkeit in einer geringfügigen Tumorzellyse durch aktivierte T-Zellen bestehen. Es ist aber anzunehmen, daß aktivierte T-Zellen vor allem durch die Abgabe von IFN- $\gamma$  und IL-2 weitere NK-Zellen rekrutieren und aktivieren, die eine effiziente Tumorzellyse ermöglichen.

Im Falle der *ex vivo*-Infektion kann die MCP-3-Sekretion und damit die Rekrutierung der Effektorzellen beginnen, bevor der Tumor eine solide klar umgrenzte Tumormasse gebildet hat. So können aktivierte NK-Zellen direkt zu Beginn in den losen Tumorzellhaufen eindringen und B78/H1-Zellen abtöten und damit die Anzahl der B78/H1-Zellen unter die Zellzahl von  $10^3$  gebracht werden, die für eine Tumorentstehung notwendig ist (Bottazzi *et al.*, 1992).

Da das Eindringen der Leukozyten in das Innere der Tumormasse bei etablierten Tumoren erschwert ist, bleibt bei der *in vivo*-Infektion etablierter Tumore die lytische Aktivität der Effektorzellen vor allem auf die Tumorperipherie beschränkt. Dabei kann hier der antiproliferative Einfluß von INF- $\gamma$  zum Tragen kommen.

Die unvollständige Suppression der Tumorentstehung bei einer geringeren Infektionsmultiplizität von 3 RU/Zelle mit MVMp/MCP-3 könnte damit zusammenhängen, daß durch eine geringere NS-vermittelte Zytolyse in einigen wenigen Fällen eine unzureichende Menge des Tumorantigens zur Verfügung stand, das von DC aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden konnte (3.3.2).

#### **4.4.5 H-1-Viren im HeLa/Nacktmaus-Modell**

Im zweiten Tumormodell dieser Arbeit mit humanen Zellen zeigte sich, daß hH1/MCP-3 schon in sehr geringen Mengen eine antitumorale Wirkung besitzt (3.4.2). Die hH1/MCP-3-Infektion führte zu einem langsamen Tumorwachstum in Nacktmäusen, aber nicht zu einer vollständigen Eliminierung der HeLa-Zelltumore. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Makrophagen und NK-Zellen am Effekt von hH1/MCP-3 entscheidend beteiligt sind

(3.4.3/3.4.4). Fioretti *et al.* (1998) und die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten bereits, daß ein entscheidend stärkerer Effekt von hH1/MCP-3 in Gegenwart von T-Zellen zu erwarten ist.

## 4.5 Beurteilung MCP-3-rekombinanter Parvoviren zur Genterapie von Krebs

Ein Vektor zur genterapeutischen Behandlung von Krebs sollte vielfältigen Ansprüchen genügen (1.1). Die Verwendung rekombinanter parvoviraler Vektoren zur Genterapie steht noch am Anfang. Bisher gibt es kaum veröffentlichte Daten über Tierversuche, auf deren Erkenntnisse zurückgegriffen werden konnte. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der antineoplastischen Wirkung MCP-3-rekombinanter Parvoviren. Die *ex vivo*-Infektion von B78/H1-Zellen mit MVMp/MCP-3 führte zu einer vollständigen Suppression der Tumorbildung. Damit ist die *ex vivo*-Infektion mit MVMp/MCP-3 eine wirksame Therapie gegen einen sehr aggressiven, schwach immunogenen Tumor. Die MVMp/MCP-3-Behandlung bereits etablierter Tumoren verhinderte bereits bei der verwendeten Virusmenge das Tumorwachstum. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob eine größere Virusmenge zu einer erhöhten Permissivität verschiedener Tumorzellen und einem stärkeren antitumoralen Effekt führen. Limitierender Faktor ist dabei noch die Menge verfügbarer rekombinanter Viren.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Auswahl eines Vektors zur Genterapie von Krebs liegt in der Sicherheit für den Patienten. Gerade die Unbedenklichkeit der Anwendung stellt bei vielen bekannten Vektoren ein Problem dar (Vile *et al.*, 2000). Bei der pathologischen Begutachtung der Organe tumortragender behandelter und nicht behandelter Tiere wurden keine zytopathischen Veränderungen festgestellt werden, die auf die Verwendung des Virus oder des Chemokins MCP-3 zurückzuführen waren (Pathologieberichte, Gröne & Amelung, DKFZ). Damit bestätigt diese Arbeit die geringe Pathogenität autonomer Parvoviren, ein großer Vorteil parvoviraler Vektoren.

Außerdem sollte ein Vektor zu einer ausreichenden Transgenexpression in den transduzierten Zellen führen. In dieser Arbeit konnte *in vitro* eine hohe MCP-3-Abgabe infizierter Zellen gezeigt werden.

Eine weitere Anforderung an einen Vektor besteht im selektiven und dabei effizienten Transfer des Transgens. Eine effiziente Transduktion von HeLa-Zellen mit hH1/GFP konnte

in dieser Arbeit bestätigt werden. Nach einer Injektion von  $10^{10}$  pfu MVMp in B78/H1-Tumor-tragende C57BL/6-Mäuse konnte virale DNA in sämtlichen Organen der Mäuse nachgewiesen werden, jedoch wesentlich weniger als im Tumor (Giese *et al.*, 2000). Neueste Ergebnisse zeigen, daß NS1-Transkription nur im B78/H1-Tumor erfolgt (Giese, persönliche Mitteilung). Dies zeigt eine selektive Transduktion von MVMp auf Ebene der Transkription auch in diesem Modell. Die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche mit MVMp/GFP dieser Arbeit zeigten, daß die Transduktionseffizienz der B78/H1-Melanomzellen bei der verwendeten Virusmenge noch suboptimal war.

Der zweite wichtige Punkt in der Beurteilung MCP-3-rekombinanter Parvoviren ist die Wahl des Transgens. Das dem MCP-3 am nächsten verwandte Chemokin ist MCP-1. Im Gegensatz zum MCP-3-transduzierenden H-1-Vektor zeigte hH1/MCP-1 keinen Einfluß auf das Tumorstadium *ex vivo* infizierter HeLa-Zellen, verglichen mit dem Wildtypvirus oder hH1 $\Delta$ 800 (Haag *et al.*, 2000). Die MCP-1-Transduktion in B78/H1-Zellen führte zu einem langsameren Wachstum der Tumore in syngenen immunkompetenten Mäusen (Botazzi *et al.*, 1992). Die vollständige Suppression der Tumorentstehung nach Infektion von B78/H1-Zellen mit MVMp/MCP-3 bedeutet einen wesentlich stärkeren antineoplastischen Effekt. Die unterschiedliche Wirkung von zwei sehr nahe verwandten Chemokinen, die an den gleichen Rezeptor binden können, ist noch nicht verstanden und zeigt, wie spezifisch Leukozyten auf einzelne Stimuli reagieren. Die Verwendung von hH1/IL-2 in diesem Tumormodell führte zu einer Suppression der Tumorentstehung bei 90% der Tiere. Damit vermittelt IL-2 einen wesentlich stärkeren antineoplastischen Effekt als MCP-3. Über die Wirkung von IL-2-rekombinanten Parvoviren in immunkompetenten Mäusen gibt es bisher keine Daten. Die Transduktion von IL-12 in B78/H1-Melanomtumore führte zu einem vergleichbaren antitumoralen Effekt wie MVMp/MCP-3 (Nanni *et al.*, 1998). Insgesamt führt eine Immuntherapie mit MCP-3 zu einem starken antineoplastischen Effekt, sowohl in stark als auch schwach immunogenen Tumoren, womit es als Transgen zur Krebstherapie geeignet ist (Biragyn *et al.*, 1999; Fioretti *et al.*, 1998; diese Arbeit).

Zusammenfassend eröffnet die antitumorale Wirkung MCP-3-rekombinanter Parvoviren in Abwesenheit erkennbarer Nebenwirkungen eine Alternative zu bisher bekannten Vektoren und eine vielversprechende Strategie zur tumorgerichteten Gentherapie.

## 4.6 Ausblick

Bisher werden rekombinante parvovirale Vektoren im Labormaßstab hergestellt. Damit wird der Bedarf für vorklinische Studien gedeckt. Für eine klinische Anwendung rekombinanter Viren ist eine Steigerung der Produktionskapazitäten von mindestens 3 – 4 Zehnerpotenzen notwendig. Bei einer Möglichkeit der qualitativen Rückgewinnung aus dem Kulturmedium könnte eine solche Zunahme z. B. durch die Verwendung einer Verpackungszelllinie in Suspensionskulturen erreicht werden.

Eine Möglichkeit zur Steigerung der antitumoralen Wirkung rekombinanter Parvoviren könnte eine Modulation der zytotoxischen Eigenschaften von NS1 darstellen. Neueste Untersuchungen zeigen, daß Mutation bestimmter Phosphorylierungsstellen von NS1 entweder zu einer Erhöhung (NS1<sup>+</sup>) oder Verminderung (NS1<sup>-</sup>) der zytotoxischen Wirkung von NS1 *in vitro* führen (Daerffler *et al.*, 2000). Eine geringere lytische Wirkung könnte eine längere Transgenexpression ermöglichen, während NS1<sup>+</sup> zu einer effizienteren Lyse der transformierten Zellen führen kann.

Aufgrund der Heterogenität humaner Tumoren sollte ein genereller Ansatz zur Krebstherapie verfolgt werden. Es besteht die Möglichkeit, daß eine Kombination rekombinanter Viren, die verschiedene Transgene tragen, eine höhere antitumorale Wirkung erzielt. Der starke antitumorale Effekt MCP-3-rekombinanter Parvoviren befürworten einen weiteren Einsatz dieser Viren. Eine Transduktion kostimulatorischer Moleküle wie B7-1/2 erwies sich bei schwach immunogenen Tumoren als wenig geeignet (Chen *et al.*, 1994). Ein anderer Ansatz kann in der Transduktion eines antitangiogenischen Faktors wie IP-10 bestehen, um die Unterbrechung der Versorgung eines Tumors zu erzielen (Folkmann, 1990). Weitere Untersuchungen werden hier notwendig sein, um die Mechanismen weiterer Transgene zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Die onkosuppressiven Eigenschaften in Abwesenheit erkennbarer unerwünschter Nebenwirkungen zeichnen autonome Parvoviren wie H-1 und MVMp als attraktive Vektoren zur Genterapie von Krebs aus. Für die experimentelle Krebstherapie sind rekombinante parvovirale Vektoren entwickelt worden, bei denen der Tropismus für transformierte Zellen der Parentalviren erhalten bleibt, um ein therapeutisches Transgen gerichtet in Tumorzellen zu transduzieren, zusätzlich zu einer intrinsischen onkolytischen Aktivität des Vektors.

In dieser Arbeit wurde das humane Chemokin *Monocyte Chemotactic Protein-3* (MCP-3) als Transgen erprobt, das *in vitro* eine chemotaktische Wirkung auf dendritische Zellen und T-Zellen, aber auch auf natürliche Killerzellen, Makrophagen sowie basophile und eosinophile Granulozyten zeigt. Dieses breite Zielzellspektrum läßt eine antitumorale Wirkung auch auf schwach immunogene Tumoren vermuten, eine Eigenschaft vieler Tumoren bei Menschen. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des antitumoralen Effekts der neuartigen Verbindung eines onkosuppressiven Parvovirus mit dem pluripotenten Chemokin MCP-3 auf schwach immunogenen B78/H1-Melanomtumoren in immunkompetenten Mäusen. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung wurde außerdem das Wachstum hH1/MCP-3-infizierter humaner HeLa-Zervixkarzinomzellen in Nacktmäusen analysiert. Die antitumorale Wirkung MCP-3-rekombinanter Viren wurde dabei mit der natürlicher oder transgenfreier Parvoviren verglichen.

Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Parvoviren MVMp/MCP-3 und hH1/MCP-3 ermöglichen eine hohe Transgenexpression in Tumorzelllinien. In Tierversuchen übertraf die starke antitumorale Wirkung MCP-3-rekombinanter Parvoviren bei weitem die Wirkung entsprechender Wildtyp- oder transgenfreier Kontrollviren. Durch Infektion der B78/H1-Zellen mit MVMp/MCP-3 vor Implantation in immunkompetente Mäuse blieben alle Tiere tumorfrei. Unter den gleichen Bedingungen wuchsen bei der Infektion mit den Kontrollviren bei allen Tieren mit zeitlicher Verzögerung Tumoren an. Außerdem verhinderte die Behandlung etablierter B78/H1-Tumoren mit MVMp/MCP-3 das Tumorstadium über den Zeitraum der Behandlung, während die Kontrollviren keinen Effekt zeigten. Dieser antitumorale Effekt von MVMp/MCP-3 war mit einer Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen verbunden. Die Infektion von humanen Zervixkarzinomzellen mit hH1/MCP-3 führte bereits bei einer Infektionsmultiplizität von einem infektiösen Partikel pro

Zelle nach Implantation in Nacktmäuse zu einem signifikant langsameren Tumorwachstum. Das transgenfreie Virus zeigte keine Wirkung. Dieser Effekt konnte einer Infiltration aktivierter Makrophagen und NK-Zellen zugeschrieben werden. Die pathologische Begutachtung zeigte keine histologischen Veränderungen in den Organen tumortragender Tiere, die auf die Verwendung des Virus oder MCP-3 zurückzuführen sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen das ausgeprägte antitumorale Potential MCP-3-rekombinanter Parvoviren.

## 6 Literaturverzeichnis

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

**Allavena, P., Bianchi, G., Zhou, D., Van Damme, J., Jilek, P., Sozzani, S. & Mantovani, A. (1994):** Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol.* **24**, 3233-6.

**Allavena, P., Bianchi, G., Giardina, P., Polentarutti, N., Zhou, D., Introna, M., Sozzani, S. & Mantovani, A. (1996):** Migratory Response of Human NK Cells to Monocyte-Chemotactic Proteins. *Methods.* **10**, 145-9.

**Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Rousset, D., Clark-Lewis, I., Loetscher, P., Moser, B. & Baggiolini, M. (1996):** HIV blocked by chemokine antagonist. *Nature* **383**, 400-3.

**Asselin-Paturel, C., Lassau, N., Guinebretiere, J. M., Zhang, J., Gay, F., Bex, F., Hallez, S., Leclere, J., Peronneau, P., Mami-Chouaib, F. & Chouaib, S. (1999):** Transfer of the murine interleukin-12 gene in vivo by a Semliki Forest virus vector induces B16 tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by Doppler ultrasonography. *Gene Ther.* **6**, 606-15.

**Astell, C. R., Liu, Q., Harris, C. E., Brunstein, J., Jindal, H. K. & Tam, P. (1996):** Minute virus of mice cis-acting sequences required for genome replication and the role of the trans-acting viral protein, NS-1. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **55**, 245-85.

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

**Astell, C. R., Thomson, M., Chow, M. B. & Ward D. C. (1983):** Structure and replication of minute virus of mice DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **47 Pt 2**, 751-62.

**Atchison, R. W., Casto, B. C. & Hannon, W. H. (1965):** Adenovirus-associated defectiv virus particles. *Science* **149**, 754-756.

**Avalosse, B., Dupont, F., Sprengelaere, P., Mine, N. & Burny, A. (1996):** Method for concentrating and purifying recombinant autonomous parvovirus vectors designed for tumour-cell targeted gene therapy. *J. Virol.* **62**, 179-82.

**Baggiolini, M. (1993):** Chemotactic and inflammatory cytokines-CXC and CC protein. *Adv. Exp. Med. Biol.* **351**, 1-11.

**Baggiolini, M. (1998):** Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-8.

**Baggiolini, M., Dahinden, C. A. (1994):** CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol. Today* **15**, 127-33.

**Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. (1994):** Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**, 97-99

- Baldauf, A. Q., Willwand, K., Mumtsidu, E., Nuesch, J. P. & Rommelaere J. (1997):** Specific initiation of replication at the right-end telomere of the closed species of minute virus of mice replicative-form DNA. *J. Virol.* **71**, 971-80.
- Ball-Goodrich, L. J. & Tattersall, P. (1992):** Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibritropism by lymphotropic strain of minute virus of mice. *J. Virol.* **66**, 3415-23.
- Bashir, T., Hörlein, R., Rommelaere, J. & Willwand, K. (2000):** Cyclin A activates the DNA polymerase delta-dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 5522-7.
- Bates, R. C., Snyder, C. F., Banerjee, P. T. & Mitra, S. (1994):** Autonomous parvoviruses LuIII encapsidates equal amounts of plus and minus DNA strands. *J. Virol.* **49**, 319-24.
- Bennett, S., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. & Heath, W. R. (1998):** Help for cytotoxic-T-cell response is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478-480.
- Berger, E. A., Murphy, P. M. & Farber, J. M. (1999):** Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 657-700.
- Bergs, V. V. (1969):** Rat virus-mediated suppression of leukemia induction by Moloney virus in rats. *Cancer Res.* **29**, 1669-72
- Berns, K. I., Pinkerton, T. C., Thomas, G. F. & Hoggan M. D. (1975):** Detection of adeno-associated virus (AAV) specific nucleotid sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* **68**, 556-560.
- Biragyn, A., Tani, K., Grimm, M. C., Weeks, S. & Kwak, L. W. (1999):** Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity. *Naturue Biotech.* **17**, 253-8.
- Blanpain, C., Migeotte, I., Lee, B., Vakili, J., Doranz, B. J., Govaerts, C., Vassart, G., Doms, R.W., & Parmentier, M. (1999):** CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* **94**, 1899-905.
- Bodey, B., Bodey, B. jr.; Siegel, S. & Kaiser, H. E. (2000):** Failure of cancer vaccines: The significant limitations of this approach in immunotherapy. *Anticancer Res.* **20**, 2665-76.
- Böhm, W., Thoma, S., Leithäuser, F., Möller, F., Schirmbeck, R. & Reimann, J. (1998):** T cell-mediated, IFN- $\gamma$ -facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J. Immunol.* **161**, 897-908.
- Bonecchi, R., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Bernasconi, S., Locati, M., Power, C., Proudfoot, A., Wells, T.N., Mackay, C., Mantovani, A. & Sozzani, S. (1999):** Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. *J. Immunol.* **162**, 474-9.
- Bonini, J. A., Martin, S. K., Dralyuk, F., Roe, M. W., Philipson, L. H. & Steiner, D. F. (1997):** Cloning, expression, and chromosomal mapping of a novel human CC-chemokine receptor (CCR10) that displays high-affinity binding for MCP-1 and MCP-3. *DNA Cell Biol.* **16**, 1249-56.
- Bottazzi, B., Walter, S., Govoni, D., Colotta, F. & Mantovani, A. (1992):** Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murinemelanoma. *J. Immunol.* **148**, 1280-5.

- Brandenburger, A., Legendre, D., Avalosse, B. & Rommelaere, J. (1990):** NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Viol.* **174**, 576-84.
- Brandenburger, A. & Russel, S. J. (1996):** A novel packaging system for the generation of helper-free oncolytic MVM vector stocks. *Gene Ther.* **3**, 927-31.
- Braun, M. C., Lahey, E. & Kelsall, B. L. (2000):** Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *Am. Assoc. Immunol.* **164**, 3009-17.
- Brunstein, J. & Astell, C. R. (1997):** Analysis of the internal replication sequence indicates that there are three elements required for efficient replication of minute virus of mice minigenomes. *J. Virol.* **71**, 9087-95.
- Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P. & Rommelaere, J. (1990):** Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J.* **9**, 2989-95.
- Cater, J. E. & Pintel, D. J. (1992):** The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J. Gen. Virol.* **73**, 1839-43.
- Chen, J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W. & Dutta, A. (1995):** Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* **374**, 386-88.
- Chen, L., McGowan, P., Ashe, S., Johnston, J. V., Hellstrom, I. & Hellstrom, K. E. (1994):** B7-1/CD80-transduced tumor cells elicit better systemic immunity than wild-type tumor cells admixed with *Corynebacterium parvum*. *Cancer Res.* **54**, 5420-3.
- Chen, Y. Q., de Foresta, F., Hertoghs, J., Avalosse, B. L., Cornelis, J. J. & Rommelaere, J. (1986):** Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res.* **46**, 3574-9.
- Chen, Y. Q., Tuynder, M., Cornelis, J. J., Boukamp, P., Fusenig, N. E. & Rommelaere, J. (1989):** Sensitization of human keratinocytes to killing by parvovirus H-1 takes place during their malignant transformation but does not require them to be tumorigenic. *Carcinogenesis* **10**, 163-7
- Christensen, J., Cotmore, S. F. & 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**, 5422-30.
- Clemens, K. E. & Pintel, D. (1987):** Minute virus of mice (MVM) mRNAs predominantly polyadenylate at a single site. *Viol.* **160**, 511-4.
- Combadiere, C., Ahuja, S. K., Van Damme, J., Tiffany, H. L., Gao, J. L. & Murphy, P. M. (1995):** Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B. *J. Biol. Chem.* **270**, 29671-5.
- Cornelis, J. J., Becquart, P., Duponchel, N., Salome, N., Avalosse, B. L., Namba, M. & Rommelaere, J. (1988a):** 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**, 1679-86.
- Cornelis, J. J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S. F., Tal, J. & Rommelaere, J. (1988b):** Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62**, 3438-44.

- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1986):** Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **58**, 724-32.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1987):** The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus. Res.* **33**, 91-174.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1989):** A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J. Virol.* **63**, 3902-11.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1992):** In vivo resolution of circular plasmids containing concatemer junction fragments from minute virus of mice DNA and their subsequent replication as linear molecules. *J. Virol.* **66**, 420-31.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1994):** An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO J.* **13**, 4145-52.
- Cotmore, S. F. & 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**, 8477-84.
- Cotmore, S. F., Sturzenbecker, L. J. & Tattersall, P. (1983):** The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural proteins in addition to its capsid polypeptides. *Virol.* **129**, 333-43.
- Cotmore, S. F., D'Abramo, A. M. jr., Carbonell, L. F., Bratton & J., Tattersall, P. (1997):** The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virol.* **231**, 267-280.
- Cotmore, S. F., Christensen, J., Nuesch, J. P. & Tattersall, P. (1995):** The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]<sub>2-3</sub>. *J. Virol.* **69**, 1652-60.
- Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., & Taniguchi, M. (1997):** Requirement for V $\alpha$ 14 + NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* **278**, 1623-6.
- Cziepluch, C., Kordes, E., Poirey, R., Grewenig, A., Rommelaere, J. & Jauniaux, J. C. (1998):** Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1. *J. Virol.* **72**, 4149-56.
- Daerffler, L., Rommelaere, J. & Nüesch, J. P. (2000):** Regulation of NS1 functions in the course of a viral infection. *VIII Parvovirus Workshop Quebec (Canada)* p119.
- Dahinden, C. A., Geiser, T., Brunner, T., von Tschanner, V., Caput, D., Ferrara, P., Minty, A. & Baggiolini, M. (1994):** Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J. Exp. Med.* **179**, 751-6.
- David-Pfeuty, T., Chakrani, F., Ory, K. & Nouvian-Dooghe, J. (1996):** Cell cycle-dependent regulation of nuclear p53 traffic occurs in one subclass of human tumor cells and in untransformed cells. *Cell Growth Diff.* **7**, 1211-25.
- De Giovanni, C., Nicoletti, G., Sensi, A., Pamieri, G., Landuzzi, L., Nanni, P. & Lollini, P. L. (1994):** H-2D<sup>b</sup> gene transfections in B16 melanoma differently affect non-immunological properties relevant to the metastatic process. Involvement of integrin molecules. *Int. J. Cancer* **59**, 269-74.

- Deleu, L., Fuks, F., Spitkovsky, D., Horlein, R., Faisst, S. & 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**, 409-19.
- Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S. & Rommelaere, J. (1999):** Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J. Virol.* **73**, 3877-85.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Aii-Yahia, S., Bière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S. & Caux, C. (1998):** Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* **188**, 1-14.
- Dieu-Nosjean, M.C., Vicari, A., Lebecque, S. & Caux, C. (1999):** Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 252-62.
- Dinsart, C., Cornelis, J. J. & Rommelaere, J. (1996):** Recombinant autonomous paroviruses: New tools for the gene therapy of cancer. *Chimica Oggi/Chemistry Today* **9**, 32-8.
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D. & Mulligan, R. C. (1993):** Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3539-43.
- Dranoff, G. & Mulligan, R. C. (1995):** Gene transfer as cancer treatment. *Adv. Immunol.* **58**, 417-54.
- Dupont, F. (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.
- Dupont, F., Avalosse, B., Karim, A., Mine, N., Bosseler, M., Maron, A., Van den Broeke, A. V., Ghanem, G. E., Burny, A. & Zeichner, M. (2000):** Tumor-selective gene transduction and cell-killing with an oncotropic autonomous parvovirus-based vector. *Gene Ther.* **1**, 790-6.
- Dupressoir, T., Vanacker, J. M., Cornelis, J. J., Duponchel, N. & Rommelaere, J. (1989):** Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **49**, 3203-8.
- Dupressoir, T. (1993):** Phase I clinical study on the possible use of H-1 parvovirus in cancer treatment. *5<sup>th</sup> parvovirus workshop*, Cristal River
- Faisst, S., Guittard, D., Benner, A., Cerborn, J. Y., Schlehoffer, J. R., Rommelaere, J. (1998):** Dose-dependent regression of HeLa cell-delivered tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection. *Int. J. Cancer* **75**, 584-9.
- Faure, F., Even, J. & Kourilsky, P. (1998):** Tumor-specific immune response: current in vitro analyses may not reflect the in vivo immune status. *Crit. Rev. Immunol.* **18**, 77-86.
- Faust, E. A. & Ward, D. C. (1979):** Incomplete genomes of the parvovirus minute virus of mice: selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication. *J. Virol.* **32**, 276-92.
- Ferrone, S. & Marincola, F. M. (1995):** Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol. Today* **16**, 487-94.

- Fioretti, F., Fradelizi, D., Stoppacciaro, A., Ramponi, S., Ruco, L., Minty, A., Sozzani, S., Garlanda, C., Vecchi, A. & Mantovani A. (1998).** Reduced tumorigenicity and augmented leukocyte infiltration after monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) gene transfer: perivascular accumulation of dendritic cells in peritumoral tissue and neutrophil recruitment within the tumor. *J. Immunol.* **161**, 342-6
- Folkman, J. (1990):** What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 4-6.
- Ford, T., Graham, J. & Rickwood, D. (1994):** Iodixanol: A nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal. Biochem.* **220**, 360-6.
- Franci, C., Wong, L.M., Van Damme, J., Proost, P. & Charo, I.F. (1995):** Monocyte chemoattractant protein-3, but not monocyte chemoattractant protein-2, is a functional ligand of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor. *J. Immunol.* **154**, 6511-7.
- Fujii, H., Inobe, M., Kimura, F., Murata, J., Murakami, M., Onishi, Y., Azuma, I., Uede, T. & Saiki, I. (1996):** Vaccination of tumor cells transfected with the B7-1 (CD80) gene induces the anti-metastatic effect and tumor immunity in mice. *Int. J. Cancer* **66**, 219-24.
- Fuks, F., Deleu, L., Dinsart, C., Rommelaere, J. & Faisst, S. (1996):** Ras onogene-dependent activation of the P4 promoter of minute virus of micethrough a proximal P4 element interacting with the Ets family of transcription factors. *J. Virol.* **70**, 1331-9.
- Garrido, F., Cabrera, T., Lopez-Nevot, M. A. & Ruiz-Cabello, F. (1995):** HLA class I antigens in human tumors. *Adv. Cancer Res.* **67**, 155-95.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Vilar, J. J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M. & Stern, P. L. (1997):** Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* **18**, 89-95.
- Gazzinelli, R. T., Eltoun, I., Wynn, T. A. & Sher, A. (1993):** Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF- $\alpha$  and Correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J. Immunol.* **151**, 3672-81.
- Giese, N. A., DeMartino, L., Haag, A., Dinsart, C., Cornelis, J. J. & Rommelaere, J. (2000):** Autonomous parvovirus-based vectors: potential for the gene therapy of cancer. In: Targeting of drugs, strategies of gene constructs and delivery. *IOS Press, Amsterdam*
- Gong, J., Uguccioni, M., Dewald, B., Baggiolini, M. & Clark-Lewis, I. (1996):** RANTES and MCP-3 antagonists bind multiple chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 10521-7.
- Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Russel, J. H. & Ley, T. J. (1997):** Perforin/granzyme dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* **100**, 904-11.
- Greco, G., Mackewicz, C., Levy, J. A. (1999):** Sensitivity of human immunodeficiency virus infection to various alpha, beta and gamma chemokines. *J. Gen. Virol.* **80**, 2369-73.
- Gu, M. L., Chen, F. X. & Rhode, S. L. (1992):** Parvovirus H-1 P38 promoter requires the trans-activation region (tar), an SP1 site, and a TATA box for full activity. *Virol.* **187**, 10-7.
- Gudas, J. M., Nguyen, H., Li, T., Sadzewicz, L., Robey, R., Wosikowksi, K. & Cowan, K. H. (1996):** Drug-resistant breast cancer cells frequently retain expression of a functional wild-type p53 protein. *Carcinogenesis* **17**, 1417-27.

- Guetta, E., Graziani, Y. & Tal, J. (1986):** Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**, 1177-80.
- Haag, A., Menten, P., Van Damme, J., Dinsart, C., Rommelaere, J. & Cornelis, J. J. (2000):** High efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by mean of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum. Gene Ther.* **11**, 597-609.
- Hanson, N. D. & Rhode, S. L. d. (1991):** Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *J. Virol.* **65**, 4325-33.
- Hardt, N., Dinsart, C., Spadari, S., Pedrali-Noy, G. & Rommelaere, J. (1983):** Interrelation between viral and cellular DNA synthesis in mouse cells infected with the parvovirus minute virus of mice. *J. Gen. Virol.* **64**, 1991-8.
- Harris, C. E., Boden, R. A. & Astell, C. R. (1999):** A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J. Virol.* **73**, 72-80.
- Haubrich, R., McCutchan, J. A., Holdredge, R., Heiner, L., Merritt, J. & Merchant, B. (1995):** An open label, phase I/II clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (V) (HIV-1IIIIBenv/rev retroviral vector) in HIV-1-infected subjects. *Hum. Gene Ther.* **6**, 941-55.
- Heath, W. R. & Carbone, F. R. (1999):** Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 314-8.
- Hedrick, J. A. & Zlotnik, A. (1996):** Chemokines and lymphocyte biology. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 343-7.
- Heinrich, J. N., Ryseck, R. P., Macdonald-Bravo, H. & Bravo, R. (1993):** The product of a novel growth factor-activated gene, *fic*, is a biologically active C-C-type cytokine. *Mol. Cell Biol.* **13**, 2020-30.
- Hellstrom, I., & Hellstrom, K. E. (1998):** Tumor vaccines--a reality at last? *J. Immunother.* **21**, 119-26.
- Hermann, P., Blanchard, D., de Saint-Vis, B., Fossiez, F., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Biere, F., Blanchereau, J. & Galizzi, J. P. (1993):** Expression of a 32kDa ligand for CD40 antigen on activated human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **23**, 961-4.
- Hermens, W., Ter Brake, O., Dijkhuizen, P. A., Sonnemans, M., Grimm, D., Kleinschmidt, J. A. & Verhaagen, J. (1999):** Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient centrifugation allows rapid and reproducible preparation of virus stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1885-91.
- Holmgren, L., O'Reilly, M. S. & Folkman, J. (1995):** Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med.* **1**, 149-53.
- Horuk, R. & Peiper, S. C., (1995):** The chemokine receptor family. *Exp. Opin. Ther. Patents* **5**, 1185-91.
- Huang, S., Singh, R. K., Xie, K., Gutman, M., Berry, K. K., Bucana, C. D., Fidler, J. J. & Bar-Eli, M. (1994):** Suppression of tumor growth and metastatic potential in murine colon carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **39**, 231-8.
- Inaba, K., Schuler, G., Witmer, M. D., Valinsky, J., Atassi, B. & Steinmann, R. M. (1986):** Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* **164**, 605-13.

- Jacoby, R. O., Ball-Goodrich, L. J., McKisic, M. D., Riley, L. K. & Smith, A. L. (1996):** Rodent parvovirus infections. *Lab. Anim. Sci.* **46**, 370-80.
- Jia, W. W., McDermott, M., Goldie, J., Cynader, M., Tan, J. & Tufaro, F. (1994):** Selective destruction of gliomas in immunocompetent rats by thymidine kinase-defective herpes simplex virus type 1. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 1209-15.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinmann, R. M. & Nussenzweig, M. C. (1995):** The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-5.
- Jongeneel, C. V., Sahli, R., McMaster, G. K., Hirt, B. (1986):** A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J. Virol.* **59**, 564-73.
- Johnson, T. M., Smith, J. W., Nelson, B. R. & Chang, A. (1995):** Current therapy for cutaneous melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **32**, 689-707.
- Kägi, D., Ledemann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. (1994):** Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* **369**, 31-36.
- Kennedy, J., Kelner, G. S., Kleyensteuber, S., Schall, T. J., Weiss, M. C., Yssel, H., Schneider, P. V., Cocks, B. G., Bacon, K. B. & Zlotnik, A. (1995):** Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* **155**, 203-9.
- Kestler, J., Neeb, B., Struyf, S., van Damme, J., Cotmore, S., D'Abramo, A., Tattersall, P., Rommelaere, J., Dinsart, C., Cornelis, J. (1999):** Cis-requirements for the efficient production of recombinant vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1619-32.
- Kilham, L. & Olivier, L. J. (1959):** A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virol.* **7**, 428-437.
- Kirn, D. H. & McCormick, F. (1996):** Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol. Med. Today* **2**, 519-27.
- Kirschstein, R. L., Smith, K. O. & Peters, E. A. (1968):** Inhibition of adenovirus 12 oncogenicity by adeno-associated virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **128**, 670-3.
- Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Nishimura, S., Otha, A., Ohmi, Y., Ono, S., Takeda, K., Okumura, K. & Van Kaer, K. (1999):** The natural killer T (NKT) cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J. Exp. Med.* **189**, 1121-8.
- Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elner, V. M., Elner, S. G. & Strieter, R. M. (1992):** Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**, 1798-81.
- Krady, J. K. & 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**, 524-33.
- Krauskopf, A. & Aloni, Y. (1994):** A cellular receptor regulates transcription initiation from the minute virus of mice P38 promoter. *Nucleic Acids Res.* **22**, 828-34.
- Kremer, E.J. & Perricaudet, M. (1995):** Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer. *Br. Med. Bull.* **51**, 31-44.

- Labieniec-Pintel, L. & Pintel, D. (1986):** The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins. *J. Virol.* **57**, 1163-7.
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lantz, O. & Bendelac, A. (1994):** An invariant T cell receptor  $\alpha$  chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>8</sup>T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* **180**, 2091-106.
- Larson, L. E., Heglund, I. F., Fabian, R., Walday, P. & Blazak, W. F. (1995):** Neural tolerability of iodixanol in mice and dogs after single and repeated intracisternal administration. *Acta Radiol.* **36**, 238-43.
- Legendre, D. & 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**, 7974-85.
- Legrand, C., Rommelaere, J., Caillet-Fauquet, P. (1993):** MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells. *Virol.* **195**, 149-55.
- Linser, P., Bruning, H. & Armentrout, R. W. (1977):** Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J. Virol.* **24**, 211-21.
- Linser, P., Bruning, H. & Armentrout, R. W. (1979):** Uptake of minute virus of mice into cultured rodent cells. *J. Virol.* **31**, 537-45.
- Locati, M., Lamorte, G., Luini, W., Introna, M., Bernasconi, S., Mantovani, A. & Sozzani, S. (1996):** Inhibition of monocyte chemotaxis to C-C chemokines by antisense oligonucleotide for cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **271**, 6010-6.
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. & Moser, B. (1994):** Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *FASEB* **8**, 1055-60
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. & Moser, B. (1996):** Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization and enzyme release. *J. Immunol.* **156**, 322-7.
- Lollini, P., De Giovanni, C., Nicoletti, G., Bontadini, A., Tazzari, P. L., Landuzzi, L., Scotlandi, K. & Nanni, P. (1990).** Enhancement of experimental metastatic ability by tumor necrosis factor- $\alpha$  alone or in combination with interferon- $\gamma$ . *Clin. Exp. Metastasis* **8**, 215-24.
- Lopez, M. F., Nunes, M. P., Henriques-Pons, A., Giese, N., Morse, H. C., Davidson, F. W., Araujo-Jorge, T. C. & DosReis, G. A. (1999):** Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to trypanosoma cruzi infection due to a Th2-biased host immun response. *Eur. J. Immunol.* **29**, 81-9.
- Lowin, B., Beermann, F., Schmidt, A. & Tschopp, J. (1994):** A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11571-5.
- Lum, G. S. & Schreier, A. W. (1963):** Study of a virus isolated from a chloroleukemic Wistar rat. *Cancer Res.* **23**, 1742-1747.
- Luster, A. D. (1998):** Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Eng. J. Med.* **338**, 436-45.

- MacManus, C., Berman, J. W., Brett, F. M., Staunton, H., Farrell, M., & Brosnan, C. F. (1997):** MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions; an immunohistochemical and in situ hybridisation study. *J. Neuroimmunol.* **86**, 20-9.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Sozzani, S., Peri, G., Allavena, P., Dong, Q. G., Vecchi, A. & Colotta, F. (1993).** Cytokine regulation of tumour-associated macrophages. *Res. Immunol.* **144**, 280-
- Mayo, J. G. (1972).** Biologic characterizaation of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemother. Rep.* **2**, 325-30
- Marshall, E. (1999):** Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* **17**, 2244-5.
- Maxwell, I. H., Maxwell, F., Rhode, S. L., Corsini, J. & Carlson, J.O. (1993):** Recombinant LuIII autonomous parvovirus as a transient transducing vector for human cells. *Hum Gene Ther.* **4**, 441-50.
- McKisic, M. D., Paturzo, F. X. & Smith, A. L. (1996):** Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T cell effector functions. *Transplantation* **61**, 292-9.
- McPherson, R. A. & Rosenthal, L. J. (1985):** Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Viol.* **147**, 217-220.
- McQuibban, G. A., Gong, J., Tam, E. M., McCulloch, C., Clark-Lewis, I. & Overall, C. M. (2000):** Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* **289**, 1202-6.
- Menten, P., Proost, P., Struyf, S., Van Coillie, E., Put, W., Lenaerts, J. P., Conings, R., Jaspar, J. M., De Groote, D., Billiau, A., Opdenakker, G. & Van Damme, J. (1999).** Differential induction of monocyte chemotactic protein-3 in mononuclear leukocytes and fibroblasts by interferon-alpha/beta and interferon-gamma reveals MCP-3 heterogeneity. *Eur. J. Immunol.* **29**, 678-85.
- Minty, A., Chalon, P., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Liauzun, P., Magazin, M., Miloux, B., Minty, C., Ramond, P. & Vita, N., (1993):** Molecular cloning of the MCP-3 chemokine gene and regulation of its expression. *Eur. Cytokine Netw.* **4**, 99-110.
- Morgen, R. A. & Anderson, W. F. (1993):** Human gene therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 191-217.
- Morgan, W. R. & 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**, 1170-4.
- Mousset, S., Cornelis, J., Spruyt, N., 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**, 951-5.
- Mousset, S., Ouadrhiri, Y., Caillet-Fauquet, P., 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**, 6446-53.
- Murakami, K., Nomiya, H., Mirura, R., Follens, A., Fiten, P., Van Coillie, E., Van Damme, J. & Opdenakker, G. (1997):** Structural and functional analysis of the promoter region of the human MCP-3 gene: transactivation of expression by novel recognition sequences adjacent to the transcription initiation site. *DNA Cell Biol.* **16**, 173-83.
- Murphy, G. P. & Hrushessky, W. J. (1972):** A murine renal cell carcinoma. *J. Cancer Inst.* **50**, 1013-25

- Naeger, L. K., Salome, N. & Pintel, D. J. (1993):** NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J. Virol.* **67**, 1034-43.
- Nakao, M., Sata, M., Saito, H., Yutani, S., Kawamoto, M., Kojiro, M. & Itoh K. (1997):** CD4+ hepatic cancer-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma. *Cell Immunol.* **177**, 176-81.
- Nanni, B., Rossi, I., De Giovanni, C., Landuzzi, L., Nicoletti, G., Stoppacciaro, A., Parenza, M., Colombo, M. & Lollini, P. (1998):** Interleukin 12 gene therapy of MHC-negative murine melanoma metastasis. *Cancer Res.* **58**, 1225-30.
- Noso, N., Proost, P., Van Damme, J. & Schroder, J. M. (1994):** Human monocyte chemotactic proteins-2 and 3 (MCP-2 and MCP-3) attract human eosinophils and desensitize the chemotactic responses towards RANTES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1470-6.
- Nuesch, J. P., Cotmore, S. F., Tattersall, P. (1995):** Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virol.* **209**, 122-35.
- Nuesch, J. P., Corbau, R., Tattersall, P., 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**, 8002-12.
- Nuesch, J. P., Dettwiler, S., Corbau, R. & 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**, 9966-77.
- Op De Beeck, A., Anouja, F., Mousset, S., Rommelaere, J. & 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**, 781-7.
- Op De Beeck, A. & 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**, 5323-9.
- Opdenakker, G. & Van Damme, J. (1994):** Cytokines and proteases in invasive processes: molecular similarities between inflammation and cancer. *Cytokine* **4**, 251-8.
- Opdenakker, G., Fibbe, W. E. & Van Damme, J. (1998):** The molecular basis of leukocytosis. *Immunol. Today* **19**, 182-9.
- Opdenakker, G., Froyen, G., Fiten, P., Proost, P. & Van Damme J. (1993):** Human monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3): Molecular cloning of the cDNA and comparison with other chemokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 535-42.
- Opdenakker, G., Fiten, P., Nys, G., Froyen, G., Van Roy, N., Speleman, F., Laureys, G. & Van Damme, J. (1994):** The human MCP-3 gene (SCYA7): cloning, sequence analysis, and assignment to the C-C chemokine gene cluster on chromosome17q11.2-q12. *Genomics* **21**, 403-8.
- Paradiso, P. R. (1981):** Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. *J. Virol.* **39**, 800-7.
- Parker, C., Whittaker, P. A., Usmani, B. A., Lakshimi, M. S. & Sherbet, G. V. (1994):** Induction of 18A2/mts 1 gene expression and its effects on metastasis and cell cycle control. *DNA Cell Biol.* **13**, 1021-8.

- Parker, J., Parrish, C. R. (2000):** Canine parvovirus (CPV) is trafficked to the recycling endosome after virus entry in mink and feline cells but not in canine cells. *VIII Parvovirus Workshop Quebec (Canada)* p44.
- Penton-Rol, G., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Mancinelli, R., Sica, A., Sozzani, S. & Mantovani A. (1998):** Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma. *J. Immunol.* **160**, 3869-73.
- Permack, B. A. & Schall, T. J. (1996):** Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat. Med.* **2**, 1174-8.
- Pinkoski, M. J., Hobmann, M., Heibin, J. A., Tomaselli, K., Li, F., Seth, P., Froelich, C. J. & Bleackley, R. C. (1998):** Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* **92**, 1044-54.
- Pintel, D., Dadachanji, D., Astell, C. R. & Ward, D. C. (1983):** The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucleic Acids Res* **11**, 1019-38.
- Pintel, D., Gersappe, A., Haut, D. & Pearson, J. (1995):** Determinants that govern alternative splicing of parvovirus pre-mRNAs. *Sem. Virol.* **6**, 283-290.
- Polentarutti, N., Introna, M., Sozzani, S., Mancinelli, R., Mantovani, G. & Mantovani, A. (1997):** Expression of monocyte chemotactic protein-3 in human monocytes and endothelial cells. *Eur Cytokine Netw.* **8**, 271-4.
- Porgador, A., Tzehoval, E., Vadai, E., Feldman, M. & Eisenbach, L. (1995):** Combined vaccination with major histocompatibility class I and interleukin 2 gene-transduced melanoma cells synergizes the cure of postsurgical established lung metastases. *Cancer Res.* **55**, 4941-9.
- Porgador, A., Mandelboim, O., Restifo, N. P. & Strominger, J. L. (1997):** Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13140-5.
- Previsiani, N., Frontana, S., Hirt, B. & Beard, P. (1997):** Growth of the parvovirus minute of mice MVMP in ELA Lymphocytes is restricted after cell entry and before viral DNA amplification: Cell-specific differences in virus uncoating in vitro. *J. Virol.* **71**, 7769-80.
- Pringle, C. R. (1998):** Virus taxonomy-San Diego 1998. *Arch. Virol.* **143**, 1449-59.
- Proost, P., Wuyts, A. & Van Damme, J. (1996):** Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 67-74.
- Pujol, A., Deleu, L., Nuesch, J. P., Cziepluch, C., Jauniaux, J. C. & 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**, 7393-403.
- Rayet, B., Lopez-Guerrero, J. A., Rommelaere, J. & Dinsart, C. (1998):** Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J. Virol.* **72**, 8893-903.
- Rhode, S. L. (1973):** Replication process of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous cell system. *J. Virol.* **11**, 856-61.
- Rhode, S. L. (1987):** Construction of a genetic switch for inducible trans-activation of gene expression in eucaryotic cells. *J. Virol.* **61**, 1448-56.

- Rhode, S. L. & Paradiso, P. R. (1983):** Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J. Virol.* **45**, 173-84.
- Richards, R. G. & Armentrout, R. W. (1979):** Early events in parvovirus replication: lack of integration by minute virus of mice into host cell DNA. *J. Virol.* **30**, 397-9.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. (1998):** A conditioned dendritic cell can be a temporary bridge between a CD4<sup>+</sup> T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**,474-8.
- Romani, N., Koide, S., Growley, M. T., Tardelli, L., Witmer-Pack, M. D., Ruberti, G., Fathman G. G., Inaba, K. & Steinmann, R. M. (1989):** Presentation of exogenous proetin antigens by dendritic cells to T cell clones. *J. Exp.Med.* **169**, 1169-78.
- Rollins, B. J. (1997):** Chemokines.*Blood* **90**, 909-28.
- Rommelaere, J. & Cornelis, J. J. (1991):** Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* **33**, 233-51.
- Roth, S. J., Carr, M. W. & Springer, T. A. (1995):** C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **25**, 3482-8.
- Russell, S. J., Brandenburger, A., Flemming, C. L., Collins, M. K. & Rommelaere, J. (1992):** Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus. *J. Virol.* **66**, 2821-8.
- Safari, M. N., Garcia-Zepeda, E. A., MacLean, J. A., Charo, I. F. & Luster, A. D. (1997):** Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC Chemokine that is a struktural and funtional homolgue of human MCP-1. *J. Exp. Med.* **185**, 99-109.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S. & Lanzavecchia, R. (1998):** Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2760-9.
- Salome, N., van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J. & Cornelis, J. J. (1990):** Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMP is restricted to specific oncogenes. *Oncogene* **5**, 123-30.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989):** Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Habor, New York
- Santaren, J. F., Ramirez, J. C. & Almendral, J. M. (1993):** Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMP: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis. *J. Virol.* **67**, 5126-38.
- Schmidt-Wolf, G. & Schmidt-Wolf, I. G. H., (1994):** Human cancer and gene therapy. *Ann. Hematol.* **69**, 273-9.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. J., Offringa, R. & Melief, C. J. (1998):** T cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480-3.
- Schols, D., Proost, P., Van Damme, J. & De Clercq, E. (1997):** RANTES and MCP-3 inhibit the replication of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains (SF-2, MN, and HE). *J. Virol.* **71**, 7300-4.

- Schweickart, V. L., Epp, A., Raport, C. J. & Gray, P. W. (2000):** CCR11 is a functional receptor for the monocyte chemoattractant protein family of chemokines. *J. Biol. Chem.* **275**, 9550-6.
- Sfondrini, L., Rodolfo, M., Singh, M., Colombo, M. P., Colnaghi, M. I., Menard, S. & Balsari, A. (2000):** Cooperative effects of Mycobacterium tuberculosis Ag38 gene transduction and interleukin 12 in vaccination against spontaneous tumor development in proto-neu transgenic mice. *Cancer Res.* **60**, 3777-81.
- Shresta, S., MacIvor, D. M., Heusel, J. W., Russel, J. H. & Ley, T. J. (1995):** Natural killer and lymphokine-activated-killer cells require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in susceptible target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5679-83.
- Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E. & Tattersall, P. (1985):** Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *InterVirol.* **23**, 61-73.
- Siegl, G. & Gautschi, M. (1973):** The multiplication of parvovirus Lu3 in a synchronized culture system. *Arch. Ges. Virusforsch.* **23**, 61-73.
- Smith, A. E. (1995):** viral vektors in gene therapy. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**, 807-36.
- Sozzani, S., Zhou, D., Locati, M., Rieppi, M., Proost, P., Magazin, M., Vita, N., Van Damme, J. & Mantovani, A. (1994):** Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. *J. Immunol.* **152**, 3615-22.
- Sozzani, S., Sallusto, F., Luini, W., Zhou, D., Piemonti, L., Allavena, P., Van Damme, J., Valitutti, S., Lanzavecchia, A. & Mantovani, A. (1995):** Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J. Immunol.* **155**, 3292-5.
- Sozzani, S., Allavena, P., Proost, P., Van Damme, J. & Mantovani, A. (1996):** Chemokines as targets for pharmacological intervention. *Prog. Drug Res.* **47**, 53-80
- Sozzani, S., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Zhou, D., Piemonti, L., D'Amico, G., Power, C. A., Wells, T. N., Gobbi, M., Allavena, P. & Mantovani, A. (1997):** Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J. Immunol.* **159**, 1993-2000.
- Spalholz, B. A. & Tattersall, P. (1983):** Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain- dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J. Virol.* **46**, 937-43.
- Springer, T. A. (1994):** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte migration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-14.
- Sredni, B., Tichler, T., Shani, A., Catane, R., Kaufmann, B., Strassmann, G., Albeck, M. & Kalechmann, Y. (1996):** Predominance of TH1 response in tumor-bearing mice and cancer patients treated with AS101. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1276-84.
- Stout, R. D. & Suttles, J. (1996):** The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol. Today* **17**, 487-92.
- Sun, Y., Paschen, A. & Scharendorf, D. (1999):** Cell-based vaccination against melanoma-background, preliminary results, and perspectives. *J. Mol. Med.* **77**, 593-608.

- Tannenbaum, C. S., Wicker, N., Armstrong, D., Tubbs, R., Finke, J., Bukowski, R. M. & Hamilton, T. A. (1996):** Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12. *J. Immunol.* **156**, 693-9.
- Tattersall, P. (1972):** Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J. Virol.* **10**, 586-590.
- Tattersall, P. (1978):** Susceptibility of minute virus of mice as a function of host cell differentiation. In *Replication of mammalian parvovirus*, pp. 131-149. Edited by I. D. C. W. a. P. T. (Ed.). Cold Spring harbour, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Tattersall, P. & Bratton, J. (1983):** Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.* **46**, 944-55.
- Tattersall, P. & Cotmore, S. (1986):** The rodent parvoviruses. In: Bhatt, P. H., *et al.* Viral and mycoplasma infections of laboratory rodents: Effects on biomedical research. *Academic Press, N. Y.*, 305-48.
- Tattersall, P. & Ward, D. C. (1976):** Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* **263**, 106-9.
- Tattersall, P., Shatkin, A. J. & Ward, D. C. (1977):** Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *J. Mol. Biol.* **111**, 375-94.
- Taub, D. D., Proost, P., Murphy, W.J., Anver, M., Longo, D.L., Van Damme, J. & Oppenheim, J. J. (1995a):** Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **95**, 1370-6.
- Taub, D. D., Sayers, T. J., Carter, C. R. & Ortaldo, J. R. (1995b):** Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **155**, 3877-88.
- Telerman, A., Tuynder, M., Dupressoit, T., Robaye, B., Sigaux, F., Shaulian, E., Oren, M., Rommelaere, J., Amon, R. (1993):** A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8702-6.
- Thirion, S., Nys, G., Fiten, P., Masure, S., Van Damme, J. & Opdenakker, G. (1994):** Mouse macrophage derived monocyte chemotactic protein-3: cDNA cloning and identification as MARC/FIC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 493-9.
- Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Larue-Charlus, S., Severin, F., Becker, N. & Schlehofer, J. R. (1994):** Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J. Med. Virol.* **44**, 215-22.
- Tomura, M. Yu, W. G., Ahn, H. J., Yamashita, M., Yang, Y. F., Ono, S., Hamaoka, T., Kawano, T., Taniguchi, M., Koezuka, Y. & Fujiwara, H. (1999):** A novel function of V $\alpha$ 14 + CD4 + NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J. Immunol.* **163**, 93-101.
- Toolan, H. W. (1967):** Lack of oncogenic effect of the H-viruses for hamsters. *Nature* **214**, 1036.
- Toolan, H. W., Buttle, G. A. H. & Kay, H. E. M. (1962):** Isolation of the H-1 and H-3 viruses directly from human embryos. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **3**, 368.
- Toolan, H. W., Rhode, S. L. & 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**, 2552-5.

- Toolan, H. W., Saunders, E. L., Southam, C. M., Moore, A. E. & Levin, A. G. (1965):** H-1 virus viremia in the human. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 711-715.
- Uguccioni, M., D'Apuzzo, M., Loetscher, M., Dewald, B. & Baggiolini, M. (1995):** Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **25**, 64-8.
- Uguccioni, M., Mackay, C.R., Ochensberger, B., Loetscher, P., Rhis, S., LaRosa, G. J., Rao, P., Ponath, P. D., Baggiolini, M. & Dahinden, C. A. (1997):** High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J. Clin. Invest.* **100**, 1137-43.
- Van Coillie, E., Van Damme, J. & Opdenakker, G. (1999):** The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**, 61-68.
- Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J.P. & Opdenakker, G. (1992):** Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J. Exp. Med.* **176**, 59-65.
- Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J.P., Conings, R., Opdenakker, G. & Billiau, A. (1993):** Monocyte chemotactic proteins related to human MCP-1. *Adv. Exp. Med. Biol.* **351**, 111-8.
- Vanacker, J. M. & Rommelaere, J. (1995):** Non-structural proteins of autonomous parvoviruses: from cellular effects to molecular mechanisms. *Sem. Virol.* **6**, 291-298.
- Vanacker, J. M., Corbau, R., Adelmant, G., Perros, M., Laudet, V. & Rommelaere, J. (1996):** Transactivation of a cellular promoter by the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice through a putative hormone-responsive element. *J. Virol.* **70**, 2369-77.
- Van Hille, B., Duponchel, N., Salome, N., Spruyt, N., Cotmore, S. F., Tattersall, P., Cornelis, J. J. & 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. *Virol.* **171**, 89-97.
- Vecchi, A., Massimiliano, L., Ramponi, S., Luini, W., Bernasconi, S., Bonecchi, R., Allavena, P., Parmentier, M., Mantovani, A. & Sozzani, S. (1999):** Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 489-94.
- Vile, R. G., Russell, S. J. & Lemoine, N. R. (2000):** Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther.* **7**, 2-8.
- Ward, S. G., Bacon, K. & Westwick, J. (1998):** Chemokines and T-lymphocytes: more than an attraction. *Immun.* **9**,
- Williams, N. S., Moore, T. A., Schatzle, J. D., Puzanov, I. J., Sivakumar, P. V., Zlotnik, A., Bennett, M. & Kumar, V. (1997):** Generation of lytic natural killer 1.1+, Ly-49- cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates. *J. Exp. Med.* **186**, 1609-14.
- Wilson, G. M., Jindal, H. K., Yeung, D. E., Chen, W. & Astell, C. R. (1991):** Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virol.* **185**, 90-8.
- Winkelhauke, J. L. & Gauny, S. S. (1990):** Human recombinant interleukin-2 as an experimental therapeutic. *Pharm. Rev.* **42**, 1-64.

- Wolter, S., Richards, R. & Armentrout, R. W. (1980):** Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochim. Biophys. Acta* **607**, 420-31.
- Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H. & Yamaguchi, Y. (1998):** EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J. Immunol.* **161**, 3096-102.
- Yang, C., Crielli, C., Capogrossi, M C., Passaniti, A. (1995):** Adenovirus-mediated wildtype-p53 expression induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of prostatic tumor cell. *Cancer Res.* **55**, 4210-3.
- Yang, G., Mizuno, M. T., Hellstrom, K. E. & Chen, L. (1997):** B7-negative versus B7-positive P815 tumor: differential requirements for priming of an antitumor immune response in lymph nodes. *J. Immunol.* **158**, 851-8.
- Yang, T. J. (1987):** Parvovirus-induced regression of canine transmissible venereal sarcoma. *Am. J. Vet. Res.* **48**, 799-800.
- Yao, I., Sgadari, C., Furuk, K., Bloom, E. T., Teruya-Feldstein, J. & Tosato, G., (1999):** Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood* **93**, 1612-21.
- Young, H. A. & Hardy, K. J. (1995):** Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.* **58**, 373-81.
- Xu, L.L., McVicar, D.W., Ben-Baruch, A., Kuhns, D.B., Johnston, J., Oppenheim, J.J. & Wang, J.M. (1995):** Monocyte chemoattractant protein-3 (MCP3) interacts with multiple leukocyte receptors: binding and signaling of MCP3 through shared as well as unique receptors on monocytes and neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2612-7.
- Zhang, Y., Chirmule, N., Hildinger, M., Croyle, M., Guanf-ping, G. & Wilson, J. M. (2000):** Immunology of AAV as vectors for human gene therapy. *VIII<sup>th</sup> Parvovirus workshop, Quebec (Canada)* p64.
- Zolotukhin, S., Bryne, B. J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chestnut, K., Summerford, C., Samulski, R. J. & Muzyczka, N. (1999):** Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* **6**, 973-85.