

# INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Diplom Biologe Michael Behr  
aus Speyer am Rhein

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

# **De- und Retargeting adenoviraler Vektoren**

Gutachter:

Prof. Dr. Gabriele Petersen

Prof. Dr. Elisabeth Schwarz

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

Heidelberg, den

Michael Behr



3.5 DNA-Isolierung und Sequenzierung	38
3.6 Herstellung von löslichem Knob-Protein	40
3.6.1 Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry	40
3.6.2 Bestätigung der trimeren Struktur der Knob-Proteine durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.7 Adenoviren	42
3.7.1 Adenovirale Konstrukte	42
3.7.2 Herstellung und Propagierung der adenoviralen Konstrukte	43
3.7.2.1 Klonierung von Ad5.GFP	43
3.7.2.2 Herstellung genomisch fiberloser Ad5.GFP. $\Delta$ F/F <sup>+</sup>	44
3.7.3 Virusaufpropagierung, Ernte und Aufreinigung	47
3.7.4 Quantifizierung	48
3.7.4.1 Quantifizierung der Anzahl der physikalischen Partikel (OP/ml)	49
3.7.4.2 TCID-50 Bestimmung (Tissue Culture Infectious Dose 50)	49
3.7.5 Kontrolle der Qualität von Ad5.GFP. $\Delta$ F/F <sup>+</sup> -Präparationen	50
3.7.5.1 Vergleich des DNA-Gehaltes	50
3.7.5.2 Westernblot-Analyse	51
3.7.5.3 ELISA zur Quantifizierung der Effizienz des Einbaus von Fibern in Ad5.GFP. $\Delta$ F/F <sup>+</sup>	51
3.8 Zellkultur	52
3.9 Infektions- und Konkurrenzexperimente	55
3.9.1 Bestimmung der Anzahl GFP-positiver Zellen im Rahmen von Infektions- u. Konkurrenzexperimenten	55
3.9.2 Bestimmung der relativen Infizierbarkeit	56
3.9.3 Heparinase-Experimente	56
3.9.4 Konkurrenzexperimente mit Heparin und Knob-Protein	57
3.9.5 Nachweis adenoviraler DNA in Zellen nach Virusexposition in An- u. Abwesenheit von Konkurrenten	58
3.9.6 Exemplarische Darstellung der Bestimmung des Einflusses von Knob und Heparin auf die Infizierbarkeit der verwendeten Zelllinien am Beispiel eines Experiments mit glatten Muskelzellen.	59
3.10 Abkürzungen	62
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>64</b>
4.1 Der Einfluss der natürlichen Rezeptoren auf die Ad5 Infektion <i>in vitro</i> .	64
4.1.1 Vergleich der Infizierbarkeit verschiedener Dauer- und Primärzellen mit Ad5.GFP mittels TCID-Bestimmung.	65
4.1.2 Exposition verschiedener Dauerzellen und Primärzellen mit Ad5.Luc in einem therapeutisch relevanten Zeitfenster.	67
4.1.3 Einfluss von Heparinase auf die HSPG-vermittelte Ad5-Infektion	68
4.1.4 Konkurrenzexperimente mit löslichem Knob und Heparin	71
4.1.4.1 Ad5.Luc-Konkurrenzexperimente	72

4.1.4.2 Ad5.GFP-Kompetitionsexperimente	76
4.1.5 Semiquantitative Bestimmung der Ad5 DNA nach Internalisierung in An- und Abwesenheit von Kompetitoren	79
4.2 Modifikation von Kontaktaminosäuren für die Interaktion mit CAR innerhalb der Knobdomäne (Detargeting)	81
4.2.1 Kompetitionsexperimente mit modifiziertem löslichen Knob-Protein	81
4.2.2 Herstellung von detargeted Ad5.GFP. $\Delta$ F/F <sup>+</sup> in einem transienten Transfektions- und Infektionssystem	84
4.2.3 Infektionsexperimente mit detargeted Ad5.GFP. $\Delta$ F/F <sup>+</sup>	88
4.2.3.1 Infizierbarkeit von CAR-positiven HeLa-Zellen	88
4.2.3.2 Infizierbarkeit von CAR-negativen CHO-Zellen	90
4.3 Retargeting	92
4.3.1 Inkorporation von publizierten Peptiden und von Peptiden mit potentieller Spezifität für Glatte Muskelzellen in den HI-Loop der SP-modifizierten Fiber	92
4.3.2 Herstellung von retargeted Ad5.GFP. $\Delta$ F/F <sup>+</sup>	93
4.3.3 Infektions- u. Kompetitionsexperimente mit retargeted Ad5.GFP. $\Delta$ F/F <sup>+</sup>	96
4.3.3.1 Infektion von CHO-Zellen	97
4.3.3.2 Infektion von HeLa-Zellen	98
4.3.3.3 Infektion von A7r5	99
4.3.3.4 Infektion von CAEC	100
4.3.3.5 Infektion von CASMC	101
<b>5. Diskussion</b>	<b>103</b>
5.1 Die Wechselwirkung von Ad5 mit seinen natürlichen Rezeptoren	103
5.1.1 Etablierung eines 2-Komponenten-Kompetitionssystems zur Simulation von detargeted Ad-Vektoren	105
5.1.2 Der Einfluss der primären Rezeptoren auf die Infektion gentherapeutischer Zielzellen mit Ad5.Luc	106
5.1.3 Nachweis des Einflusses der HSPG-Interaktion auf die Ad5-Infektion durch Heparinase	107
5.1.4 Semiquantitativer Nachweis viraler DNA unmittelbar nach Internalisierung in An- und Abwesenheit von Knob und Heparin	108
5.2 Detargeting	110
5.3 Retargeting	117
<b>6. Literaturverzeichniss</b>	<b>124</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>149</b>
7.I Virale Vektorsysteme in der Gentherapie neben Adenoviren	149
7.II Adenovirale Vektorsysteme	151
7.III Eigenschaften der frühen Genprodukte	155

7.IV Ergebnisse der Ad5.Luc –Kompetitionsexperimente mit Heparin und Knob <i>in vitro</i>	156
7.V Der Vektor pQE-30/Ad5-Knob	160
7.VI Der Vektor pcDNA3.1(+) mit einklonierter TPL und Fibersequenz	162
7.VII Ergebnis der Sequenzanalyse zur Identifikation des SCMV-Promotors und des GFP-Reportergens aus pCSGFP3.	165

### 1. Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Modifikation des Tropismus von Adenovirus Subtyp 5 (Ad5) durch De- und Retargeting. In Infektions- und Konkurrenzexperimenten mit verschiedenen Dauerzellen und Primärzellen wurden die Wechselwirkungen von Ad5 mit seinen natürlichen Rezeptoren untersucht. Hierbei wurde ein *in-vitro* 2-Komponenten-Konkurrenzsystem etabliert, auf dessen Basis gezeigt werden konnte, dass Ad5 auf allen analysierten Zelllinien neben CAR (Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor) und HSPG (Heparansulfatproteoglykane) keine weiteren natürlichen primären Rezeptoren für die Infektion effizient nutzt. Beide Aufnahmemechanismen zeigen einen synergistischen Effekt bei der Vermittlung der Transduktion.

Im Rahmen des Detargetings wurden Kontaktaminosäuren modifiziert, die eine Rolle bei der Interaktion mit CAR spielen und im Kontext „pseudogetypter“ Viren untersucht. Die Grundlage zur Herstellung pseudogetypter adenoviraler Partikel war das genomisch fiberlose Konstrukt Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup>, welches in einem etablierten transienten Transfektions- und Infektionssystem mit modifizierten Fibern phänotypisch mit modifizierten Fibern ausgestattet wurde. Die Daten zeigen, dass der gleichzeitige Austausch der beiden Aminosäuren S408E/P409A innerhalb der Fiber die Interaktion mit CAR soweit herabsetzt, dass auch zusätzliche Modifikationen diesen Effekt nicht weiter verstärken.

Auf der Grundlage eines SP-modifizierten Fiberproteins wurden dann verschiedene Peptide mit einer potentiellen Spezifität für koronale glatte Muskelzellen in den exponierten HI-Loop der Fiber eingeführt und der Einfluss dieser Peptide auf die Infektiosität im Kontext „pseudogetypter“ Partikel im 2-Komponenten-Konkurrenzsystem untersucht. Da unter diesen Bedingungen eine Infektion über die natürlichen Rezeptoren nicht mehr möglich ist, konnte gefolgert werden, dass eine gesteigerte Transduktionseffizienz durch die Spezifität der inkorporierten Peptide vermittelt wurde. Hierbei konnte ein für glatte Muskelzellen spezifisches Peptid und ein RGD-artiges Peptid identifiziert werden, welches die Transduktionseffizienz von Ad5 gegenüber allen getesteten Zelllinien signifikant erhöhte.

Somit konnte gezeigt werden, dass ein Retargeting durch Einführung Zelltyp-spezifischer Peptide möglich ist und von den natürlichen Rezeptoren unabhängige Infektionswege von adenoviralen Vektoren genutzt werden können. Im Rahmen der gewählten experimentellen Bedingungen lagen die durch die spezifischen Peptide vermittelten Transduktionseffizienzen in Abwesenheit der natürlichen Rezeptorinteraktionen in einem Bereich von 3 – 7 %. Es wäre deshalb in weiteren Experimenten zu prüfen ob eine Steigerung der Vektordosis zu einer Steigerung der Transduktionseffizienz auf ein gentherapeutisch relevanten Maß führt und die spezifischen Rezeptoren in ausreichender Menge von den Zielzellen exprimiert werden.

### Summary

The focus of this work was the modification of the tropism of Adenovirus Subtype 5 (Ad5) by de- and retargeting. The interactions of Ad5 with its natural receptors were analyzed in infection- and competition experiments with several permanent and primary cells in an *in vitro* 2-component-competition-system. By using this system it was possible to demonstrate that Ad5 uses no other primary receptors besides CAR (Coxsackievirus-Adenovirus-Receptor) and HSPG (heparansulfate proteoglycans) to infect the analyzed cells efficiently. Both uptake mechanisms show a synergistic effect during mediation of transduction.

For detargeting several contact amino acids were exchanged, which play a role in CAR-interaction. The modifications were introduced in the fibers of so called pseudotyped viruses. These viruses (Ad5.GFP.ΔF/F<sup>+</sup>) do not possess a fibergene in their genomes but are phenotypically equipped with fiber proteins, which are provided in an established transient transfection and infection system. The data show that the double modification of amino acids S408E/P409A ablates CAR-interaction almost completely. Additional modifications of further contact residues did not enhance this effect any further.

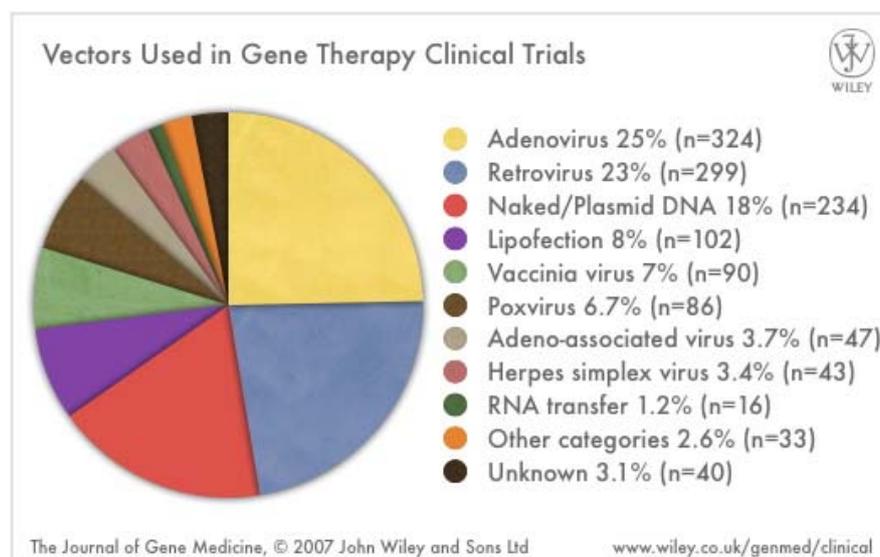
For retargeting, several peptides with a potential specificity for coronary aortic smooth muscle cells were introduced in SP-detargeted fibers and the infectivity of the pseudotyped viruses was analyzed *in vitro* in the 2-component-competition-system. Under these conditions infection via natural receptors is no longer possible and therefore it can be assumed, that infectivity is mediated by the incorporated ligands. The screening of retargeted Ads revealed a peptide with is specific for smooth muscle cells and an RGD-like peptide, capable to enhance infectivity in all tested cell lines.

It was shown, that the introduction of celltype-specific peptides lead to retargeting mediated by receptors independent from and CAR- and HSPG. In the absence of both natural receptor interactions, the transduction efficiencies mediated by the specific peptides were between 3 – 7 % within the range of the experimental conditions. Additional experiments are required to further validate if this transduction efficiency is sufficient for therapeutical use.

## 2. Einleitung

### 2.1 Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man den Transfer von genetischem Material in Zellen zu therapeutischen Zwecken. Prinzipiell kann hierbei zwischen somatischer Gentherapie und Keimbahntherapie unterschieden werden. Letztere ist zwar theoretisch machbar, wirft aber insbesondere ethische Einwände auf und ist daher u.a. in Deutschland verboten. In Abhängigkeit von den individuellen Bedingungen stehen der Gentherapie verschiedene Methoden des Gentransfers zur Verfügung. Zu den unspezifischen Verfahren gehören physikalische Methoden wie Transfektion, Elektroporation, Mikroinjektion und Partikelbombardierung. Die Aufnahme des Transgens ist hier unabhängig von zellulären Rezeptoren. In der Statistik machen diese unspezifischen Methoden etwas weniger als 30 % aller gentherapeutischer Studien aus. Zu den spezifischen Verfahren gehört der rezeptorvermittelte Gentransfer, bei der das Transgen an Liganden gekoppelt wird. Die weit überwiegende Mehrzahl der spezifischen Methoden basiert mit etwa 70 % aller klinischer Studien auf viralen Vektoren. Hierunter sind Adenoviren mit 25 % und Retroviren mit 23 % aller Studien die prominentesten Vertreter (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Verteilung der verschiedenen Vektoren im Rahmen gentherapeutischer klinischer Studien von 1989 bis zum laufenden Jahr 2007. Aus: *The Journal of Gene Medicine Clinical Trial Database (Wiley Database)*.

Die somatische Gentherapie kann entweder *ex vivo* oder *in vivo* erfolgen. Die Möglichkeiten der *ex vivo*-Therapie beschränken sich auf jene Zellen und Gewebe, deren Entnahme sich unkompliziert gestaltet. Ist dies nicht ohne weiteres möglich, wie bei Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, des ZNS, Tumoren oder des Atmungstraktes, muss das therapeutische Transgen entweder systemisch oder direkt in das betroffene Gewebe appliziert werden. Das setzt voraus, dass die Zielzellen möglichst spezifisch und effektiv das Transgen aufnehmen, wodurch die Wahl des Vektors hier besonders kritisch ist. Von allen gentherapeutischen Vektorsystemen besitzen virale Vektoren durch ihre Interaktion mit zellulären Rezeptoren die größte Spezifität. Hierbei möchte man auf der einen Seite die Fähigkeit von Viren nutzen, ihre Gene effizient in Zellen einzubringen und zu exprimieren, aber andererseits die mit der Infektion verbundenen pathogenen Eigenschaften nach Möglichkeit minimieren. In der Regel ist hierbei die Expression viraler Gene insbesondere in Hinblick auf Toxizität, Immunogenität und Replikation unerwünscht.

Prinzipiell kann man virale Vektoren in zwei Gruppen einteilen: Diejenigen, die ihr Genom in die Wirts-DNA integrieren (Retroviren und Lentiviren) und solche, deren Genom im Kern hauptsächlich extrachromosomal als Episom vorliegt (Herpesviren, AAV und Adenoviren) (Anhang 7.I). Adenoviren besitzen von allen in der Gentherapie verwendeten viralen Vektoren die größte Effizienz, erfolgreich Zellen zu transduzieren und sind in der Lage, sowohl ausdifferenzierte ruhende Zellen wie auch proliferierende Zellen erfolgreich zu infizieren, wobei die Infektiosität maßgeblich auf die verbreitete Präsenz der natürlichen Rezeptoren zurückzuführen ist. Allerdings liegt gerade hier die Achillesferse für den Einsatz dieser Vektoren in der Gentherapie. Neben den potentiellen Zielzellen, käme es zu einer Infektion aller die primären Rezeptoren exprimierender Zellen und Gewebe. Gemäß der Statistik des Journals of Gene Medicine auf der Internetseite von Wiley, handelt es sich bei etwa 30 % der im Rahmen der Gentherapie übertragenen Gene um Suizidgene, Wachstumsfaktoren und Tumorsuppressoren. Von daher kann eine Expression dieser Gene außerhalb des Zielgewebes unabsehbare Folgen mit sich führen. Aus diesem Grund versucht man unter anderem durch Verwendung gewebsspezifischer Promotoren die Expression des Transgens auf die Zielzellen zu beschränken, was aber andererseits nicht die Infektion dieser Gewebe beeinträchtigt (Anhang 7.II).

## 2.2 Adenoviren

Der adenovirale Infektionszyklus kann in zwei distinkte Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase umfasst die Bindung an primäre Rezeptoren, die Internalisierung und den Transport des Ad-Genoms in den Zellkern sowie die selektive Transkription und Translation der frühen Gene. Diese frühen Ereignisse dienen der Modulation des Zellstoffwechsels, um die Replikation des adenoviralen Genoms und die Expression der späten Strukturproteine zu gewährleisten. Die späte Phase der Ad-Infektion umfasst die Expression der Strukturproteine, Assemblierung der Kapside, Verpackung der Genome und die abschließende Freisetzung durch die Lyse der Wirtszelle.

### 2.2.1 Entdeckung und Klassifizierung

Im Jahr 1953 wurden Adenoviren erstmals aus Tonsillen und adenoidem Gewebe isoliert und in Kultur vermehrt (Rowe *et al.*, 1953). Die ikosaedrische Struktur des Subtyps Ad5 wurde 1959 erstmals elektronenmikroskopisch dargestellt (Brenner und Horne 1959). Dabei konnte die Zusammensetzung der einzelnen Strukturelemente im Kapsid aufgeklärt werden. Hiernach besteht das Kapsid aus 252 Untereinheiten; davon besitzen 240 Untereinheiten 6 Nachbarn (Hexone) und 12 Untereinheiten 5 Nachbarn (Pentone). Im Jahr 1965 wurden dann elektronenmikroskopische Aufnahmen eines einzelnen Ad5-Partikels veröffentlicht, welche die langen antennenartigen Fibern im Kapsid verankert zeigen. Bereits hier wurde eine Rolle der Fibern im Zusammenhang mit der Adsorption an die Wirtszelle vermutet (Valentine und Pereira, 1965).

Adenoviren werden in vier Genera eingeteilt. Die Genera Aviadenovirus, Siadenovirus und Atadenovirus sind reine tierpathogene Vertreter. Die humanpathogenen Adenoviren zählen zum Genus der Mastadenoviren. Die bislang bekannten 51 humanpathogenen Subtypen werden in die Subgenera A bis F eingeteilt. Die Einteilung erfolgt absteigend nach ihrem Potential in Nagetieren Tumore zu erzeugen von A bis F (Abb. 2.2) (Horwitz, 1996; Wadell *et al.*, 1980 und 1987; Mautner, 1989). Die humanpathogenen Ads werden daneben auch in zwei

phänotypische Gruppen unterteilt. Danach rechnet man die Subgruppen B, C und E zu der respiratorischen Gruppe und die Subgruppen A und F zur gastrointestinalen Gruppe (Bailey und Mautner, 1994). Adenoviren verursachen akute respiratorische Infektionen, Lungenentzündungen bei Kindern, Rachenkatarr, Entzündungen der Bindehaut des Auges und epidemische Keratokonjunktivitis sowie Erkrankungen des Gastrointestinalbereiches. Darüber hinaus kommt es bei immunsupprimierten Personen vereinzelt zu Entzündungen der Bauchspeicheldrüse und der Harnwege (Shenk, 1996; Farnig *et al.*, 2002; Volpers und Kochanek, 2004).

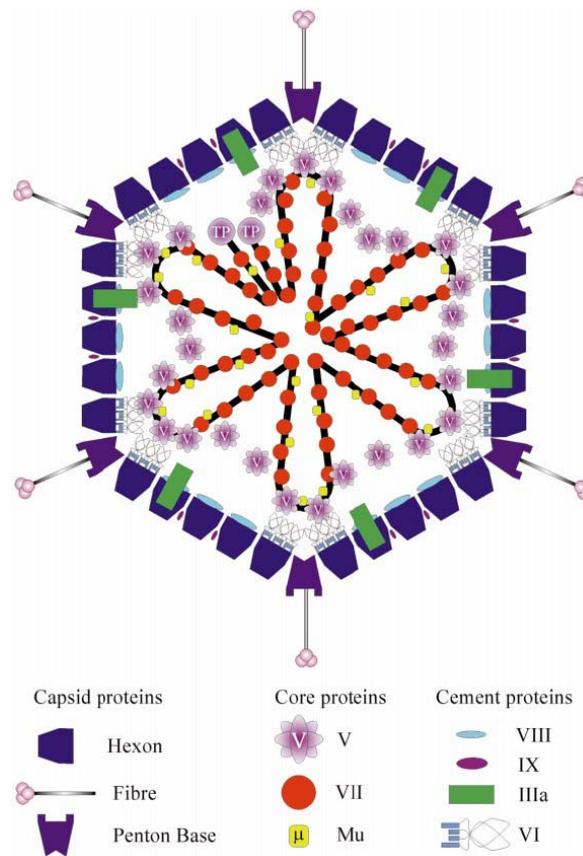
Einteilung humanpathogener Subtypen			
Sub-genus	Subtyp	Gewebe	onkogenes Potential in Nagern
A	12, 18, 31	Gastrointestinalbereich	hoch
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Lunge, Pharynx, Bindehaut	mittel
C	1, 2, 5, 6	Pharynx	niedrig
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47, 49, 51	Bindehaut	niedrig
E	4	Respirationstrakt	niedrig
F	40, 41	Gastrointestinalbereich	unbekannt

**Abb. 2.2:** Tabellarische Einteilung der humanpathogenen adenoviralen Subtypen. (in Anlehnung an Modrow, *Molekulare Virologie*, 2. Auflage, Spektrum-Verlag; modifiziert)

## 2.2.2 Struktur und Genom

Adenoviren sind unumhüllte Viren mit einem Durchmesser von etwa 80 nm und einem Molekulargewicht von etwa 150 MDa. Das Genom von Adenoviren besteht aus einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekül mit einer Länge von 36 bis 38 kb. Adenoviren enthalten 11 verschiedene Strukturproteine, von denen 7 das Kapsid bilden und die übrigen 4 (Protein V, VII,  $\mu$  und terminales Protein) gemeinsam mit der DNA als Core bezeichnet werden. Ihre kubische Kapsidsymmetrie besitzt die Form eines Ikosaeders, das aus 20 gleichseitigen Dreiecksflächen und 12 Ecken aufgebaut ist. Die 20 Dreiecksflächen werden aus je 12 homotrimeren Hexonen gebildet. In den 12 Ecken befinden sich die Pentone. Die Pentone bestehen aus

einer homopentameren Basis, die vom Pentonbasisprotein gebildet wird und einem homotrimeren Fiberanteil, der nicht kovalent in der Pentonbasis verankert ist (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3:** Schematischer Aufbau eines Adenovirus. Die Positionen und die Anordnung der Proteine im Kapsid ist durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bekannt. Die genauen Positionen der Core-Proteine im Innern des Kapsids ist noch nicht endgültig geklärt (Graphik entnommen aus: Russell, 2000)

Neben den drei Hauptstrukturproteinen Hexon (II), Penton (III) und Fiber (IV) befinden sich im Kapsid weitere kleine Proteine, die hauptsächlich der Stabilisierung der Struktur dienen und deshalb auch als Zementproteine bezeichnet werden (VI, VIII, IX, IIIa). Hierbei sind die Proteine VI und VIII an der Innenseite des Kapsids lokalisiert und die Proteine IX, IIIa an der Außenseite (Stewart *et al.*, 1991; Russell, 2000; Vellinga *et al.*, 2005). Zu den drei Coreproteinen zählt das an die ITRs der 5'-Enden kovalent gebundene terminale Protein (TP) sowie das sehr basische Protein VII und das kleine Peptid *mu*, die beide mit der DNA assoziiert sind (Rekosh *et al.*, 1977; Anderson *et al.*, 1989). Dieser DNA-Protein-Komplex wird noch vom Protein V ergänzt, welches eine räumliche Verbindung zum Protein VI in der Innenwand des Kapsids herstellt (Matthews und Russell, 1995). Darüber hinaus befindet sich in den

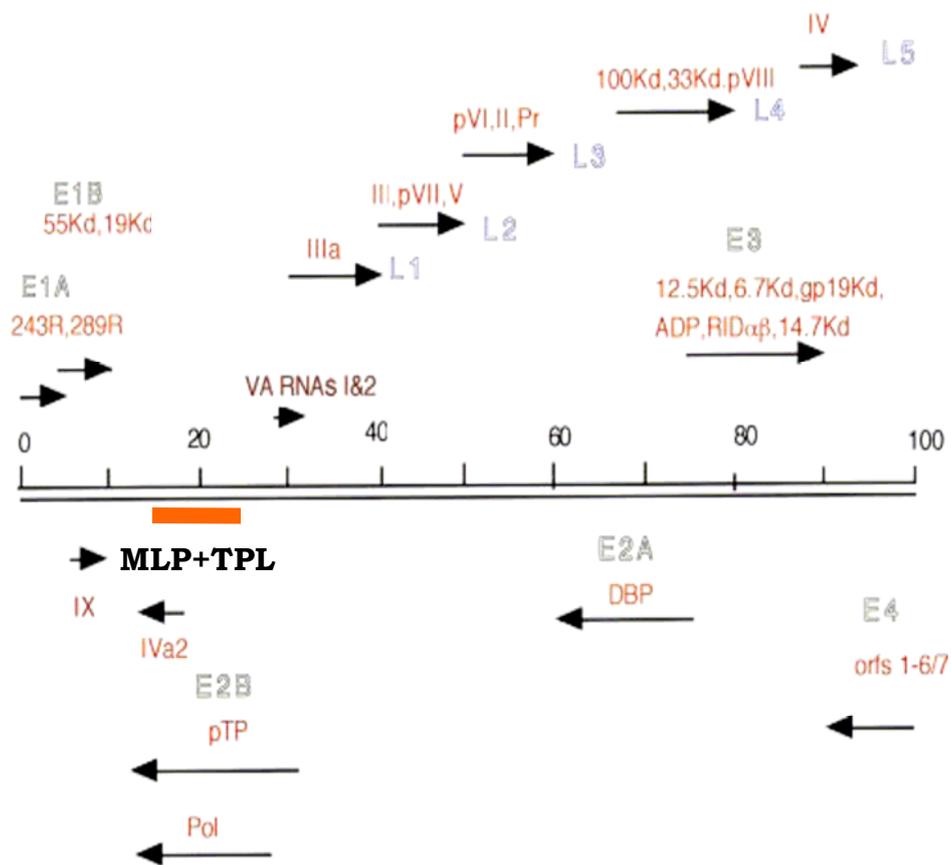
Kapsiden eine virale Protease, die zur Prozessierung viraler Strukturproteine notwendig ist (Weber, 1976; Webster *et al.*, 1989a und 1989b).

Kapsid		
Hexon (II)	720 Kopien	240 trimere Einheiten (=Hexon Kapsomere), Hauptkomponente des Kapsids
Pentonbasis (III)	60 Kopien	12 pentamere Einheiten, Basiskomponente der 12 Penton-Kapsomere
Fiber (IV)	36 Kopien	12 trimere Einheiten, nicht-kovalent mit der Pentonbasis verbunden, die Struktur aus Pentonbasis und Fiber bildet das Penton
IIIa	60 Kopien	Hexon-assoziiertes Protein, teilweise an der Oberfläche lokalisiert
VI	360 Kopien	Hexon-assoziiertes Protein, 60 hexamere Einheiten, an der Innenseite des Kapsids lokalisiert
VIII	130 Kopien	Hexon-assoziiertes Protein, an der Innenseite des Kapsids lokalisiert
IX	240 Kopien	Hexon-assoziiertes Protein, teilweise an der Oberfläche lokalisiert
Core		
V	160 Kopien	DNA-assoziiertes Protein
VII	630 Kopien	Argininreiches, mit der DNA assoziiertes Protein
Mu (X)	100 Kopien	Kleines basisches, mit der DNA assoziiertes Protein
TP	2 Kopien	Terminales Protein, kovalent an 5'-Enden der DNA gebunden, Precursor (pTP) dient als Primer in der Replikation

**Abb. 2.4:** Übersichtstabelle der adenoviralen Strukturproteine. Die Nomenklatur in Form römischer Ziffern leitet sich ab aus der Laufhöhe der einzelnen Proteine in der SDS-PAGE, wobei I dem größten und X dem kleinsten Strukturprotein entspricht. (Modifiziert; nach Volpers & Kochanek)

Das Genom kodiert auf beiden Strängen über 50 Polypeptide, oft in Form überlappender transkriptioneller Einheiten. Man unterscheidet 5 funktionelle Gruppen von Genen. Die früh transkribierten Gene in den Regionen E1 bis E4 und die spät exprimierten L-Proteine, die als Strukturproteine für die Assemblierung verantwortlich sind. Die Transkription der meisten späten Proteine beginnt am Major Late Promotor (MLP). Hierbei entsteht zunächst ein über 30 kB langer Vorläufer, aus dem durch Spleißen die mRNAs der verschiedenen Strukturproteine generiert werden. Dem MLP folgt unmittelbar ein Bereich, der aus drei nicht kodierenden Exons besteht. Alle vom MLP transkribierten mRNAs beginnen mit dieser aus drei Exons durch Spleißen zusammengefügte Leadersequenz. Einige späte mRNAs enthalten in der Leadersequenz noch ein viertes, als Intron bezeichnetes Element. Diese Elemente dienen einer Steigerung der Translationseffizienz um den enormen Bedarf an

Strukturproteinen in der späten Phase des Infektionsverlaufes zu gewährleisten (Shenk, 1996). In Abb. 2.5 ist ein Überblick über die Genomorganisation dargestellt. Neben den Leserahmen für die viralen Proteine werden zwei nicht für Proteine kodierende RNA-Moleküle transkribiert. Diese als virusassoziierte RNA-Spezies VA-I und VA-II bezeichneten Moleküle sind etwa 160 Nukleotide lang, GC-reich, besitzen eine ausgesprochene Sekundärstruktur und sind im Genom im Bereich der späten Gene lokalisiert. Die VA-RNAs hemmen die Aktivität der zellulären Proteinkinase PKR, wodurch die Inaktivierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2a unterbleibt, dadurch die Elongation nicht abbricht und die Translation der viralen Gene gewährleistet wird (Mathews, 1975, 1990 und 1995; Samuel, 1991; Svensson und Akusjarvi, 1984).



**Abb. 2.5:** Transkription des adenoviralen Genoms. Die frühen (E1-E4) und die späten Transkriptionseinheiten (L1-L5) sind in blau angegeben. Die Pfeile geben die Richtung der Transkription an. Die Translationsprodukte sind in rot angegeben. MLP+TPL = Major Late Promotor + Three-Peptide-Leader Sequenz. Der Transkriptionsstart aller späten Gene erfolgt von diesem Promotor; diesem ist eine die Expression verstärkende TPL nachgeschaltet. Als orangefarbener Balken ist der Bereich angedeutet, innerhalb dessen sich die Elemente der TPL befinden. VA RNAs 1&2 = regulative RNAs, die nicht in Protein translatiert werden. (Graphik aus: Russell, 2000; modifiziert)

Die Gene der E1-Region werden im Infektionsverlauf als erstes exprimiert. Für die Transkription sind nur zelluläre Faktoren notwendig. Die E1-Region setzt sich aus den beiden Transkriptionseinheiten E1A und E1B zusammen. Die E1A-Proteine (12S und 13S) haben im viralen Infektionszyklus vornehmlich transaktivierende Eigenschaften und induzieren die Transkription der frühen Gene E2 – E4. Darüber hinaus transaktivieren und transreprimieren die E1A-Proteine zelluläre Gene. Bei Verwendung hoher viraler Titer sind E1A-Proteine in der Lage, Nagetierzellen zu transformieren (Perricaudet *et al.*, 1980; van der Elsen *et al.*, 1982; Braithwaite *et al.*, 1983; Bernards *et al.*, 1983). Auf die E1B-Transkriptionseinheit gehen die beiden Proteine E1B-20kD und E1B-55kD zurück. E1B-55K spielt zusammen mit E1A eine Rolle bei der Transformation von Nagerzellen. Nur bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Proteine können Zellen transformiert werden. Die E2-Region erstreckt sich im zentralen Bereich des Genoms über 20 kB und wird in die Bereiche E2A und E2B eingeteilt. Hiervon werden unter Verwendung verschiedener Spleißsignale drei Proteine translatiert. Im Bereich von E2A ist ein DNA-Einzelstrang-Bindeprotein kodiert, das im Zuge der Replikation den Abbau einzelsträngiger viraler DNA inhibiert. Im Bereich von E2B sind die Sequenzen für das terminale Protein (TP) und die virale DNA-Polymerase lokalisiert. Die Genprodukte der E3-Region sind für den adenoviralen Replikationszyklus nicht essentiell. Sie haben primär immunregulatorische Funktionen und spielen eine Rolle bei der Etablierung einer Persistenz (Wold und Gooding, 1989 und 1991; Weitzman, 2005). Unter anderem wird die durch MHC-I vermittelte Antigenpräsentation an der Zelloberfläche unterdrückt, wodurch die Differenzierung zytotoxischer T-Lymphozyten sowie die Apoptose gehemmt wird (Wold und Gooding, 1991). Die Proteine der E4-Gruppe fördern die selektive Expression der viralen Gene auf Kosten der zellulären Gene (Hackett *et al.*, 2000). Eine Auflistung der einzelnen Genprodukte E1 - E4 hinsichtlich ihrer Funktion und Interaktionspartner findet sich im Anhang 7.III.

### **2.2.3 Adenovirale Infektion und immunogenes Potential**

Der erste Schritt in der adenoviralen Infektion ist die Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle über spezifische Rezeptoren. Nach Herstellung der räumlichen Nähe findet die Internalisierung der Partikel statt. Die Internalisierung ist in der Regel mit der

Virusaufnahme in endozytotische Vesikel verbunden. Aus diesen Vesikeln muss ein Austritt und ein Transport des genomischen Materials zum Zellkern erfolgen. Hier muss das genomische Material über Kernporen-Komplexe aufgenommen und exprimiert werden. Diese Expression besteht im Falle von replikationsdefizienten adenoviralen Vektoren in der Expression des Reportergens bzw. Transgens. Bei wildtypischen Viren schließt sich ein produktiver Replikationszyklus mit der Freisetzung infektiöser Partikel an.

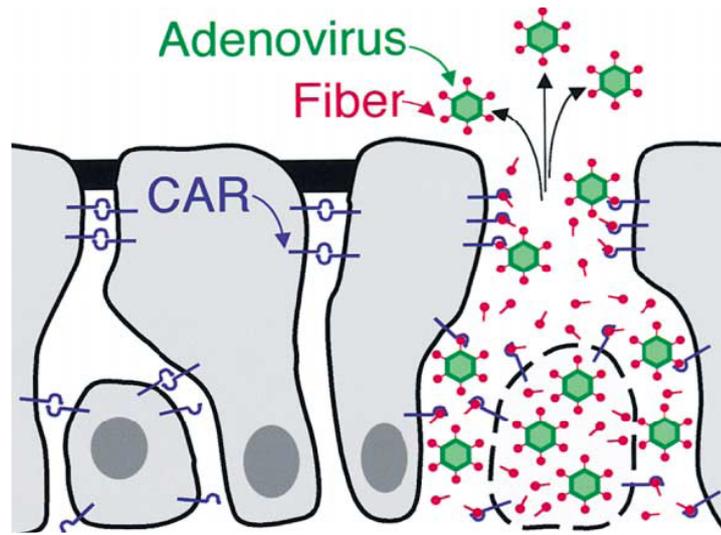
Adenoviren und insbesondere adenovirale Vektoren der 1. Generation besitzen ein hohes immunogenes Potential und induzieren eine Reihe immunologischer Abwehrreaktionen (Kass-Eisler *et al.*, 1996; Christ *et al.*, 1997; Michou *et al.*, 1997; Jooss *et al.*, 1998; Gahery-Segard *et al.*, 1998). So kommt es zu einer primären Immunantwort gegen Ad-Proteine kurz nach der Applikation in Form einer akuten-Phase-Antwort, gekennzeichnet durch die Ausschüttung von Entzündungszytokinen und die Aktivierung von Mastzellen und Basophilen sowie der Erkennung und Zerstörung adenoviraler Peptide auf der Oberfläche infizierter Zellen, vermittelt durch zytotoxisch T-Lymphozyten und Killerzellen (Engelhardt *et al.*, 1994; Souberbielle und Russell, 1995; O'Neal *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Brenner, 1999).

### **2.2.4 Der Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor (CAR)**

1976 wurde gezeigt, dass C-Typ Adenoviren mit dem Coxsackievirus B3 um die gleichen Rezeptoren konkurrieren (Lonberg-Holm *et al.*, 1976). 1997 wurde der entsprechende primäre Rezeptor für C-Typ Adenoviren als ein aus 365 AS aufgebautes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 46 kDa identifiziert (Bergelson *et al.* 1997) und Coxsackievirus Adenovirus Rezeptor (CAR) genannt. Das für CAR kodierende humane Gen befindet sich auf Chromosom 21 (21q11.2) (Bergelson *et al.*, 1997; Mayr und Freimuth, 1997; Tomko *et al.*, 1997). Die trimere Knob-Domäne besitzt drei Bindestellen für CAR und kann daher mit drei CAR-Molekülen gleichzeitig interagieren, was sich in der Stärke der Bindung widerspiegelt (Roelvink *et al.*, 1999; van Raaij *et al.*, 1999; Tomko *et al.*, 2000; Freimuth *et al.*, 1999; Santis *et al.* 1999). Die sehr große Affinität der Fiber bzw. von rekombinantem Knob-Protein zu CAR bewegt sich mit einem  $K_d$ -Wert von  $10^{-9}$  –  $10^{-10}$  im nanomolaren Bereich (Henry *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1994). CAR bildet mit CAR-

Molekülen auf benachbarten Zellen Homodimere aus (Freimuth *et al.*, 1999; van Raaij *et al.*, 2000). CAR besitzt zwei aminoternale extrazelluläre Domänen, welche eine gewisse Ähnlichkeit mit Immunglobulinen aufweisen. Dabei ist Domäne 1 mit IgV und Domäne 2 mit IgC2 verwandt (Williams und Barclay, 1988; Tomko *et al.*, 2000). Für die Interaktion mit Adenoviren ist die mit IgV verwandte Domäne 1 ausreichend. Sowohl zytoplasmatische wie auch transmembrane Domäne haben keinen Einfluss auf die Interaktion. An entsprechende Mutanten, denen diese Domänen fehlen, können Adenoviren weiterhin uneingeschränkt binden (Freimuth *et al.*, 1999; Leon *et al.*, 1998; Nalbantoglu *et al.*, 1999; Wang und Bergelson 1999).

CAR fungiert als integrale transmembrane Komponente von Zell-Zell-Verbindungen (Tight Junctions). Diese bilden eine physikalische Barriere und verhindern so den unkontrollierten Transport durch die Epithelien (Greber *et al.*, 1997; Zabner *et al.*, 1997; Pickles *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 1999 und 2002; Cohen *et al.*, 2001). Wie aus Abb. 2.6 deutlich wird, sind die CAR-vermittelten Zellkontakte in einem gesunden und unverletzten Gewebe nur schwer für Adenoviren zugänglich. Wird aber die Struktur der Tight Junctions unterbrochen, können Adenoviren mittels der Fibern, über dann zugängliches CAR, Epithelzellen effizient infizieren. Im viralen Replikationszyklus kommt es neben der Reifung infektiöser Partikel zu einer massiven Sekretion von Fiberprotein. Noch vor der virusinduzierten Lyse werden diese von der infizierten Zelle abgegeben und diffundieren in die Zellzwischenräume. Aufgrund der großen Affinität zu CAR lösen die sekretierten Fibern die CAR-CAR-Interaktion zwischen benachbarten Zellen auf und die Zell-Zell-Kontakte im Zellverband gehen verloren. Dieser wird so für die im Anschluss freigesetzten infektiösen Partikel zugänglicher gemacht. Daher findet die Ausbreitung einer adenoviralen Infektion in einem Epithel vornehmlich über den basolateralen Raum zwischen den Epithelzellen statt (Zabner *et al.*, 1997; Pickles *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 1999 und 2002; Stonebraker *et al.*, 2004).



**Abb. 2.6:** Modell der adenoviralen Verbreitung in einem Epithelium. CAR ist im basolateralen Bereich der Zellmembran unterhalb der apikalen Abdichtstruktur der Tight Junctions lokalisiert. Durch die Sekretion von Fibern und deren Interaktion mit CAR werden die CAR-CAR-Bindungen zerstört und kommt es zu einer Steigerung der parazellulären Permeabilität, wodurch die Ausbreitung infektiöser Partikel erleichtert wird. (Graphik entnommen aus: Walters *et al.*, 2002)

Dieses Modell wird durch Ergebnisse untermauert, die im Rahmen einer gentherapeutischen Behandlung der zystischen Fibrose mit adenoviralen Vektoren gemacht wurden. Die Hoffnungen, die auf eine solche Therapieform gesetzt wurden waren groß, zumal C-Typ Ads im Rahmen ihrer natürlichen Ausbreitung die Respirationsorgane als Eintrittsstelle benutzen. CAR war aber durch die Lokalisierung innerhalb der Tight Junctions von luminaler Seite im Prinzip nicht zugänglich und daher scheiterten entsprechende Ansätze (Pickles *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 1999; Stonebraker *et al.*, 2004).

Diese Verhältnisse sind allerdings nicht auf die Zellkultur übertragbar. Die strikte durch Tight Junctions bedingte Polarität in Epithelien *in vivo* zeigen Dauerzellen wie HeLa oder HEK nicht. Hier erfolgt die Expression von CAR gleichmäßig auf der gesamten Zelloberfläche.

## 2.2.5 Internalisierung und intrazellulärer Transport

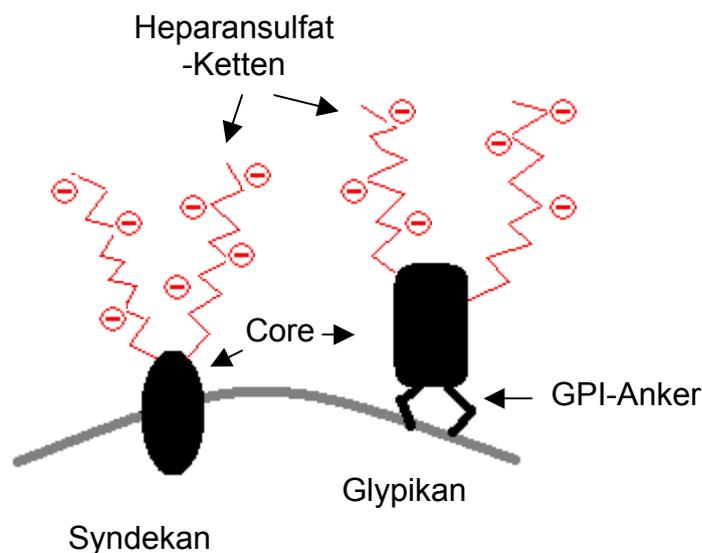
Die Interaktion der Fiber mit CAR dient zur primären Zellerkennung, führt jedoch nicht unmittelbar zur Virusaufnahme. Um eine effiziente Virusaufnahme zu gewährleisten, ist eine weitere Rezeptorinteraktion mit Integrinen notwendig. Diese Interaktion findet zwischen einem exponierten RGD-Motiv in der Pentonbasis und vornehmlich  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen statt. Aufgrund der pentameren Struktur des Pentonproteins stehen daher 5 potentielle Integrin-Bindungsstellen zur Verfügung. Hierdurch kommt es zu einer lokalen Anreicherung von Integrinen in der Membran, wodurch die Internalisierung induziert wird (Neumann *et al.*, 1988; Wickham *et al.*, 1993 und 1994). Diese erfolgt endozytotisch über den „Clathrin-coated-pit“-Aufnahmemechanismus. Die lokale Anreicherung von Integrinen induziert die Aktivierung von PI3-Kinase, p130<sup>CAS</sup> und Rho-GTPasen (Chiu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998; Rauma *et al.*, 1999). In deren Folge kommt es zu Umstrukturierungen im Aktin-Zytoskelett und zur Initiation der Internalisierung über die Klathrin-abhängige Endozytose (Wang *et al.*, 1998). Die Viruspartikel werden innerhalb von 5 min bei 37 °C gemeinsam mit den assoziierten Integrinen in Klathrin-ausgekleidete Vesikel aufgenommen (Varga *et al.*, 1991; Greber *et al.*, 1993; Wickham *et al.*, 1993). Die C-Typ Viren Ad2 und Ad5 verlieren etwa 3 min nach Adsorption ihre Fibern und werden als fiberlose Partikel in endozytotische Vesikel aufgenommen (Greber *et al.*, 1993; Nakano *et al.*, 2000a; Martin-Fernandez *et al.*, 2004). B-Typ Viren werfen ihre Fibern nicht an der Zelloberfläche ab und werden mit den Fibern in endosomale Vesikel aufgenommen. Wie für die B-Typ Viren Ad3 und Ad7 gezeigt werden konnte, verbleiben die viralen Partikel wesentlich länger in den Vesikeln und werden daher häufiger als C-Typ Viren lysosomal degradiert. (Chardonnet and Dales, 1970; Miyazawa *et al.*, 1999, 2001; Russell, 2000). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine temperatursensitive Ad2-Mutante ihre Fibern nicht wie wildtypische C-Typ Viren vor der Internalisierung abwirft. Diese Mutante war in der Lage an CAR zu binden und via Integrine zu internalisieren, allerdings wurde sie nicht effizient aus den Endosomen entlassen wie wildtypische C-Typ Viren und war noch in späten Lysosomen nachweisbar. Daher ähnelte der Infektionsverlauf eher dem eines typischen B-Typ Virus (Weber *et al.*, 1976; Miles *et al.*, 1980; Greber *et al.*, 1996, 1998; Li *et al.* 1998; Nakano *et al.*, 2000a). Bei typischen C-Typ Viren kommt es innerhalb von 15 min nach Aufnahme zur Dissoziation des

Klathrinmantels. Durch die Tätigkeit von Protonenpumpen in der Endosomenmembran fällt der pH-Wert im Endosom. Es folgt eine Konformationsänderung und ein partieller Abbau des Kapsids. Hierbei kommt es zur Dissoziation der Pentonbasis und durch die Aktivität der adenoviralen Protease zum Entweichen aus den Endosomen noch bevor der lysosomale Abbau einsetzt (Helenius *et al.*, 1980; Svensson, 1985; Blumenthal *et al.*, 1986; Greber *et al.* 1993; Seth, 1994). Nach Entweichen aus dem Endosom folgt der Transit der freien Viruspartikel zum Zellkern. Hierbei sind die Ad-Kapside mit den Mikrotubuli assoziiert und nutzen die Mikrotubuli-Motoren für den Transfer zu den Kernporenkomplexen. Während dieses Transports dissoziiert das mit den Hexonen assoziierte Zementprotein IX. Etwa 30 – 60 min nach Internalisierung befinden sich die C-Typ Ads an der Kernmembran. Hier erfolgt die Dissoziation der Hexone und das DNA-Genom wird mit den Core-Proteinen über Kernporen aufgenommen (Greber *et al.*, 1993 und 1997; Saphire *et al.*, 2000; Meier und Greber 2003).

### **2.2.6 Heparansulfatproteoglykane (HSPG) als Ad-Rezeptoren**

HSPG sind weitverbreitete Glykoproteine in tierischen Geweben. Sie sind an der Zellproliferation und der Differenzierung, der Embryonalentwicklung, an Entzündungsprozessen, der Zellwanderung und Chemotaxis beteiligt (Bernfield *et al.*, 1999; Iozzo, 2001; Delehedde *et al.*, 2002; Esko und Lindhal, 2001; Liu *et al.*, 2002). 1997 konnte erstmals gezeigt werden, dass HSPG bei der Bindung und Internalisierung von Mikroorganismen in die Wirtszelle eine Rolle spielen (Rostand und Esko, 1997). Sie bestehen aus einem Core-Protein, an das ein oder mehrere Polysaccharide (Glykosaminglykane) gekoppelt sind. Die biologische Aktivität der HSPG wird durch die GAG-Seitenketten vermittelt (Esko *et al.*, 2001; Gallagher *et al.*, 2001; Lyon *et al.*, 1998). HSPG sind membranständige Proteine. Sie werden eingeteilt in die Gruppe der transmembranen Syndekane und eine über einen GPI-Anker in der Membran gekoppelte Gruppe, den Glypikanen (Abb. 2.7). Die gekoppelten Sulfatgruppen verleihen den HSPG einen sauren Charakter. Hierdurch können sie mit basischen Gruppen anderer Proteine interagieren (Vives *et al.*, 2004). HSPG dienen einer Reihe von Viren als spezifische primäre Rezeptoren. Hierzu zählen das Denguevirus, das Maul- und Klauenseuchevirus, das Humane

Immundefizienzvirus (HIV-1), das Herpes Simplex Virus (HSV), Adenoassoziierte Viren vom Typ 2 (AAV-2) und Adenoviren (Chen *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1993; Shukla und Spear, 2001; Summerford *et al.*, 1998; Dehecchi *et al.*, 2000 und 2001). Dehecchi *et al.* konnten zeigen, dass die Präinkubation von C-Typ Ads mit Heparin die Infektion inhibiert. Hierbei war die Inhibition bei CAR-negativen Zellen nahezu vollständig, bei CAR-positiven anteilig und in Gegenwart von Anti-CAR Antikörpern ebenfalls nahezu vollständig. Diese Ergebnisse konnten durch die Präinkubation der Zellen mit HSPG-spezifischen Proteasen bestätigt werden. Im Gegensatz zur Interaktion Knob-CAR, die auf der Ebene der Kristallstruktur darstellbar ist (Bewley *et al.*, 1999), gibt es über die molekularen Wechselwirkungen mit den HSPG keine kristallographischen Daten. Dehecchi *et al.* spekulierten, dass ein basisches KKTK-Motiv im Fiberschaft eine putative HSPG-Bindestelle darstellen könnte.



**Abb. 2.7:** Schematische Darstellung der HSPG auf der Zelloberfläche. HSPG werden eingeteilt in die transmembranen Syndekane und über einen GPI-Anker mit der Membran assoziierte Glypikane. Proteoglykane sind mit Heparansulfaten modifiziert. Diese bestehen aus linearen Polysacchariden, die aus Disacchariden aufgebaut und in unterschiedlichem Maß mit sauren Sulfatresten substituiert sind.

Im Gegensatz zum CAR-vermittelten Infektionsweg ist über den HSPG-vermittelten Aufnahmemechanismus und die damit verbundenen Ereignisse nichts bekannt. Es ist unklar, ob die Interaktion *per se* die Internalisierung induzieren kann oder ein Co-Rezeptor anwesend sein muss wie bei der CAR-Interaktion. Für eine effiziente

Transduktion ist hier eine weitere Rezeptorinteraktion mit Integrinen notwendig, um die Aufnahme in Klathrin-ausgekleidete Vesikel zu gewährleisten (Vives *et al.*, 2006).

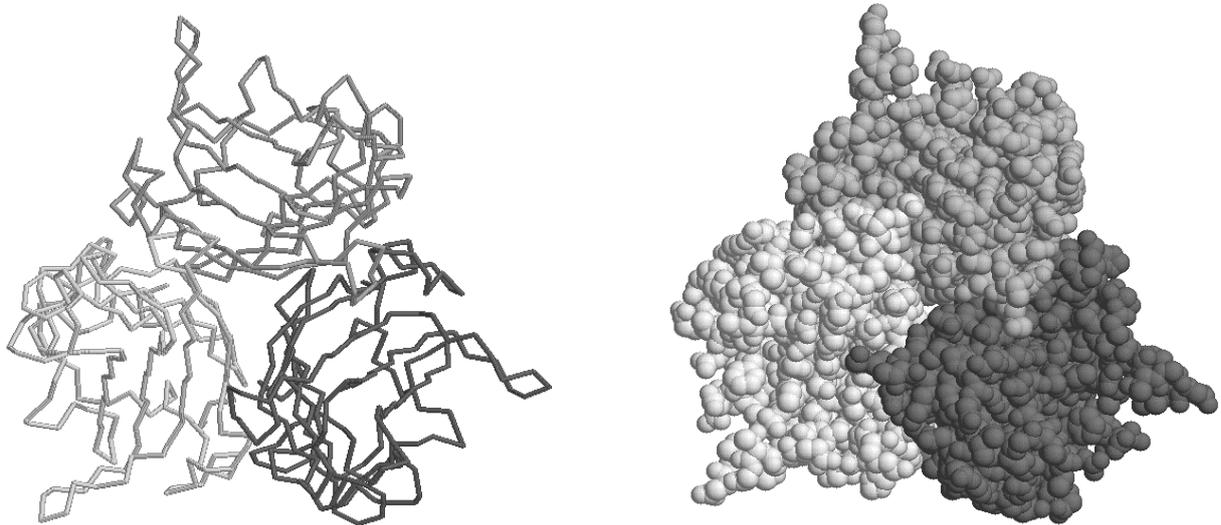
## 2.3 Die Modifikation des Tropismus von C-Typ Ads

Der Einsatz adenoviraler Vektoren wird insbesondere im Rahmen von *in vivo* Applikationen durch die ubiquitäre Präsenz der primären Rezeptoren limitiert. Die Folge ist eine unspezifische Vektoraufnahme in allen CAR- bzw. HSPG-exprimierenden Geweben, insbesondere in der Leber. Daher wird durch gezieltes transduktionelles Targeting versucht, die Spezifität für das Zielgewebe zu erhöhen, um mit minimaler Vektordosis einen optimalen therapeutischen Effekt zu erzielen. Ein idealer adenoviraler Vektor sollte durch die gezielte Modifikation des Kapsids in der Lage sein, exklusiv in den Zielzellen ein Transgen zu exprimieren. Dies verlangt bei Adenoviren zum einen die Inhibition der Interaktion mit den natürlichen Rezeptoren (Detargeting) und zum anderen durch Insertion von Zelltyp-spezifischen Peptiden eine effiziente Infizierbarkeit von Zielzellen (Retargeting).

### 2.3.1 Detargeting: Die Modifikation von Kontaktaminosäuren für die CAR-Interaktion in der Knob-Domäne.

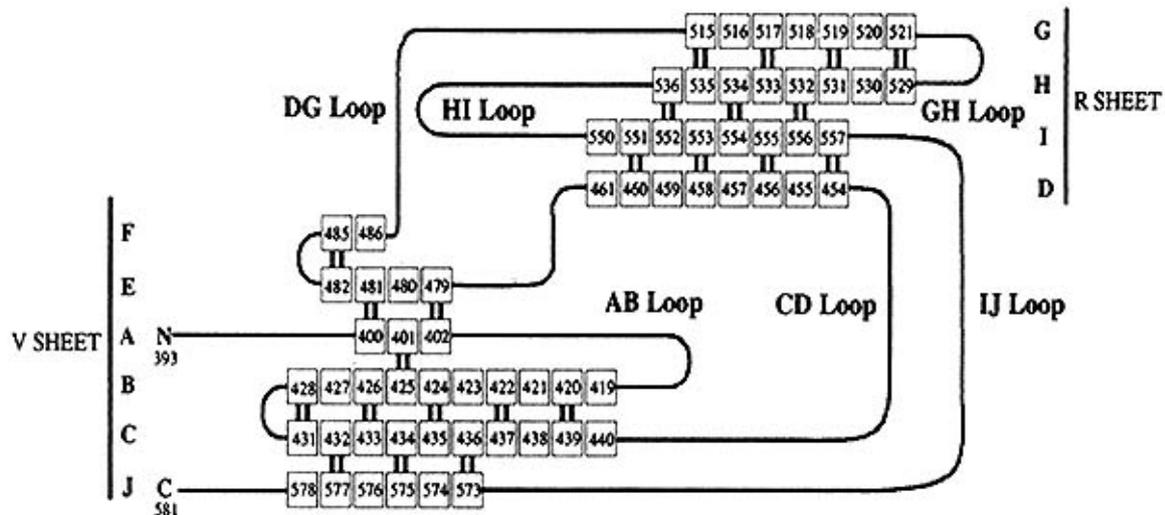
Das adenovirale Fiberprotein besteht aus drei Domänen; der carboxyterminalen globulären Knob-Domäne, einer sich daran anschließenden Schaftdomäne und einem aminoterminalen Endstück aus 46 Aminosäuren, über den die Fiber nicht kovalent in der Pentonbasis verankert ist. Der Schaft besteht aus einer vom Serotypen abhängigen Anzahl sich wiederholender Muster aus 15 AS in Form von  $\beta$ -Repeats. Der Schaft von Ad5 besteht aus 22 Wiederholungen. Im trimeren Molekül bilden die Schaftdomänen eine tripelhelikale Struktur (Stevenson *et al.*, 1995; Philipson *et al.*, 1968; van Raaij *et al.*, 1999). Die native Fiber ist ein homotrimeres Protein, das in der Lage ist, spontan ohne die Hilfe von Chaperonen zu trimerisieren (Novelli und Boulanger, 1991). Aminosäuren innerhalb der Knob-Domäne stabilisieren die trimere Struktur (Hong und Engler, 1996; Santis *et al.*, 1999) und innerhalb der letzten (22.) Wiederholung des Fiberschaftes konnte ein als FSTE

(Fiber Shaft Trimerization Element) bezeichnetes Element identifiziert werden, das die Trimerisierung von Schwanz- und Schaftdomäne in Abwesenheit der Knobstruktur induziert (Li *et al.*, 2006). Die trimere Fiber hat von oben betrachtet die Form eines 3-flügeligen Propellers mit einer zentralen oberflächlichen Depression (Abb. 2.8).



**Abb. 2.8:** Modell der trimeren Knob-Domäne. Die Abbildung zeigt auf der linken Seite ein Modell des Rückgrats des trimeren Knob-Proteins und auf der rechten Seite ein raumfüllendes Modell ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Die drei Untereinheiten des Homotrimers sind unterschiedlich schattiert. Blickrichtung: von oben entlang der dreifachen Symmetrieachse. (modifiziert nach PDB und MSD: 1KNB)

Die einzelnen Monomere bestehen aus einer antiparallelen  $\beta$ -Sandwich-Struktur mit 8 Strängen, von denen die  $\beta$ -Stränge C, B, A, und J das V-Blatt bilden, das in Richtung Virion zeigt und die  $\beta$ -Stränge G, H, I und D das R-Blatt bilden und in Richtung Rezeptor weisen (Henry *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1994) (Abb. 2.9).



**Abb. 2.9:** Schematische Darstellung der Knob-Domäne. Die Kästchen mit den Ziffern geben diejenigen Aminosäuren an, die an der Ausbildung der  $\beta$ -Stränge beteiligt sind. Die Ziffern entsprechen den Aminosäurepositionen entsprechend der Nomenklatur nach Xia. Die Aminosäuren in den Loops sind nicht angegeben (aus: Xia et al., 1994).

Auf der Basis eines Sequenzvergleichs zwischen 14 verschiedenen Ad-Serotypen konnten einige hoch konservierte Aminosäuren in einem an der Seite des trimeren Knobs gelegenen Bereiches lokalisiert werden, der insbesondere den AB-Loop und das  $\beta$ -Faltblatt F umfasst. Die Modifikation der hier befindlichen Aminosäuren S408, P409 und Y477 führte zu einem signifikanten Verlust der Affinität zu CAR (Roelvink et al., 1999). Zu den gleichen Ergebnissen kamen Kirby et al., die über die drei besonders wichtigen Aminosäuren hinaus noch die Modifikation L485 als kritische Kontaktstelle für die CAR-Interaktion identifizierten (Kirby et al., 2000). Als weitere Kontaktamino-säuren wurden von Jacubczak et al. die Aminosäuren V441 und K442 im CD-Loop identifiziert (Jacubczak et al., 2001). Die Modifikation dieser verschiedenen Aminosäuren führte *in vitro* in allen Fällen zu einem erheblichen Rückgang der Infektiosität. Wie sich aber herausstellte, unterschieden sich solche Viren *in vivo* nicht von solchen mit wildtypischen Fibren. (Leissner et al., 2001; Alemany und Curiel, 2001; Mizuguchi et al., 2002; Smith et al., 2003a).

### **2.3.2 Detargeting: Die Modifikation einer putativen HSPG-Bindestelle im Fiberschaft**

Der Schaft von Ad2 und Ad5 besteht aus 22 Wiederholungen eines 15 AS langen Motives. Zwischen der dritten und vierten Wiederholung befindet sich ein KKTK-Motiv, das zwischen den anderen Wiederholungen des Schafts nicht vorkommt. Dececchi et al. wiesen darauf hin, dass dieses Motiv im Fiberschaft als möglicher Interaktionspartner mit den HSPG in Frage kommen könnte. Verschiedene Autoren untersuchten den Einfluss dieses Motives auf die Transduktion vornehmlich *in vivo*. Es konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass die Eliminierung des KKTK-Motives die Reporterexpression nahezu vollständig inhibiert. Hieraus wurde geschlossen, dass dieses Motiv alleine für die Interaktion mit HSPG verantwortlich sei (Smith et al., 2003a und 2003b; Koizumi et al., 2003 und 2006; Nicol et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte aber von Sonja Matt im Rahmen ihrer Diplomarbeit 2006 im Labor Petersen gezeigt werden, dass die Infektion von Ad5 mit einem von KKTK nach GAGA modifizierten Fiberschaft zwar die Infektiosität reduziert, aber diese immer noch durch lösliches Heparin weiter inhibiert werden kann. Hieraus folgerte die Autorin, dass noch weitere Bereiche im Kapsid mit HSPG interagieren können und der enorme Rückgang an Reporterexpression nach der Deletion des KKTK-Motives andere Ursachen haben muss. Zum gleichen Ergebnis kamen kürzlich Kritz *et al.* 2007.

### **2.3.3 Retargeting: Einbau von Fibern bzw. Knobs anderer Subtypen**

Der im Rahmen des Vektordesigns verwendete Ausdruck des „Pseudotypings“ beinhaltet ursprünglich den Austausch von Fibern oder Teilen davon durch die entsprechenden Komponenten anderer Subtypen. Heute wird dieser Begriff viel allgemeiner auf alle Formen von Kapsidmodifikationen angewendet, deren Zweck die Einführung einer neuen Spezifität ist. Der Vorteil dieses Ansatzes besteht im Bezug auf Ad5 darin, dass, bedingt durch den hohen Durchseuchungsgrad, ein großer Teil der Bevölkerung Antikörper gegen Ad5 besitzt und insbesondere die Fibern ein Hauptepitop der antikörpervermittelten Immunantwort darstellen. Außerdem vermitteln insbesondere die Fibern von B-Typ Viren eine effizientere Infektion von

CD46-positiven Zelltypen, die relativ wenig CAR bzw. HSPG exprimieren. In diesem Sinne wurde erstmals von Gall *et al.* der erfolgreiche Einbau der Fiber von Ad7 in das Kapsid von Ad5 beschrieben (Gall *et al.*, 1996). Der Einbau der Fiber von Ad35 führte zur effizienten Transduktion CD34-positiver Zellen (Shayakhmetov *et al.*, 2000). Die Fibern von Ad16 steigerten die Infektiosität gegenüber synovialen Gewebe, vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Goossens *et al.*, 2001; Havenga *et al.*, 2001). In einem anderen Ansatz wurde lediglich die Knob-Domäne eines Ad5-Vektors gegen die Knob-Domäne von Ad3 ausgetauscht. Entsprechende Viren verhielten sich *in vivo* wie typische Ad3-Viren (Krasnykh *et al.*, 1996). Darüber hinaus zeigten diese Vektoren eine gesteigerte Infektiosität gegenüber Eierstockkrebs-Zellen und squamösen Zell Karzinomen (Kanerva *et al.*, 2002; Kawakami *et al.*, 2003).

Die Strategie des Austausches der Fibern bzw. der Knob-Domäne gegen solche von anderen Subtypen ist ohne zusätzliche Modifikationen durch das limitierte Repertoire an verfügbaren alternativen Subtypen relativ eingeschränkt. Durch den Einbau von spezifischen Epitopen kann der Tropismus weiter gesteigert werden.

### **2.3.4 Retargeting: Ersatz von Fibern durch Chimäre**

Zunächst wurde angenommen, dass die Fiber eine wichtige Rolle bei der Virusreifung spielt und das Fehlen der Fibern zu defekten Partikeln führt (Falgout *et al.*, 1988). Diese Annahme stellte sich aber als falsch heraus; wie gezeigt werden konnte ist die Fiber für einen produktiven Replikationszyklus entbehrlich (von Seggern *et al.*, 1999). Entsprechend wurde die Knob-Domäne mit und ohne Teile des Schafts gegen trimerisierende Motive anderer Herkunft ersetzt und mit Zelltyp-spezifischen Epitopen gekoppelt. Zu den erfolgreich eingesetzten trimerisierenden Motiven zählt das glykosylierte Hüllprotein des Moloney Maus Leukämievirus, das trimerisierende Oberflächenprotein D der menschlichen Lunge, das Fibrin der T4-Phagen und das Sigma1 Protein der humanen Reoviren. Alle diese Chimären waren entsprechend der Eigenschaften der gekoppelten Liganden in der Lage, die Zielzellen effizienter zu infizieren als Vektoren mit wildtypischen Fibern (van Beusechem *et al.*, 2000; Krasnykh *et al.*, 2001; Belousova *et al.*, 2003; Mercier *et al.*, 2004).

### 2.3.5 Retargeting: Insertionen von Peptiden in Ad5-Kapsidstrukturen

Das Einfügen einer neuen Spezifität mittels Peptiden ist prinzipiell bei allen exponierten Kapsidstrukturen von Ad5 möglich. Innerhalb der Knob-Domäne konnte dies bislang u.a. am C-Terminus und insbesondere im exponierten HI-Loop erfolgreich gezeigt werden (1.3.5.1). Daneben wurden Peptide erfolgreich in das Hexon, die Pentonbasis und das hexonassoziierte Zementprotein pIX eingefügt (1.3.5.2).

#### 2.3.5.1 Insertion von Peptiden in die Knob-Domäne

An den C-Terminus der Knob-Domäne von Ad5 wurde erfolgreich ein RGD-Motiv und ein Polylysin-Peptid angefügt, ohne dass die Trimerisierung dabei gestört wurde. Entsprechende Viren waren gegenüber Integrin- bzw. HSPG-exprimierenden Zellen infektiöser (Wickham *et al.*, 1996 und 1997; Wu *et al.*, 2002). Allerdings hat sich gezeigt, dass beim Versuch weitere Peptide an den C-Terminus anzufügen, die Trimerisierung beeinträchtigt war und daher dieser Ort für ein Retargeting kritisch ist (Wickham *et al.*, 1997). Eine Alternative bot der seitlich exponierte HI-Loop (Xia *et al.*, 1994). Krasnykh *et al.* inkorporierten erfolgreich ein FLAG-Peptid in den HI-Loop (Krasnykh *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Peptide aus bis zu 100 Aminosäuren in den HI-Loop eingefügt werden können, ohne dass die Integrität der trimeren Fiber gestört wird (Belousova *et al.*, 2002). Die Einführung eines RGD-Motives erhöhte signifikant die Transduktionseffizienz gegenüber Eierstockkrebs-Zellen sowie weiteren Tumoren und Karzinomen (Dmitriev *et al.*, 1998; Hemminki *et al.*, 2001; Bauerschmitz *et al.*, 2002). Eine ganze Reihe weiterer mittels Phage Display identifizierter Zelltyp-spezifischer Peptide wurde in den HI-Loop inkorporiert. Hierunter sind Peptide mit einer Spezifität für Endothelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen, verschiedene Krebserkrankungen und den Transferrin-Rezeptor (Nicklin *et al.*, 2001 und 2003; Work *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2000). Neben der Inkorporation an jeweils einer Position in der Knob-Domäne, wurden C-Terminus und HI-Loop gleichzeitig modifiziert. Die gleichzeitige Inkorporation eines RGD- bzw. eines Polylysin-Motives in den HI-Loop und den C-Terminus störte die Trimerisierung

nicht. Solche Vektoren zeigten eine höhere Transduktionseffizienz als Vektoren die entweder nur im HI-Loop oder nur am C-Terminus modifiziert waren (Koizumi *et al.*, 2003a). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich neben dem HI-Loop noch der EG- und IJ-Loop für die Insertion von Peptiden eignen. Die Modifikation anderer Loops in der Knob-Domäne störte dagegen die Trimerisierung und sind für die Insertion von Peptiden nicht geeignet (Hesse *et al.*, 2007).

### **2.3.5.2 Insertion von Peptiden in andere Strukturproteine**

Die Insertion eines RGD-Motives in die exponierte hypervariable Region 5 (HVR5) des Hexons störte nicht die Assemblierung und führte zu einer gesteigerten Transduktionseffizienz (Vigne *et al.*, 1999). Die Insertion eines HA-Epitopes in die Pentonbasis störte ebenfalls die Assemblierung nicht und führte zur effektiven Transduktion von Zellen, die mit HA-Pseudorezeptoren transfiziert waren (Einfeld *et al.*, 1999). An den exponierten C-Terminus des Zementproteins IX wurde ebenfalls erfolgreich ein FLAG-, Polylysin- oder RGD-Motiv angefügt und hierdurch die Transduktionseffizienz auf CAR-negativen Zellen gesteigert (Dmitriev *et al.*, 2002; Vellinga *et al.*, 2004).

Bei einem direkten Vergleich der Transduktionseffizienz zwischen Ads, die an verschiedenen Positionen ein RGD-Peptid bzw. ein FLAG-Tag inkorporiert hatten, konnte gezeigt werden, dass die Insertion in den HI-Loop am effizientesten war, gefolgt vom C-Terminus. Die Insertionen in Hexon und pIX zeigten den geringsten Einfluss auf die Transduktionseffizienz (Kurachi *et al.*, 2007).

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll der kombinierte Einfluss beider primärer Rezeptoren (CAR und HSPG) auf die Infizierbarkeit mit Ad5 an verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Im Kontext der Modifikation des viralen Tropismus sollen im Rahmen des Detargetings die verschiedenen in der Literatur beschriebenen Kontaktaminosäuren mit einem signifikanten Einfluss auf die Interaktion mit CAR kombiniert modifiziert und der Einfluss auf die Transduktionseffizienz bestimmt werden. Im Rahmen des Retargetings sollen dann auf der Basis der effizientesten Kombination zusätzlich kurze Peptide in den HI-Loop eingesetzt und deren Potential, eine neue Spezifität zu vermitteln, in einem geeigneten System analysiert werden. Hierzu sollen die Ergebnisse bereits publizierter Peptide verifiziert und potentiell für koronale glatte Muskelzellen spezifische Peptide identifiziert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Feinchemikalien und Lösungen

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Ammoniumpersulfat	Serva (Heidelberg)
Rinderserumalbumin	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
Chloroquin Diphosphat	Fluka Biochemika (Buchs, Schweiz)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Dimethylformamid	Serva (Heidelberg)
Essigsäure (rein)	J. T. Baker (Phillipsburg, USA)
Essigsäure (technisch)	Riedel-de-Haën (Seelze)
Ethanol (rein)	Riedel-de-Haën (Seelze)
Ethanol (technisch)	Theoretikum der Uni Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Glycerin	Theoretikum der Uni Heidelberg
$\alpha$ -D-Glucose	Serva (Heidelberg)
Glycin	Serva (Heidelberg)
Glutaraldehyd	Sigma (St. Louis, USA)
Hefeextrakt	BD (Franklin Lakes, USA)
Heparin (Natriumsalz)	Serva (Heidelberg)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Theoretikum der Uni Heidelberg
Kalium-Ferricyanid	Sigma (St. Louis, USA)
Kalium-Ferrocyanid	Sigma (St. Louis, USA)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)

Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck (Darmstadt)
Cumarinsäure	Sigma (St. Louis, USA)
3-Aminophthalhydrazid (Luminol)	Fluka Biochemika (Buchs, Schweiz)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Riedel-de-Haën (Seelze)
Kochsalz	Riedel-de-Haën (Seelze)
Luminol	Sigma (St. Louis, USA)
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem (Darmstadt)
Natrium-EDTA	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	J. T. Baker (Phillipsburg, USA)
Natriumdodecylsulfat	AppliChem (Darmstadt)
Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
TWEEN-20	Serva (Heidelberg)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tetracyclin	Serva (Heidelberg)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)
X-Gal	AppliChem (Darmstadt)

### 3.1.2 Materialien für die Zellkultur

Fötales Kälberserum	Invitrogen / Gibco (Carlsbad, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
D-MEM	Invitrogen / Gibco (Carlsbad, USA)
Ham's F-12-Medium	Invitrogen / Gibco (Carlsbad, USA)
RPMI1640-Medium	Invitrogen / Gibco (Carlsbad, USA)
Waymouth-Medium	Invitrogen / Gibco (Carlsbad, USA)
EBM-2-Medium	Cambrex (Charles City, USA)
MSCGM Growth Media	Cambrex (Charles City, USA)
Smooth Muscle Cell Basal Medium	PromoCell (Heidelberg)
Trypsin EDTA	Invitrogen / Gibco (Carlsbad, USA)
PBS	Invitrogen / Gibco (Carlsbad, USA)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen / Gibco (Carlsbad, USA)
G418-Sulfat	Invitrogen / Gibco (Carlsbad, USA)

### 3.1.3 Größenstandards

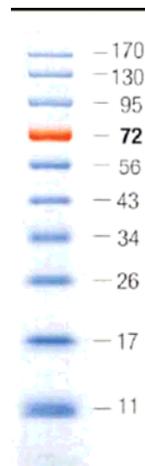
#### Proteinmarker: niedermolekularer Bereich

<u>Bande</u>	<u>MW</u>	<u>Herkunft</u>
1	66 kDa	Albumin, Rind
2	45 kDa	Albumin, Huhn
3	36 kDa	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
4	29 kDa	Carbanhydrase, Rind
5	24 kDa	Trypsinogen, Rinderpankreas
6	20 kDa	Trypsininhibitor, Sojabohne
7	14 kDa	$\alpha$ -Lactalbumin, Kuhmilch

#### Proteinmarker: hochmolekularer Bereich

<u>Bande</u>	<u>MW</u>	<u>Herkunft</u>
1	205 kDa	Myosin, Kaninchen
2	116 kDa	$\beta$ -Galaktosidase, <i>E.coli</i>
3	97 kDa	Phosphorylase b, Kaninchen
4	66 kDa	Albumin, Rind
5	45 kDa	Albumin, Huhn
6	29 kDa	Carbanhydrase, Rind

#### Proteinmarker: Page-Ruler (Fermentas):



#### Längenstandard Nukleinsäuren: $\lambda$ :HindIII

<u>Bande</u>	<u>Bp</u>	<u>Anteiligkeit</u>
1	23130	48 %
2	9416	19 %
3	6557	14 %
4	4361	9 %
5	2322	5 %
6	2027	4 %
7	564	1 %

### Längenstandard Nukleinsäuren: $\lambda$ :BstEII

<u>Bande</u>	<u>Bp</u>	<u>Anteiligkeit</u>
1	8454	17 %
2	7242	15 %
3	6369	13 %
4	5686	12 %
5	4822	10 %
6	4324	9 %
7	3675	8 %
8	2323	5 %
9	1929	4 %
10	1371	3 %
11	1264	3 %
12	702	1 %

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

#### Kultivierung von Bakterien:

##### LB-Medium:

- 10 g Trypton / Pepton aus Casein (Roth)
- 5 g Hefeextrakt (Bacto™ Yeast Extract; BD)
- 5-10 g NaCl
- ad 1 l ddH<sub>2</sub>O
- Sterilisieren durch Autoklavieren.

##### SOC-Medium:

- 10 g Trypton / Pepton aus Casein (Roth)
- 2,5 g Hefeextrakt (Bacto™ Yeast Extract; BD)
- 0,25 g NaCl
- 1,25 ml 1M KCl
- ad 1 l ddH<sub>2</sub>O
- Sterilisieren durch Autoklavieren.
- Zugabe von 10 ml sterilem 1M MgCl<sub>2</sub>.
- Zugabe von 20 ml steriler 1M Glucose.

#### Gelelektrophorese von Nukleinsäuren:

##### TAE-Puffer:

- 40 mM Tris-Acetat
- 1 mM EDTA
- auf pH 8,0 einstellen

##### 6 x DNA-Probenpuffer:

- 0,09 % Bromphenolblau
- 0,09 % Xylencyanol
- 60 % Glycerol
- 60 mM EDTA

### Ethidiumbromid-Stocklösung:

- 10 mg Ethidiumbromid in 1 ml ddH<sub>2</sub>O.

### **Proteinaufreinigung:**

#### Sonifizierungspuffer:

- 300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,8
- 300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,8 (+ 20 bzw. 250 mM Imidazol)

### **Proteinmengenbestimmung nach Lowry:**

#### Lowry-Reagenz 1:

- 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 20 ml 5 N NaOH
- ad 1 l ddH<sub>2</sub>O.

#### Lowry-Reagenz 2:

- 120 ml Folin-Ciocalleus-Phenolreagenz
- 230 ml ddH<sub>2</sub>O.

#### Reaktionsgemisch (unmittelbar vor dem Versuch anzusetzen):

- 1 ml 1 % CuSO<sub>4</sub>
- 1 ml 2 % Ka-Na-Tartrat
- 10 ml 10 % SDS
- ad 100 ml Lowry-Reagenz 1.

### **SDS-PAGE:**

#### Upper-Tris:

- 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
- 0,4 % SDS.

#### Lower-Tris:

- 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
- 0,4 % SDS.

#### 4% Sammelgel:

- 3,25 ml ddH<sub>2</sub>O
- 1,25 ml Upper-Tris pH 6,8
- 0,5 ml 19 % Acrylamid / 1 % Bisacrylamid
- 25 µl 10% APS
- 10 µl TEMED.

### 10% Trenngel:

- 5 ml ddH<sub>2</sub>O
- 2,5 ml Lower-Tris pH 8,8
- 2,5 ml 19 % Acrylamid / 1 % Bisacrylamid
- 40 µl 10% APS
- 20 µl TEMED.

### 2 x Proteinprobenpuffer (denaturierend):

- 2,2 ml ddH<sub>2</sub>O
- 4 ml 87% Glycerin
- 3 ml 20% SDS
- 0,6 ml β-Mercaptoethanol
- 0,2 ml 1 M Tris pH 7,5.

### 2 x Proteinprobenpuffer (nativ):

- 5,8 ml ddH<sub>2</sub>O
- 4 ml 87% Glycerin
- 0,2 ml 1 M Tris pH 7,5.

### 10 x SDS-Laufpuffer:

- 30 g Tris
- 10 g SDS
- 144 g Glycin
- ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

### Coomassie-Färbelösung:

- 1 g Coomassie Brilliant Blue R250
- 200 ml Ethanol
- 200 ml technischer Ethanol
- 117,5 ml technische Essigsäure
- ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

### Entfärbelösung:

- Färbelösung ohne Coomassie.

### **Westernblot zum Nachweis der homotrimeren Fiber:**

#### **1. Antikörper:**

α-fiber, Maus-Ascites (8C2.2)  
(Zur Verfügung gestellt von D.T. Curiel).

#### **ECL-Lösung 1:**

- 18 ml ddH<sub>2</sub>O
- 2 ml 1 M Tris pH 8,5
- 12 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **2. Antikörper:**

Ziege-α-Maus IgG, Peroxidase-Konjugat  
(Dianova).

#### **ECL-Lösung 2:**

- 17,7 ml ddH<sub>2</sub>O
- 2 ml 1 M Tris pH 8,5
- 88 µl Coumarinsäure
- 200 µl Luminol.

### **Transferpuffer:**

- 25 mM Tris
- 150 mM Glycin
- 10 % Methanol.

### **Blockpuffer:**

- 3% BSA und 0,1% TWEEN-20 in 1 x PBS.

### **Transfektionen:**

#### 2 x HBS:

- 280 mM NaCl
- 50 mM HEPES
- 1,5 mM wasserfreies  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- ad 90 ml ddH<sub>2</sub>O
- pH 7,1 einstellen
- ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O
- Sterilisieren durch Filtrieren.
- Lagerung bei 4°C

#### 2,5 M CaCl<sub>2</sub>:

- 7,35 g CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O
- ad 20 ml ddH<sub>2</sub>O bidest
- Sterilisieren durch Filtrieren.
- Lagerung bei 4°C.

#### Chloroquine:

- 8 mg/ml Chloroquin-Dihydrat in 1 x PBS.
- Sterilisieren durch Filtrieren.
- Lagerung bei -20°C.

#### Fixativ:

- 20 µl 25% Glutaraldehyd in 10 ml 1 x PBS.

#### Färbelösung:

- 70 ml ddH<sub>2</sub>O
- 10 ml 10 x PBS
- 10 ml 50 mM K-Ferricyanid
- 10 ml 50 mM K-Ferrocyanid
- 0,2 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>.

#### X-Gal:

- 20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid.

## Virusaufreinigung

### Dialysepuffer:

- 10 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 1 mM MgCl<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O
- 10% Glycerin
- pH 8,0.

## 3.1.5 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von ThermoHybaid (Ulm) bezogen.

### 3.1.5.1 Zielgerichtete Mutagenese

S408E fw	5'-CCA CAC CAG CTC CAG AAC CTA ACT GTA GAC-3'
S408E rev	5'-GTC TAC AGT TAG GTT CTG GAG CTG GTG TGG-3'
S408E/P409A fw	5'-ACC ACA CCA GCT CCA GAG GCT AAC TGT AGA CTA AAT GC-3'
S408E/P409A rev	5'-GCA TTT AGT CTA CAG TTA GCC TCT GGA GCT GGT GTG GT-3'
V441T fw	5'-GTT TCA GTT TTG GCT ACT AAA GGC AGT TTG GC-3'
V441T rev	5'-GCC AAA CTG CCT TTA GTA GCC AAA ACT GAA AC-3'
K442E fw	5'-CAG TTT TGG CTG TTG AAG GCA GTT TGG CTC C-3'
K442E rev	5'-GGA GCC AAA CTG CCT TCA ACA GCC AAA ACT G-3'
V441I/K442D fw	5'-GTT TCA GTT TTG GCT ATT GAT GGC AGT TTG GCT CC-3'
V441I/K442D rev	5'-GGA GCC AAA CTG CCA TCA ATA GCC AAA ACT GAA AC-3'
Y477A fw	5'-CTT CCT GGA CCC AGA AGC TTG GAA CTT TAG AAA TG-3'
Y477A rev	5'-CAT TTC TAA AGT TCC AAG CTT CTG GGT CCA GGA AG-3'
L485K fw	5'-CTT TAG AAA TGG AGA TAA GAC TGA AGG CAC AGC C-3'
L485K rev	5'-GGC TGT GCC TTC AGT CTT ATC TCC ATT TCT AAA G-3'

### 3.1.5.2 Overlap-PCR

RGD fw	5'- <b>GAT TGT TTC TGT</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
RGD rev	5'- <b>TCC TCT ACA ATC ACA</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
VSMC fw	5'- <b>AGT TGG ATT GGA GTA TTC CCA GAG TGC</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
VSMC rev	5'- <b>AAG TAC TAC TCC CCA GAT GTT GCA</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
EC fw	5'- <b>CCA CTG CCA</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
EC rev	5'- <b>GTA GCC GAT GCT</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-A fw	5'- <b>TTA GGA TTT TTC CAC TAT</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-A rev	5'- <b>TGA GTG GAG CGT GTT CTG</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-B fw	5'- <b>CAT CCG TCT TCT CTG ATT</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-B rev	5'- <b>CTT CCA AGC AGC ATT CGT</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'

SP-C fw	5'- <b>GCT CCG CAT CTG CCG ATT</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-C rev	5'- <b>CCA ATA ATA ATG AGA CGT</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-D fw	5'- <b>ACG AAG ATG AGG GTT CTG</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-D rev	5'- <b>CGT ATT CAG CGT ATG CTG</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-E fw	5'- <b>TCG CCG TAT ACG AAT CCG</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-E rev	5'- <b>CAG CTT CGG CAG CGA AAA</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-F fw	5'- <b>CTG AGG CTT CCG ACG CAG</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-F rev	5'- <b>AGG ATA CGG CAG AGC AGA</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-H fw	5'- <b>AAT GCT CAT GAT GGT GAG</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-H rev	5'- <b>ACA AAT CTT ACG AAT ACG</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-J fw	5'- <b>AAT GAG TAT CTG CAG ACG</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-J rev	5'- <b>ACG CTG CGT ATC ACT AGC</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-K fw	5'- <b>CTG GGT TAT CTG TCG TTT</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-K rev	5'- <b>ATT AGC ACG CGG AAC CGA</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-M fw	5'- <b>GGT TTT AGT ACG ATT CAG</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-M rev	5'- <b>CAG ATA CGA CGG CGT ATA</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-N fw	5'- <b>AAT ACG GAT AAT CTG CCG</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-N rev	5'- <b>ATA CAG CCA ACT ATG ATT</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-O fw	5'- <b>AAG ACG TCT TCG GAT CTG</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-O rev	5'- <b>CTG CCA CGT CGT CGT ACC</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-Q fw	5'- <b>ATG ACT ATT AAG ATG TCT</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-Q rev	5'- <b>ACC AAT CCC CAT AGG AAA</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'
SP-S fw	5'- <b>CTG GCT CAT GGG TCG GGT</b> GGA GAC ACA ACT CCA AGT GC-3'
SP-S rev	5'- <b>CAA AGG CCT CTG CGG CGT</b> TGT TTC CTG TGT ACC GTT TAG-3'

### 3.1.5.3 Sequenzierungsprimer

#### pQE-30/Ad5-Knob

KnobSeq5': 5'-GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA G-3'

#### SCMV + GFP

SCMV/GFP1: 5'-GGG TCC AGA TCC ACC ATA TTG-3'

SCMV/GFP2: 5'-TAT GGT GGA TCT GGA CCC CAG-3'

SCMV/GFP3: 5'-GGC TAT TGG CCA GGT TCA ATA C-3'

SCMV/GFP4: 5'-GCC AAG TAC ATC CCC ATT GAC G-3'

SCMV/GFP5: 5'-GAT ATC CAG ATC ATA TGA AGC G-3'

### 3.1.5.4 Primer zum Nachweis adenoviraler DNA nach Internalisierung

#### Nachweis adenoviraler DNA:

Fiber-fw: 5'-CCT CAC AGT TAC CTC AGA AG-3'

Fiber-rev: 5'-CGT AGC AAC TGG TCC AGG TGT G-3'

#### Nachweis genomischer DNA der Wirtszellen:

Rick: 5'-ATT CCA GGC AGT ACC AAA CAG -3'

Jim: 5'- CCA TCA GGG CCA ATA ATT ATT G -3'

## 3.2 Bakterien

### Bakterienstämme

XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lac<sup>f</sup>*  $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

DH5 $\alpha$ : *F- deoR recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 l- thi-1 gyrA96 relA1*

BJ5183 *endA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Strr)*

### Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte stets in LB-Medium bei 37 °C im Schüttler bei 225 UpM oder auf LB-Agarplatten 16 Stunden im 37 °C-Brutschrank. Als Selektionsmittel wurden bei Bedarf Antibiotika in der vorgegebenen Endkonzentration zugesetzt.

### Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Herstellung der elektrokompetenten Bakterien erfolgte nach dem Protokoll von Ausubel *et al.* (1994). Die Bakterien wurden in Aliquots von 40  $\mu$ l bei -80 °C eingefroren.

### Transformation durch Elektroporation

Die Transformationen erfolgten mit dem GenePulser II (Biorad, München). Nach der Transformation wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium gegeben und für 30 min bei 37 °C im Schüttler bei 220 UpM inkubiert. Verschiedene Volumina der Zellen wurden auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert oder gegebenenfalls zur Animpfung größerer Flüssigkulturen verwendet.

### 3.3 DNA-Konstrukte

#### 3.3.1 Prokaryotischer Expressionsvektor pQE-30

Auf der Basis dieses Plasmids wurden die am N-Terminus verkürzten löslichen Varianten des Fiberknob-Proteins exprimiert. Über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III wurde die DNA-Sequenz der Knobdomäne mit der 22. Wiederholung des Schafts bis zum C-Terminus in den Vektor pQE-30 kloniert (pQE-30/Ad5-Knob), was der Sequenz der Fiber von Aminosäure 387 bis 581 entspricht. Die Expression des Wildtyp-Knobs und der Mutanten erfolgte mittels dem QIAexpress Expressionssystem (Qiagen, Hilden). Alle generierten Proteine werden vom ATG-Startcodon (Nukleotid 115 – 117) aus mit einem N-terminalen Tag aus einem RGS-Motiv (Nukleotid 118 – 126) und 6 Histidinen (Nukleotid 127 – 144) exprimiert. Der Vektor mit dem klonierten WT-Knob-Sequenz hat eine Größe von 4012 bp (Anhang 7.V).

#### 3.3.2 Eukaryotischer Expressionsvektor pcDNA3.1(+)

Auf der Basis von pcDNA3.1(+) wurde das komplette Fibergen exprimiert. Die Fibersequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Xba*I in den Expressionsvektor einkloniert (pcDNA3.1-Fiber). Um eine hohe Expressionsrate zu gewährleisten wurde eine dreiteilige adenovirale Führungssequenz (TPL, Three-Peptide-Leader Sequenz) über die Restriktionsschnittstellen *Kpn*I und *Bam*HI in den Vektor einkloniert. Die aus Knob-, Schaft- und Schwanzdomäne bestehende Fiber stellte die Grundlage zur Herstellung pseudotypter Viren dar. Der Vektor hat mit Fiber und TPL eine Größe von 8269 bp (Anhan 7.VI).

### 3.4 Mutagenese

Zum einen wurde mittels zielgerichteter Mutagenese verschiedene Kontaktaminoaciden für die Interaktion mit CAR innerhalb der Knob-Sequenz von pQE-30/Ad5-Knob modifiziert, um entsprechende lösliche Knob-Proteine für Bindungsstudien im Rahmen von Konkurrenzexperimenten einzusetzen. Zum anderen wurden zur Herstellung von modifizierten Fibern für den Einbau in das virale

Kapsid im Rahmen des transienten Transfektions- u. Infektionssystems die Sequenz der Fiber im Expressionsvektor pcDNA3.1(+) mittels zielgerichteter Mutagenese Kontaktaminosäuren für die Interaktion mit CAR modifiziert und zum anderen durch Overlap-PCR verschiedene Peptidsequenzen in den HI-Loop kloniert.

### **3.4.1 Modifikation der Knob-Sequenz in pQE-30 durch zielgerichtete Mutagenese**

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden verschiedene potentielle Kontaktaminosäuren für die Interaktion mit CAR innerhalb der Knob-Sequenz von pQE-30/Ad5-Knob modifiziert. Dabei wurden verschiedene Kombinationen an Austausch vorgenommen, wobei zwischen 1 und 6 Aminosäuren ausgetauscht wurden. Zur PCR-Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt: 50 ng Template-DNA, je 25 pmol der beiden Primer, 1 U Phusion™ Proofreading-DNA-Polymerase (Finnzymes), 10 µl 5 x HF-Puffer (Finnzymes) und 0,2 mM Didesoxynukleotide. Die Temperatur zur Anlagerung der Primer bewegte sich in Abhängigkeit der individuellen Schmelztemperatur zwischen 55 und 65 °C.

PCR-Bedingungen für die zielgerichtete Mutagenese

Vor-Denaturierung	95 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Anlagerung	55 - 65 °C	30 s	16 Zyklen
Verlängerung	72 °C	150 s	
Finale Verlängerung	72 °C	300 s	

### **3.4.2 Modifikation der Fiber-Sequenz in pcDNA3.1(+) durch zielgerichtete Mutagenese und Overlap-Extension-PCR**

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden genau wie in 3.4.1 verschiedene potentielle Kontaktaminosäuren für die Interaktion mit CAR innerhalb der Fiber-Sequenz von pcDNA3.1-Fiber modifiziert. Darüber hinaus wurden mittels Overlap-PCR in den HI-Loop des Fibergens verschiedene Peptide kloniert. Grundlage dafür

war der an Position S408E/P409A des Fibergens modifizierte Vektor pcDNA3.1-Fiber/SP. Die PCR-Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt: 50 ng Template-DNA, je 25 pmol der beiden Primer, 1 U Phusion<sup>TM</sup> Proofreading-DNA-Polymerase (Finnzymes), 10 µl 5 x HF-Puffer (Finnzymes) und 0,2 mM Didesoxynukleotide. Die Temperatur zur Anlagerung der Primer bewegte sich in Abhängigkeit der individuellen Schmelztemperatur zwischen 55 und 65 °C. Nach diesem Protokoll wurden die zielgerichtete Mutagenese wie auch die Overlap-PCR durchgeführt.

PCR-Bedingungen für die zielgerichte Mutagenese

Vor-Denaturierung	95 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Anlagerung	55 - 65 °C	30 s	16 Zyklen
Verlängerung	72 °C	240 s	
Finale Verlängerung	72 °C	300 s	

PCR-Bedinungen für die Overlap-PCR

Vor-Denaturierung	95 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Anlagerung	55 - 65 °C	30 s	35 Zyklen
Verlängerung	72 °C	240 s	
Finale Verlängerung	72 °C	300 s	

### 3.4.3 Aufarbeitung der PCR-Ansätze

Alle PCR-Ansätze wurden mit dem Enzym Dpn I (NEB, Frankfurt) nach Vorgabe des Herstellers verdaut und mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Die linearen Doppelstränge aus den Overlap-PCRs wurden mit 20 Units T4 Polynukleotidkinase (NEB) 1 h bei 37°C in einem Reaktionsvolumen von 30 µl mit 3 mM Endkonzentration von ATP im Brutschrank phosphoryliert und das Enzym anschließend im Thermoblock 20 min bei 65 °C inaktiviert. Der gesamte Ansatz

wurde mit 1,5 Units T4 DNA-Ligase (invitrogen, Mannheim) über Nacht bei 16 °C ligiert. Die DNA wurde mit Natriumacetat und Ethanol gefällt, in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in *E. coli* Stamm XL1-Blue durch Elektroporation transformiert (s. 3.1.3).

### 3.5 DNA-Isolierung und Sequenzierung

#### Isolierung von Plasmid-DNA nach der „MiniPräp-Methode“

Alle Plasmid-DNA Präparationen im kleinen Maßstab erfolgten mit dem Wizard-Minipräp Kit von Promega (Mannheim) nach den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden Klone von LB-Amp Platten mit Zahnstochern gepickt und in 5 ml LB-Amp Medium im Schüttler bei 37 °C und 225 UpM über Nacht kultiviert. Die gesamten 5 ml wurden zur Plasmid-Präparation eingesetzt.

#### Isolierung von Plasmid-DNA nach der „MaxiPräp-Methode“

Die Plasmid-DNA-Präparation im großen Maßstab erfolgte nach dem EndoFree® Plasmid Maxi Kit von Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Für die Plasmid-Präparation wurden Klone mit Zahnstochern gepickt und in 5 ml LB-Amp-Medium im Schüttler bei 37 °C und 225 UpM 4 – 6 h kultiviert. Anschließend wurde die Vorkultur in 250 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 37°C und 230 UpM über Nacht im Schüttler inkubiert. Die gesamten 250 ml wurden für die Plasmid-DNA-Maxipräparation verwendet. Das DNA-Pellet wurde am Ende der Präparation in 500 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### Sequenzierung

Alle im Rahmen von zielgerichteter Mutagenese und Overlap-PCR eingefügten Modifikationen wurden durch DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer unter Verwendung des „BigDye® Terminator v1.0 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) bestätigt. Hierzu wurden 200 – 300 ng Plasmid-DNA, 5 pmol Primer und 2 µl BigDye™ in einem Gesamtvolumen von 10 µl für eine Sequenzierungs-PCR eingesetzt.

Reaktionsführung im Thermocycler (Perkin Elmer, GeneAmp 2400):

25 Zyklen		
Denaturierung	96 °C	10 s
Anlagerung	58 °C	5 s
Verlängerung	60 °C	240 s

Nach der PCR-Reaktion wurde die DNA mit 2 µl 3 M Na-Acetat und 30 µl Ethanol<sub>abs.</sub> gefällt und mit 250 µl 70 % igem Ethanol gewaschen, das angetrocknete Pellet in 25 µl Bdest aufgenommen und die Ansätze auf ein „ABI Prism Automated Sequencer“ des Typ 310 aufgetragen.

### 3.6 Herstellung von löslichen Knob-Protein

Nach Überprüfung der Sequenzen der Knob-Varianten im pQE-30 Expressionsvektor durch Sequenzierung, wurden 10 ng Plasmid-DNA in elektrokompetente XL1-Blue transformiert. Die Ansätze wurden nach 30 min Inkubation in SOC-Medium direkt zu 25 ml LB-Medium (100 µg/ml Amp) gegeben und über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 225 UpM kultiviert. 16 h später wurden mit den 25 ml Kultur 1 l LB-Medium mit 100 µg / ml Ampicillin-Endkonzentration angeimpft und im Schüttler bei 37 °C und 225 UpM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 - 0,9 kultiviert; dann mit IPTG (Endkonzentration: 2 mM) die Proteinsynthese induziert und für weitere 4 h wachsen gelassen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, das Pellet in 25 ml Sonifizierungspuffer aufgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die Bakteriensuspension wurde bei RT aufgetaut und Lysozym (Serva, Heidelberg) in einer Endkonzentration von 1 mg / ml zugegeben und für 30 min unter gelegentlichem leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden auf Eis mit dem Branson-Sonifier auf Stufe 5 für 3 x 2 min bei 40 % zerschallt und die Zelltrümmer anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1,5 bis 2 ml Sonifizierungspuffer äquilibrierter Ni-NTA-Suspension (Qiagen, Hilden) versetzt und für 2 h bei 4 °C auf dem Rotor inkubiert. Das Säulenmaterial wurde zunächst gemäß Herstellerangaben mit Sonifizierungspuffer und anschließend mit Sonifizierungspuffer (der 20 mM Imidazol enthielt) gewaschen. Die Knob-Varianten wurden dann mit Sonifizierungspuffer (der 250 mM Imidazol enthielt) eluiert und anschließend das in den Eluatzen noch vorhandene Imidazol durch Säulenchromatographie mit PD-10 Entsalzungssäulen von Amersham

Biosciences entfernt. Die aufgereinigten Proteine waren dann in ddH<sub>2</sub>O oder PBS monatelang bei 4 °C haltbar, ohne dass die homotrimere Form der Knob-Proteine beeinträchtigt wurde.

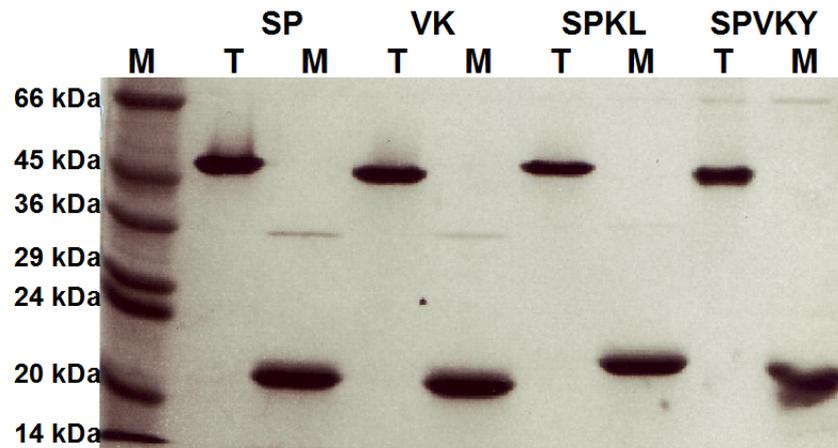
### **3.6.1 Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry**

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry *et al.* (1951) durchgeführt. Bei jeder Messung wurde eine komplette Eichreihe mit BSA-Standards von 0,1 bis 2 mg/ml in 1 % igem SDS und 3 Nullwerte in 1 %igem SDS ohne Protein erstellt. Die Proteinproben wurden in 1 % SDS verdünnt, so dass die Proteinkonzentration von 2 mg/ml nicht überschritten wurde. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. 10 µl Probe wurden vorgelegt, mit 1 ml Reaktionsgemisch versetzt, auf dem Vortex sofort gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 100 µl Lowry-Reagenz 2 zugegeben und sofort auf dem Vortex gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 578 nm. Um eine möglichst genaue Konzentrationsbestimmung zu gewährleisten wurden alle Proteinpräparationen insgesamt 4 mal nach Lowry quantifiziert und der Durchschnittswert ermittelt.

### **3.6.2 Bestätigung der trimeren Struktur der Knob-Proteine durch diskontinuierliche SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Mittels SDS-PAGE wurde überprüft, ob die Modifikation verschiedener Aminosäuren, die Fähigkeit der löslichen Knob-Proteine spontan zu trimerisieren, beeinträchtigt. Hierzu wurden die Proben unter semidenaturierenden und denaturierenden Bedingungen aufgetragen. Um die native, trimere Struktur des Knob-Proteins zu zeigen, wurde Proteinprobenpuffer ohne SDS und ohne β-Mercaptoethanol verwendet und die Proben nicht aufgekocht. Die denaturierte Form wurde mit dem gleichen Proteinprobenpuffer, aber mit SDS und β-Mercaptoethanol dargestellt; die Proben wurden unmittelbar vor dem Gellauf 5 min bei 95 °C aufgekocht. Es konnte gezeigt werden, dass alle Knob-Proteine unter semidenaturierenden Bedingungen als Bande auf einer Laufhöhe von etwa 45 kDa und unter denaturierenden Bedingungen

als Bande auf einer Laufhöhe von 20 kDa dastellbar waren. Die Abb. 3.1 zeigt exemplarisch ein Gel-Photo einer SDS-PAGE mit verschiedenen modifizierten Knob-Proteinen. Die Knob-Proteine wurden im weiteren Verlauf zur Competition im Rahmen von Competitionsexperimenten mit rekombinanten Adenoviren eingesetzt.



**Abb. 3.1:** Die Abbildung zeigt exemplarisch das Gel-Photo einer SDS-PAGE mit löslichen Knob-Proteinen, die an verschiedenen Positionen modifiziert waren (SP, VK, SPKL und SPVKY). Je 5 µg Protein wurden unter semidenaturierenden und denaturierenden Bedingungen aufgetragen (siehe Text). Die semidenaturierten Knob-Proteine konnten in ihrer trimeren Form als Banden auf einer Laufhöhe von etwa 45 kDa dargestellt werden (T). Die unter denaturierenden Bedingungen aufgetragenen Knob-Proteine konnten in ihrer monomeren Form als Banden auf einer Laufhöhe von etwa 20 kDa dargestellt werden. M = Low Marker.

## 3.7 Adenoviren

### 3.7.1 Adenovirale Konstrukte

#### Ad5.Luc:

Dieses replikationsdefiziente adenovirale Konstrukt auf der Basis des Subtyps 5 ist E1-deletiert und wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Küpper der Molekularen Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt. Es enthält eine Reporter genkassette bestehend aus dem humanen CMV-Promotor und dem Gen für Luziferase, die in die deletierte E1-Region eingefügt wurde.

#### Ad5.GFP:

Dieses replikationsdefiziente adenovirale Konstrukt auf der Basis des Subtyps 5 wurde im Rahmen dieser Arbeit auf der Basis des Vektorsystems pAdEasy von Qbiogene kloniert (siehe unten). Es enthält in der E1-deletierten Region eine

Reporterengenkassette bestehend aus dem simian CMV-Promotor und einem GFP-Konstrukt.

### Ad5.GFP. $\Delta$ F<sup>-</sup>/F<sup>+</sup>:

Das Ausgangskonstrukt wurde freundlicherweise von E. Wu aus dem Labor G. E. Nemerow in den USA zur Verfügung gestellt (Wu et al., 2001). Das adenovirale Konstrukt auf der Basis des Subtyps 5 enthält in der deletierten E1-Region eine Reporterengenkassette bestehend aus dem humanen CMV-Promotor und einem Gen für GFP. Im Gegensatz zu den anderen hier verwendeten Reporterviren Ad5.Luc und Ad5.GFP waren diese Konstrukte genomisch fiberlos. Durch *trans*-Komplementation ist es möglich die viralen Partikel phänotypisch mit Fibern auszustatten (Jacubczak et al., 2001). Auf diese Weise wurden in kurzer Zeit relativ viele verschiedene genotypisch fiberlose Partikel hergestellt, die phänotypisch mit unterschiedlich modifizierten Fibern ausgestattet waren (siehe unten). Die Technik der *trans*-Komplementation wird auch „Pseudotyping“ genannt und entsprechende Viren als „pseudogetypt“ bezeichnet.

## **3.7.2 Herstellung und Propagierung der adenoviralen Konstrukte**

### **3.7.2.1 Klonierung von Ad5.GFP**

Ein rekombinanter Ad5-Vektor mit einer Reporterengenkassette, bestehend aus Simian-CMV-Promotor und einem GFP-Reportereng, wurde auf der Basis des Vektorsystems AdEasy™ (Qbiogene) gemäß Herstellerangaben hergestellt. Dazu wurde das Konstrukt aus Promotor und GFP aus dem Vektor pCSGFP3 (4800 Bp) über die Restriktionsschnittstellen Sall und NotI in den Vektor pShuttle AES 1020 (6621 Bp) kloniert. Durch Sequenzvergleich konnte geklärt werden dass der Simian CMV-Promotor von Nukleotid 3879 bis 4883 im Ausgangsvektor enthalten war (Simian cytomegalovirus major immediate early transcription unit; Accession-Nr. U38308 L06819 M16019 U18245). Das als GFP3 im Ausgangsvektor pCSGFP3 bezeichnete Reportereng konnte durch Sequenzvergleich als „Synthetic construct modified green fluorescent protein GFP5“ (mgfp5; Accession-Nr. U87973) identifiziert werden, das von Nukleotid 21 bis 723 im Ausgangsvektor enthalten war. Der

Shuttlevektor mit der Expressionskassette wurde mit Pme I linearisiert und 1 µg in 5 µl ddH<sub>2</sub>O mit 100 ng in 1 µl pAdEasy-1-Vektor in elektrokompetente BJ5183 transformiert. Der Transformationsansatz wurde dann auf LB/Kan-Platten [50 µg/ml] ausplattiert, Übernachtkulturen angeimpft (LB/kan-Medium [50 µg/ml]), die DNA mittels Minipröp extrahiert und die homologe Rekombination durch Gelelektrophorese sowie Restriktionsverdau mit Pac I überprüft. Anschließend wurden 100 ng Plasmid-DNA in elektrokompetente DH5α transformiert und auf LB/Kan-Platten [50 µg/ml] ausplattiert. Mit den Kolonien wurden Übernachtkulturen (500 ml) angeimpft und die DNA mit dem Qiagen EndoFree MaxiPröp-Kit extrahiert. Die DNA wurde abschließend durch Gelelektrophorese, Restriktionsverdau und mit SCMV- bzw. GFP-spezifischen Primern durch Sequenzanalyse charakterisiert. Nach Bestätigung der Qualität der rekombinanten adenoviralen DNA wurde diese mit Pac I linearisiert und mittels CaPO-Transfektion in 911-Zellen eingebracht. Hierzu wurden die Zellen in 6-Well-Platten bei 75 % Konfluenz mit 10 µg DNA transfiziert und der Erfolg der Virusklonierung am Fluoreszenzmikroskop anhand der GFP-Expression verfolgt und alle 48 h das Zellkultur-Medium gewechselt. Die transfizierten 911-Zellen entwickelten 7 Tage nach Transfektion einen deutlichen CPE. Das Medium wurde nicht abgenommen und die Zellkulturschalen wurden 3 x eingefroren und aufgetaut, Zellen und Medium der Kulturschale entnommen, abzentrifugiert, mit dem Überstand eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit 75 % konfluenten 911-Zellen 1 h infiziert und das infektiöse Medium anschließend durch Zellkulturmedium ersetzt. Nach 48 – 72 h zeigten die Zellen einen CPE und Zellen und Überstand wurden wie im ersten Propagierungsschritt auf eine 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit 75 % konfluenten 911-Zellen gegeben und dieses Prozedere bei allen weiteren Propagierungsschritten beibehalten, wobei immer eine um den Faktor 3 größere Fläche für den nächsten Infektionsschritt verwendet wurde. Die letztendliche Viruspräparation wurde im Bereich der Reportergen-kassette auf die korrekte Insertion hin durch Sequenzanalyse überprüft.

### 3.7.2.2 Herstellung genomisch fiberloser Ad5.GFP.ΔF<sup>-</sup>/F<sup>+</sup>

Das von Wu *et al.* zur Verfügung gestellte Ausgangskonstrukt war phänotypisch mit wildtypischen Fibern ausgestattet, daher war dieses in der Lage mittels der natürlichen Rezeptoren Zellen zu infizieren. Um dieses Ausgangskonstrukt zu

propagieren wurden Helferzellen auf der Basis von 911-Zellen hergestellt, die stabil mit dem Fibrogen transfiziert waren. Um zu gewährleisten, dass das Fibrogen nicht im Laufe der Zellvermehrung wieder aus dem Genom entfernt wird, wurden 911-Zellen stabil mit dem Fibrogen in Verbindung mit dem Neomycin-Resistenzgen transfiziert. Hierdurch war bis zu einem gewissen Grad gewährleistet, dass die stabil transfizierten Zellen das Fibrogen unter Selektionsdruck in ihrem Genom integriert halten. Die stabil transfizierte Zelllinie wurde 911F genannt und wurde von Dr. Pamela Okun im Labor Petersen hergestellt. Die stabil die wildtypische Fiber exprimierenden 911F-Zellen dienten dann zur Herstellung genomisch fiberloser aber phänotypisch mit Fibern ausgestatteter Ad5.GFP. $\Delta F^-/F^+$ . Hierbei wurden die von der Zelle produzierten Fibern im Zuge der Virusreifung in die viralen Kapside eingebaut. Wie gezeigt werden konnte, hat das Fehlen des Fibrogens keinen negativen Einfluss auf die Virusreifung selbst. Entsprechende fiberlose Partikel assemblieren genauso effektiv wie Partikel mit Fibern (Von Seggern *et al.*, 1998, 1999 und 2000 Legrand *et al.*, 1999; Leissner *et al.*, 2001). Allerdings waren die mittels der stabilen Zelllinie 911F generierten Partikel, im Vergleich zu genomisch eine Fiber tragende Partikel, mit weniger Fibern ausgestattet (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich reichte die Synthese der Fibern in den 911F-Zellen nicht aus, um eine ausreichende Anzahl zur Verfügung stellen zu können, wie dies im Rahmen des natürlichen Infektionszyklus der Fall ist. Ungeachtet dessen reichte die Ausstattung der pseudogetypten Viren aus, um eine effektive Transduktion zu gewährleisten.

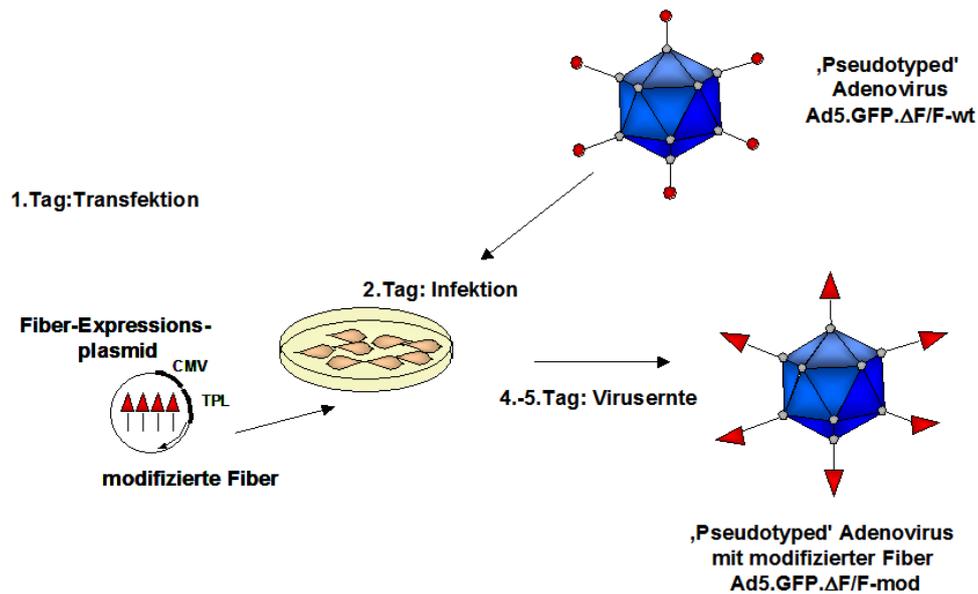
Die mittels 911F-Zellen generierten und mit wildtypischen Fibern pseudogetypten Viren dienten im Anschluss zur Herstellung von pseudogetypten Viren mit modifizierten Fibern im transienten Transfektions- u. Infektionssystem (siehe unten).

### **Herstellung von pseudogetypten Viren mit modifizierten Fibern im transienten Transfektions- u. Infektionssystem.**

Wie von Jakubczak *et al.* 2001 gezeigt werden konnte, ist es möglich pseudogetypte Viren in einem transienten Transfektions- u. Infektionssystem zu generieren. Das Prinzip wird in dem Schema der Abb. 3.2 verdeutlicht. In dieser Weise wurden auf der Basis von Ad5.GFP. $\Delta F^-/F^+$  virale Partikel mit modifizierten Fibern nach folgendem allgemeinen Protokoll hergestellt:

- Pro Fiberkonstrukt wurden drei Gewebekulturschalen ( $\varnothing$  150 mm, Nunclon) mit 911-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 1 Tag vor der Transfektion etwa  $1 \times 10^7$  Zellen pro Schale ausgesät, so dass der Zellrasen am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 75 –80 % erreichte.
- Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Methode mit dem Fiber-Expressionsvektor pcDNA3.1-Fiber transfiziert (siehe 3.4.2). Pro Gewebekulturschale wurden 200  $\mu$ g DNA und 62,5 mM Calciumchlorid in einem Gesamtvolumen von 3,6 ml für die Transfektion verwendet. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurde parallel eine Schale mit dem Vektor pRSV $\beta$  transfiziert. Hierbei lag die erzielte Transduktionseffizienz immer in einem Bereich von 70 – 90 % (Daten nicht gezeigt). Es konnte deshalb angenommen werden, dass die Transfektion mit pcDNA3.1-Fiber ähnlich effizient verlaufen ist und deshalb die überwiegende Mehrzahl der Zellen das Fiberprotein auch exprimieren.
- 1 h vor der Transfektion wurde das alte Medium von den Zellen genommen und durch neues Vollmedium ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. 1 h später wurden 200  $\mu$ l Chloroquine pro Schale auf die Zellen gegeben. Wie sich in Vorexperimenten gezeigt hatte, war die Transfektionseffizienz um etwa den Faktor 2 höher, wenn dem Medium Chloroquine zugegeben wurde (Daten nicht gezeigt). 4 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch neues Vollmedium ersetzt und die Zellen anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank etwa 24 h kultiviert.
- Die am Vortag mit der Fiber-DNA transfizierten 911-Zellen wurden mit Ad5.GFP. $\Delta$ F<sup>-</sup>/F<sup>+</sup> infiziert (1000 OP/Zelle), die mittels 911F-Helferzellen hergestellt wurden. Die Viren wurden dazu in 30 ml Vollmedium den Schalen zugegeben.
- Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> solange inkubiert, bis alle Zellen den cytopathischen Effekt (CPE) zeigten, was in der Regel nach 48 – 72 h der Fall war. Die Ernte der Zellen und die Virusaufreinigung erfolgte standardmäßig (siehe unten).
- Zu Kontrollzwecken wurden neben pseudogetypten Ad5.GFP. $\Delta$ F<sup>-</sup>/F<sup>+</sup> auch fiberlose Ad5.GFP. $\Delta$ F<sup>-</sup> hergestellt. Die Herstellung erfolgte im Prinzip genauso wie die Herstellung pseudogetypter Partikel im transienten Transfektions- und Infektionssystem, allerdings mit dem Unterschied, dass die Zellen nicht mit dem Fibrogen-kodierenden Expressionsplasmid transfiziert wurden.

**Transientes Transfektions/Infektions-System zur Herstellung rekombinanter Adenoviren mit modifizierten Fiberproteinen**



**Abb. 3.2:** Transientes Transfektions- und Infektionssystem: 1. Tag: 911-Zellen, werden mit dem Fiber-Expressionsplasmid pcDNA3.1-Fiber transfiziert. 2. Tag: Die transfizierten Zellen werden mit Ad5.GFP.ΔF/F<sup>+</sup> infiziert (Ad5.GFP.ΔF/F<sup>+</sup> wurden mittels 911F propagiert, daher sind diese Partikel mit wildtypischen Fibern ausgestattet). 4. – 5. Tag: Durch trans-Komplementation werden im Verlauf der Virusreifung die Partikel mit den modifizierten (zur Kontrolle auch mit wildtypischen) Fibern pseudogetyped. Die anschließende Virusernte und Aufreinigung erfolgte nach Standardmethoden.

### 3.7.3 Viruspropagierung, Ernte und Aufreinigung

#### Viruspropagierung:

Die viralen Konstrukte wurden in 911-Zellen (Ad5.Luc und Ad5.GFP) bzw. 911F-Zellen (Ad5.GFP.ΔF<sup>-</sup>/F<sup>+</sup>) in gleicher Weise propagiert. Hierzu wurde eine Gewebekulturschale (75 cm<sup>2</sup>) mit 75 – 80 % konfluentem Zellrasen mit 50 OP/Zelle (Ad5.Luc und Ad5.GFP) bzw. 1000 OP/Zelle (Ad5.GFP.ΔF<sup>-</sup>/F<sup>+</sup>) in Vollmedium (10 % FCS, 1 % Pen/Strep) infiziert und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> solange inkubiert, bis alle Zellen den cytopathischen Effekt (CPE) zeigten (was in der Regel nach 48 – 72 h der Fall war) und bei Bedarf das Kulturmedium gewechselt. Bei ausgeprägtem CPE wurden die Zellen mit dem Kulturmedium 3 mal eingefroren und aufgetaut, dann abzentrifugiert, mit dem Überstand eine Gewebekulturflasche (175 cm<sup>2</sup>) mit 75 – 80 % konfluentem Zellrasen 1 h infiziert und der virushaltige Überstand

durch Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden wieder bis zur Einstellung eines CPE kultiviert, dann durch dreimal Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen und mit dem abzentrifugierten virushaltigen Überstand 3 Gewebekulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) 1 h infiziert. Die Viruspropagierung (1:3) wurde solange fortgesetzt, bis eine ausreichende Zahl von Viren geerntet werden konnte.

### **Virusernte und Aufreinigung:**

Die Viren wurden 48 – 72 h nach Infektion der Zellen geerntet. Zu diesem Zeitpunkt ist die Virusreifung größtenteils abgeschlossen und die Viren befinden sich größtenteils noch in den Zellen. Die Zellen wurden im Kulturmedium bei 2000 UpM 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 3 ml PBS versetzt, resuspendiert und 4 mal eingefroren und aufgetaut. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 5 min Zentrifugation bei 5000 UpM abgetrennt und der virushaltige Überstand mit PBS auf etwa 8 ml aufgefüllt, 4,4 g CsCl zugegeben, gelöst und mit PBS auf 11 ml aufgefüllt und in ein Beckman-SW40-Zentrifugenröhrchen überführt. Der Ansatz wurde mit 2 ml Mineralöl überschichtet. Es wurde für 18 bis 24 h bei 32000 UpM und 10°C in der Ultrazentrifuge (Rotor: SW40Ti; Zentrifuge: Beckman LB 55) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die virushaltige Bande mit einer Sterican Gr. 1-Kanüle und einer 2 ml-Spritze gezapft. Die virushaltige Bande wurde in einen Dialyseschlauch überführt und für 5 h in einem glycerinhaltigen Puffer dialysiert, um das CsCl zu entfernen. Dabei wurde anfangs alle 30 min und später jede Stunde der Dialysepuffer gewechselt. Nach der Dialyse wurde die Virussuspension aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **3.7.4 Quantifizierung**

Die in dieser Arbeit generierten Viruspräparationen wurden hinsichtlich der Anzahl der physikalischen Partikel (OP/ml) photometrisch bestimmt und die infektiösen Titer im Rahmen von TCID-Bestimmungen quantifiziert.

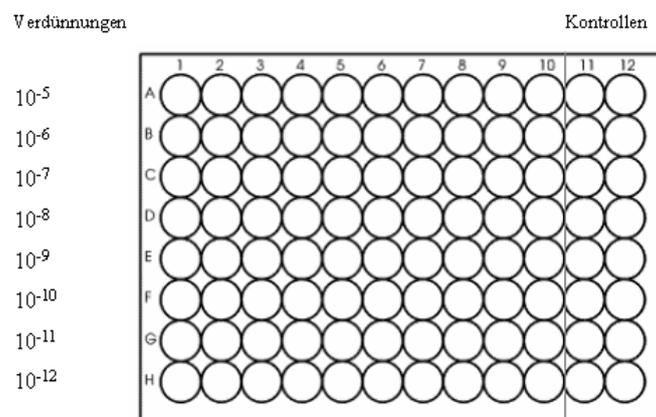
### 3.7.4.1 Quantifizierung der Anzahl der physikalischen Partikel (OP/ml)

Um die aufgereinigten Viren zu quantifizieren, wurde die Anzahl der physikalischen Partikel photometrisch bestimmt (Maizel et al., 1968). Eine OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht dabei einer Anzahl von  $1,1 \times 10^{12}$  Viruspartikeln. Hierzu wurden die Viruspräparationen nach der Dialyse in einem geeigneten Verhältnis mit Lyspuffer (0,1% SDS in 1 x PBS) verdünnt und 30 min bei 56°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die OD<sub>260</sub> am Photometer bestimmt. Als Referenzwert diente der Lysepuffer. Um den Virustiter zu berechnen, wurde die Absorption mit dem Verdünnungsfaktor und dem Extinktionskoeffizienten multipliziert:

$$(\text{OP/ml} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1,1 \times 10^{12})$$

### 3.7.4.2 TCID-50 Bestimmung (Tissue Culture Infectious Dose 50)

Alle auf der Basis von Ad5.GFP.ΔF<sup>-</sup>/F<sup>+</sup> generierten Viren wurden hinsichtlich ihres infektiösen Titers im Rahmen von TCID-50 Bestimmungen quantifiziert. Hierzu wurden die verschiedenen Zelltypen in 96-Well-Gewebekulturplatten ausgesät. Pro Zelllinie wurden jeweils 2 Gewebekulturplatten für die Titration verwendet. Es wurden Verdünnungen der Virussuspensionen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-12}$  in Vollmedium angesetzt und die Zellen in den Gewebekulturplatten mit den Virusverdünnungen von  $10^{-5}$  bis  $10^{-12}$  infiziert (Abb.3.3).



**Abb. 3.3:** Aufteilung einer Gewebekulturplatte für die Bestimmung der TCID<sub>50</sub>

Jeweils 10 Wells einer Reihe wurden mit 100 µl einer Virusverdünnung versetzt. Als Kontrolle dienten je 2 Wells einer Reihe, die mit Medium ohne Viren versetzt wurden.

Die Gewebekulturplatten wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 3 Tage inkubiert. Dann wurde die An- beziehungsweise Abwesenheit der GFP-Reporterexpression am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200) bestimmt. Anschließend wurde der Titer nach der statistischen Kärber-Methode berechnet. Formel zur Berechnung der TCID<sub>50</sub> nach der statistischen Kärber-Methode:

$$\text{TCID}_{50}/100 \mu\text{l} = 10^{1,08 + d (\Sigma - 0,5)}$$

$$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = 10 \cdot \text{TCID}_{50}/100 \mu\text{l} = 10 \cdot 10^{1,08 + d (\Sigma - 0,5)}$$

$$\text{IU}/\text{ml} = \text{TCID}_{50}/\text{ml} - 0,7 = 10 \cdot 10^{1,08 + d (\Sigma - 0,5)} - \ln 0,5$$

1,08 = log 12; Logarithmus der höchsten Virusverdünnung

d = log 10 = 1; Logarithmus des Intervalls

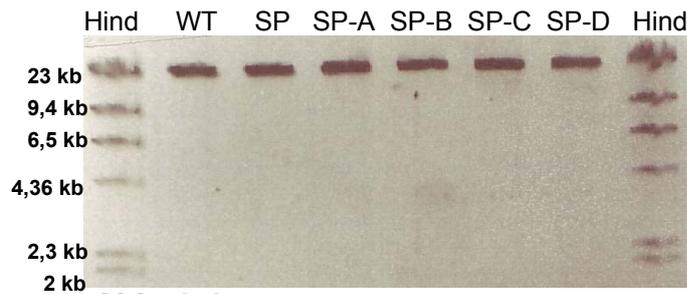
Σ = Summe der Werte

### 3.7.5 Kontrolle der Qualität von Ad5.GFP.ΔF<sup>-</sup>/F<sup>+</sup>-Präparationen

#### 3.7.5.1 Vergleich des DNA-Gehaltes

Um zu klären ob sich der DNA-Gehalt der verschiedenen Präparationen pseudogetypter Partikel unterscheidet, wurden je Viruspräparation 5 x 10<sup>10</sup> OP mit Proteinase-K nach folgendem Protokoll verdaut und die DNA aufgereinigt.

Hierzu wurde ein 5 x 10<sup>10</sup> OP entsprechendes Volumen den verschiedenen Viruspräparationen entnommen und mit gleichem Volumen zweifach gepufferter Proteinase-K Lösung versetzt. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden 0,2 Volumen 5 M NaCl zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Präzipitate wurden abzentrifugiert, die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das gleiche Volumen ddH<sub>2</sub>O zugegeben. Anschließend wurde die Lösung phenolisiert, die DNA in der wässrigen Phase gefällt und das Pellet in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Hiervon wurden je 5 µl gelelektrophoretisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Bandenintensität der verschiedenen Viruspräparationen in etwa gleich war (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Das Gelphoto zeigt exemplarisch die DNA-Banden verschiedener Präparationen pseudogetypter Viren nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 0,7 % Agarosegel. (Marker HindIII).

### 3.7.5.2 Westernblot-Analyse

Die viralen Partikel ( $1 \times 10^{10}$  OP) wurden durch SDS-PAGE in semidenaturierendem Probenpuffer aufgetrennt und nach dem „Semi-Dry-Verfahren“ auf Hybond-PVDF-Membranen (Amersham Biosciences) transferiert. Die Membranen wurden nach Angaben des Herstellers aktiviert (10 s in 100% Methanol dann 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 10 min in Transferpuffer äquilibriert) und für 90 min bei 1,5 mA/cm<sup>2</sup> transferiert. Die Membranen wurden in Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper (1:10.000 in Blockpuffer) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden dreimal für 5 min bei Raumtemperatur mit Blockpuffer gewaschen und dann mit dem 2. Antikörper (1:3000 in Blockpuffer) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte dreimal 5 min bei Raumtemperatur in Blockpuffer waschen und anschließend wurde detektiert. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz (ECL). Hierzu wurden die Membranen 1 min in der ECL-Lösung inkubiert, Röntgenfilme (Hyperfilm ECL, Amersham) aufgelegt und 2 min exponiert. Die Filme wurden in der Entwicklermaschine (Agfa) entwickelt.

### 3.7.5.3 ELISA zur Quantifizierung der Effizienz des Einbaus von Fibern in Ad5.GFP. $\Delta$ F<sup>-</sup>/F<sup>+</sup>

Im ELISA wurde der Gehalt an Fiber-Protein im Vergleich zum Hexon-Protein analysiert.

### Allgemeines Protokoll:

1. Inkubation der Virusverdünnung für 90 min bei Raumtemperatur (Maxisorb-Platten).
2. 3 x Waschen mit Blockpuffer.
3. Inkubation mit Blockpuffer für 90 min.
4. 2 x Waschen mit Blockpuffer.
5. Inkubation mit dem jeweiligen Erst-Antikörper für 20 min. (Maus- $\alpha$ -Fiber 1:50000 in Blockpuffer und Maus- $\alpha$ -Hexon 1:3000 in Blockpuffer)
6. 3 x Waschen mit Blockpuffer.
7. Inkubation mit dem Zweit-Antikörper für 20 min. (Ziege- $\alpha$ -Maus-Peroxidase-Konjugat 1:10000 in Blockpuffer)
8. 4 x Waschen mit Blockpuffer.
9. Detektion mit 100  $\mu$ l TMB-Substrat (Promega) pro well für 5 bis 10 min.
10. Stoppen der Farbreaktion mit 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro well.
11. Photometrische Auswertung der Farbtintensität mit Hilfe eines ELISA-Readers (Dynatech MR 5000) bei 450 nm.

### Erstantikörper:

$\alpha$ -fiber, Maus-Ascites (8C2.2 ; Zur Verfügung gestellt von D.T. Curiel).

$\alpha$ -hexon, Maus (monoklonal, abcam).

### Zweitantikörper:

Ziege- $\alpha$ -Maus IgG, Peroxidase-Konjugat (Dianova).

### Blockpuffer:

• 3% BSA und 0,15% TWEEN-20 in 1 x PBS.

## 3.8 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

### Dauerzellen:

#### HeLa

Die HeLa-Zellen sind eine humane Cervixkarzinom-Zelllinie, welche auf das Jahr 1951 zurückgeht (Gey et al., 1952; Scherer et al., 1953). Die Diagnose Cervixkarzinom wurde später in Adenokarzinom geändert. Bei den HeLa-Zellen handelt es sich um die erste dauerhaft kultivierte Zelllinie. Die Epithel-Zellen wurden

in RPMI 1640-Medium (Invitrogen) mit 25 mM HEPES, GlutaMAX™-I, 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Pen/Strep (Invitrogen) kultiviert.

### HepG2

Die HepG2-Zellen sind eine humane Leberkarzinom-Zelllinie, welche von einem 15-jährigen argentinischen Jungen aus dem Jahr 1975 stammt (Aden et al., 1979; Knowles et al., 1980). HepG2-Zellen wachsen als Monolayer und in kleinen Aggregaten. Die HepG2-Zellen wurden in DMEM (Invitrogen) mit GlutaMAX™ I, 4500 mg/l D-Glucose, Na-Pyruvat, 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Pen/Strep kultiviert.

### 293T

Die 293T-Zellen sind ein Derivat der HEK 293-Zellen und exprimieren das SV40 T-Antigen. Sie stammen von humanen, embryonalen Nierenzellen ab, welche mit dem adenoviralen E1A-Gen transformiert wurden (Louis et al., 1997). Die Ad5-DNA befindet sich auf Chromosom 19. Im Aussehen sind die 293T-Zellen Epithelzellen. Mit der Calcium-Phosphat-Methode können hohe Transfektionsraten erzielt werden. Die Zelllinie wird für die Produktion von Adenoviren verwendet. Die 293T-Zellen wurden in DMEM mit GlutaMAX™ I, 4500 mg/l D-Glucose, Na-Pyruvat, 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Pen/Strep kultiviert.

### 911

911-Zellen sind humane, embryonale Retinoblastom-Zellen (Fallaux et al., 1996), welche einige Eigenschaften mit den HEK 293-Zellen gemein haben. Die Zellen sind mit Ad5-DNA transformiert und werden für die Adenovirus-Produktion eingesetzt. Die Zellen sind besser für einen Plaque-Assay geeignet als die HEK 293-Zellen und die Produktion von Adenoviren ist höher. Es ist vollständig bekannt, wie viel Ad5-DNA in den Zellen enthalten ist. 911-Zellen können mit der Calcium-Phosphat-Methode leicht transfiziert werden. Die 911-Zellen wurden in DMEM mit GlutaMAX™ I, 4500 mg/l D-Glucose, Na-Pyruvat, 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Pen/Strep kultiviert.

### 911 F

911 F-Zellen stammen von 911-Zellen ab und wurden stabil mit der Ad5 fiber-DNA transfiziert. Die stabile Zelllinie ist für die Produktion von fiberlosen Adenoviren geeignet. Die 911 F-Zellen wurden in Selektionsmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Das Selektionsmedium bestand aus DMEM mit GlutaMAX™ I,

4500 mg/l D-Glucose, Na-Pyruvat, 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) G418-Sulfat (Invitrogen).

### A7r5

A7r5-Zellen sind glatte Muskelzellen aus der Aorta, welche von der embryonalen Ratte (Stamm: DBX1) stammen (Kimes & Brandt, 1967). Die Aktivität der Enzyme Myokinase und CPK ist in der stationären Phase erhöht. Die Fibroblasten-Zellen wurden in DMEM (Invitrogen) mit GlutaMAX™ I, 4500 mg/l D-Glucose, Na-Pyruvat, 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Pen/Strep kultiviert.

### CHO-K1

Die CHO-K1-Zelllinie ist ein Subklon der CHO-Zelllinie, welche von einer Ovar-Biopsie eines adulten Goldhamsters aus dem Jahr 1957 stammt (Ham et al., 1965; Kao et al., 1968; Puck et al., 1958). Die CHO-K1-Zellen sind Fibroblasten-Zellen und exprimieren keinen CAR-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Die Zellen wurden in Ham's F12-Medium (Invitrogen) mit L-Glutamin, 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Pen/Strep kultiviert.

### COS-7

COS-7-Zellen sind Nierenzellen, welche von der CV-1-Zelllinie abstammen. Die Fibroblasten-Zellen stammen aus der Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) und exprimieren das SV40 T-Antigen (Gluzman, 1981). Die Zellen wurden in DMEM (Invitrogen) mit GlutaMAX™ I, 4500 mg/l D-Glucose, Na-Pyruvat, 10% (v/v) FKS und 1% (v/v) Pen/Strep kultiviert.

## **Primäre Zellen**

### h-CASMC

Bei den h-CASMC-Zellen handelt es sich um humane glatte Muskelzellen aus Herzkranzgefäßen (Ross, 1993; McGill, 1984; Jonasson et al., 1986; Owens, 1996; Fager et al., 1989). Die Zellen sind normal und Plaque-frei. Die Primärzellen wurden von der Firma Cambrex bezogen und in einer Medienmischung aus 1/3 Waymouth Medium (Invitrogen), 1/3 Ham's F12-Medium (Invitrogen) und 1/3 Smooth Muscle Cell Basal Medium (Promocell), 15 % (v/v) FKS und 1 % (v/v) Pen/Strep kultiviert.

Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 passagiert. Die Zellen wurden nach etwa 11 - 13 Zellteilungen (Doublings) in den Infektionsexperimenten eingesetzt.

### h-CAEC

Bei dieser humanen Primärzelllinie handelt es sich um normale Endothelzellen aus Herzkranzgefäßen (Jaffe, 1997; Mason et al., 1997; Ross, 1993; Ryan, 1985; Ruschitzka et al., 1997). Die Zellen wurden von der Firma Cambrex bezogen und in Endothelzellmedium kultiviert: Endothelial Cell Medium-2 (Cambrex) mit 2% FKS, Gentamicin/Amphotericin-B, hEGF, VEGF, hFGF-B, R<sup>3</sup>- IGF-1, Hydrocortison, Heparin und Ascorbinsäure. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 passagiert. Die Zellen wurden nach etwa 11 - 13 Zellteilungen (Doublings) in den Infektionsexperimenten eingesetzt.

### Mesenchymale Stammzellen

Diese Stammzellen wurden von der Firma Cambrex bezogen. Die Zellen wurden in speziellem Stammzellmedium (MSCBM, Art. Nr.: POPT-3238) mit den Supplementen (MSCGM, Art.Nr.: POPT-4105) (Cambrex) mit 5 % FCS kultiviert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:4 passagiert und nach 8 – 10 Zellteilungen (Doublings) in den Infektionsexperimenten eingesetzt.

## **3.9 Infektions- und Konkurrenzexperimente**

### **3.9.1 Bestimmung der Anzahl GFP-positiver Zellen im Rahmen von Infektions- u. Konkurrenzexperimenten**

Zur Quantifizierung der GFP-positiven Zellen in den Infektions- u. Konkurrenzexperimenten wurden die Zellen 48 – 72 h nach Virusexposition gewaschen, trypsiniert und in einem geeigneten Volumen PBS aufgenommen, so dass es möglich war, die Anzahl der GFP-positiven und GFP-negativen Zellen mittels Durchlicht und Fluoreszenzlicht in der Neubauer Zählkammer zu bestimmen. Hierzu wurden für jede experimentelle Bestimmung dreimal alle 4 aus 16 kleineren Quadraten bestehenden Zählquadrate der Zählkammer ausgewertet.

### 3.9.2 Bestimmung der relativen Infizierbarkeit

Zur Bestimmung der relativen Infizierbarkeit wurden die Zellen in 24-Well-Platten Vortags ausgesät und die Zellrasen bei etwa 80 % Konfluenz mit einer Verdünnungsreihe des Reportervirus Ad5.Luc 45 min infiziert. 48 h nach Infektion wurde die Zellzahl in Kontroll-Wells bestimmt und die Luziferaseaktivität aus der Verdünnungsreihe bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und den Wells 250 µl Reporter-Lysis-Puffer (Promega) zugegeben und die Luziferaseaktivität im Luminometer (Berthold) gemessen. Die Abb. 3.5 zeigt exemplarisch die Messwerte einer Verdünnungsreihe am Beispiel von Endothelzellen. Die Infektionen mit  $2,45 \times 10^6$  –  $6,11 \times 10^5$  OP/Well entsprechen dem Hintergrund und erst ab  $4,89 \times 10^6$  OP/Well und mehr, wurde ein linearer Anstieg der Reporterexpression detektiert. Die Anzahl der viralen Partikel von  $4,89 \times 10^6$  wurde dann auf die Zellzahl pro Well bezogen und so die relative Infizierbarkeit bestimmt. In gleicher Weise wurde die relative Infizierbarkeit aller in dieser Arbeit verwendeten Zell-Typen bestimmt und die Ergebnisse verglichen. Da die ermittelten Werte von den hier gewählten experimentellen Bedingungen abhängig sind, wurde die Bezeichnung „relative Infizierbarkeit“ gewählt.

Endothelzellen: Infektion mit Verdünnungsreihe Ad5.Luc												
OP/Well:	1,25E+09	6,25E+08	3,13E+08	1,56E+08	7,81E+07	3,91E+07	1,96E+07	9,78E+06	<b>4,89E+06</b>	2,45E+06	1,22E+06	6,11E+05
RLUs:	715867	490733	293927	144264	55196	12036	7231	2290	<b>1035</b>	367	458	365

**Abb. 3.5:** Exemplarische Darstellung der Bestimmung der relativen Infizierbarkeit am Beispiel von Endothelzellen. Die Zellen wurden in 25-Well-Platten mit Verdünnungen des Reportervirus Ad5.Luc 45 min infiziert und 48 h später die Luziferaseaktivität quantifiziert. Für die Verdünnungsstufe, die eine messbare Reporterexpression aufwies, wurde die Anzahl der eingesetzten viralen Partikel auf die Zellzahl bezogen und so die relative Infizierbarkeit der Zellen bestimmt.

### 3.9.3 Heparinase-Experimente

Die Heparinase (Heparin Lyase I, MDL Nr.: MFCD00131317 von Sigma-Aldrich wurde in lyophilisiertem Zustand geliefert und davon nach Herstellerangaben eine Stocklösung angesetzt, die dann dem Medium unmittelbar vor dem Experiment zugesetzt wurde.

CHO-Zellen wurden 24 h vor Inkubation mit Heparinase in 24-Well-Platten so ausgesät, dass der Zellrasen zum Zeitpunkt des Experiments etwa 80 % konfluent

war. Das Kulturmedium wurde abgenommen und mit 250 µl Vollmedium, welches 10 bzw. 0 Units/ml Heparinase enthielt, 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden weitere 250 µl Vollmedium mit Ad5.Luc zugegeben. Der dabei eingesetzte virale Titer bewegte sich in einem Bereich von 625 - 10000 OP/Zelle. Es wurde 45 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, der infektiöse Überstand durch 1 ml Kulturmedium ersetzt und die Zellen 48 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Nach 48 h wurde die Luziferase-Reporterexpression im Luminometer quantifiziert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 250 µl Reporter-Lysis-Puffer (Promega) zugegeben, 60 min bei RT inkubiert und von je 10 µl Ansatz die Aktivität bestimmt. Dieses Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Die Experimente mit primären glatten Muskelzellen und mesenchymalen Stammzellen wurden in Anlehnung an das Experiment mit CHO-Zellen durchgeführt. Allerdings wurden beide Zelltypen hier mit unterschiedlichen Konzentrationen Heparinase in einem Bereich von 1,25 – 10 U/ml behandelt. Die glatten Muskelzellen wurden mit 2000 OP/Zelle infiziert und die mesenchymalen Stammzellen mit 4000 OP/Zelle.

### **3.9.4 Konkurrenzexperimente mit Heparin und Knob-Protein**

Im Rahmen der Konkurrenzexperimente wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und in 4 parallelen Ansätzen mit Reporterviren infiziert, wobei die Reporterviren stets in dem jeweiligen Vollmedium in Anwesenheit von FKS und Pen/Strep den Zellen zugegeben wurden:

1. Infektion ohne Konkurrenten
2. Infektion nach Präinkubation der Viren mit Heparin
3. Infektion nach Präinkubation der Zellen mit Knob-Protein
4. Infektion nach Präinkubation der Viren mit Heparin und Präinkubation der Zellen mit Knob-Protein

Die Präinkubation der Viren mit Heparin erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in Vollmedium mit 20 µg/ml Heparin (Stocklösung 1mg/ml in PBS). Parallel dazu wurden Viren in Vollmedium ohne Heparin inkubiert. In Vorexperimenten mit CAR-negativen CHO-Zellen sowie CAR-positiven 293T-Zellen und 911-Zellen konnte

gezeigt werden, dass bei Konkurrenz mit Heparin-Konzentrationen ab 10 µg/ml keine Zunahme des inhibitorischen Effekts mehr zu erzielen war. Daher wurde in allen Konkurrenzexperimenten mit Heparin eine Konzentration von 20 µg/ml für die Präinkubation mit den Reporterviren eingesetzt. Hiervon wurden nach der Präinkubation 250 µl den Zellen zugegeben.

Den Zellen wurde 20 min vor der Virusexposition das Kulturmedium abgenommen und 250 µl frisches Vollmedium zugegeben, das entweder 100 µg Knob-Protein in den Konkurrenzexperimenten im Abschnitt 4.1.4.1 bzw. 150 µg Knob-Protein in den Experimenten des Abschnitts 4.3.3 pro 250 µl enthielt oder kein Knob-Protein enthielt. Nach der Inkubation von 20 min wurden dann die Viren zugegeben, die entweder nur in Vollmedium oder in Vollmedium mit 20 µg/ml Heparin 1 h präinkubiert wurden; hieraus haben sich die oben genannten 4 verschiedenen Ansatzmöglichkeiten ergeben. Die infektiösen Überstände wurden nach 45 min Inkubation bei 37 °C im Brutschrank abgenommen, frisches Vollmedium zugegeben und bis zur Quantifizierung der Reportergenexpression 48 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

### **3.9.5 Nachweis adenoviraler DNA in Zellen nach Virusexposition in An- und Abwesenheit von Konkurrenten.**

CAR-negative CHO-Zellen und CAR-positive HeLa-Zellen wurden die Zellen in 24-Well-Platten Vortags ausgesät und die Zellrasen bei etwa 80 % Konfluenz in An- und Abwesenheit von Konkurrenten 15 min bei 37 °C im Brutschrank in der unter 3.9.4 beschriebenen Art und Weise mit 1000 OP/Zelle infiziert. Hierzu wurde Heparin mit 20 µg/ml und Knob-Protein mit 100 µg/250 µl Medium eingesetzt. Nach 20 min Inkubation wurden die infektiösen Überstände abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde den Zellen 200 µl Trypsin-EDTA (0,25 % Trypsin, invitrogen) zugegeben und 5 min inkubiert. Die vereinzelt Zellen wurden aus den Gewebekulturplatten in Reaktionsgefäße überführt, auf Eis gestellt und 1,3 ml eiskaltes PBS zugegeben, gemischt und bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets wiederholt zweimal mit etwa 1,5 ml eiskaltem PBS gewaschen um im Überstand vorhandene nicht internalisierte Viren zu

entfernen. Den Pellets wurde anschließend 250 µl eiskaltes ddH<sub>2</sub>O zugegeben und die Zellen auf Eis durch 10 x auf- u. abziehen mit einer Spritze (Kanüledurchmesser 0,4 mm) durch Scherkräfte aufgeschlossen. Die Pellets wurden bei 4 °C abzentrifugiert und die Überstände für eine PCR eingesetzt. Hierzu wurden Primer eingesetzt, die ein etwa 350 bp langes Fragment vom adenoviralen Fibrogen amplifizieren und Kontrollprimer, die ein 1,3 kb langes Fragment aus der genomischen DNA von HeLa-Zellen bzw. ein 800 bp langes Fragment aus der genomischen DNA von CHO-Zellen amplifizieren.

Die PCR-Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt: 10 µl aus dem Zellaufschluss, je 25 pmol der beiden Primer, 1 U Phusion™ Proofreading-DNA-Polymerase (Finnzymes), 10 µl 5 x HF-Puffer (Finnzymes) und 0,2 mM Didesoxynukleotide.

PCR-Bedingungen		
Vor-Denaturierung	95 °C	30 s
Denaturierung	95 °C	30 s
Anlagerung	58 °C	30 s
Verlängerung	72 °C	30 s
Finale Verlängerung	72 °C	60 s

35 Zyklen

Jeweils 5 µl der PCR-Ansätze wurden gelelektrophoretisch analysiert (siehe 4.1.5)

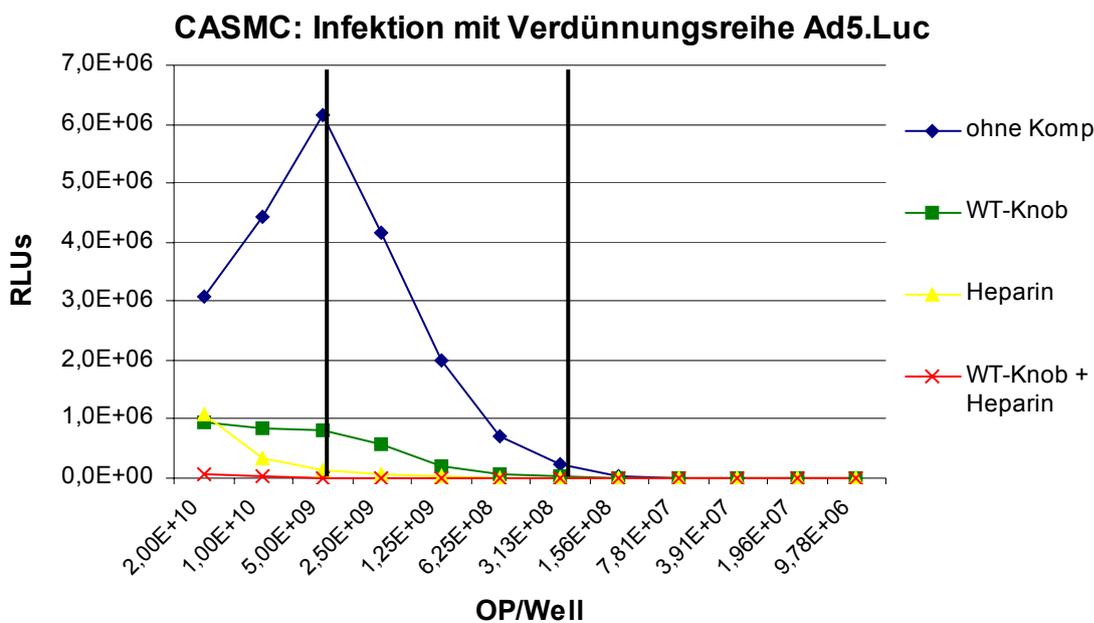
### **3.9.6 Exemplarische Darstellung der Bestimmung des Einflusses von Knob und Heparin auf die Infizierbarkeit der verwendeten Zelllinien am Beispiel eines Experiments mit glatten Muskelzellen.**

Die Zellen wurden in An- und Abwesenheit von Kompetitoren in einer Verdünnungsreihe in 24-Well-Platten mit Ad5.Luc 45 min infiziert. Die Verdünnungsreihe war so gewählt, dass in jedem Fall der Bereich von der Sättigung bis zur Nachweisgrenze abgedeckt war. Es wurden jeweils 4 experimentelle Ansätze gleichzeitig durchgeführt: Infektion ohne Kompetitoren, Konkurrenz mit wildtypischen Knob, Konkurrenz mit Heparin und Konkurrenz mit beiden Kompetitoren. In Abb. 3.6 sind die gemessenen RLUs der parallelen Ansätze und in Abb 3.7 deren graphische

Darstellung wiedergegeben. Hiernach ist in einem Bereich zwischen den Verdünnungsstufen  $5,00E+09$  und  $3,13E+08$  mit zunehmender Virusverdünnung ein linearer Rückgang in der Reporterexpression des Ansatzes ohne Kompetitoren zu erkennen. Die RLUs der jeweiligen Ansätze in diesem Bereich wurden addiert und sind durch die dickere Schrift hervorgehoben.

Well	OP/Well	Infektion ohne Kompetitoren	Kompetition mit WT-Knob	Kompetition mit Heparin	Kompetition mit WT-Knob und Heparin
		RLU			
1	$2,00E+10$	3067758	931331	1087153	76044
2	$1,00E+10$	4428207	834395	349272	30159
3	$5,00E+09$	<b>6167933</b>	<b>797731</b>	<b>144004</b>	<b>7709</b>
4	$2,50E+09$	<b>4170718</b>	<b>590472</b>	<b>65938</b>	<b>3917</b>
5	$1,25E+09$	<b>1988842</b>	<b>207114</b>	<b>22563</b>	<b>1714</b>
6	$6,25E+08$	<b>704469</b>	<b>53122</b>	<b>13941</b>	<b>1106</b>
7	$3,13E+08$	<b>237976</b>	<b>21454</b>	<b>5398</b>	<b>818</b>
8	$1,56E+08$	39951	5212	3215	556
9	$7,81E+07$	8750	1633	639	222
10	$3,91E+07$	6854	1069	349	207
11	$1,96E+07$	4281	412	223	280
12	$9,78E+06$	1550	293	305	221

**Abb. 3.6:** Ergebnis der Reporter-Gen-Quantifizierung eines Konkurrenzexperimentes mit glatten Muskelzellen. Die RLUs im Verdünnungsbereich von  $5,00E+09$  bis  $3,13E+08$  entsprechen dem zum Quantifizierung des Einflusses der Kompetitoren herangezogenen Bereiches und sind durch eine dickere Schrift hervorgehoben

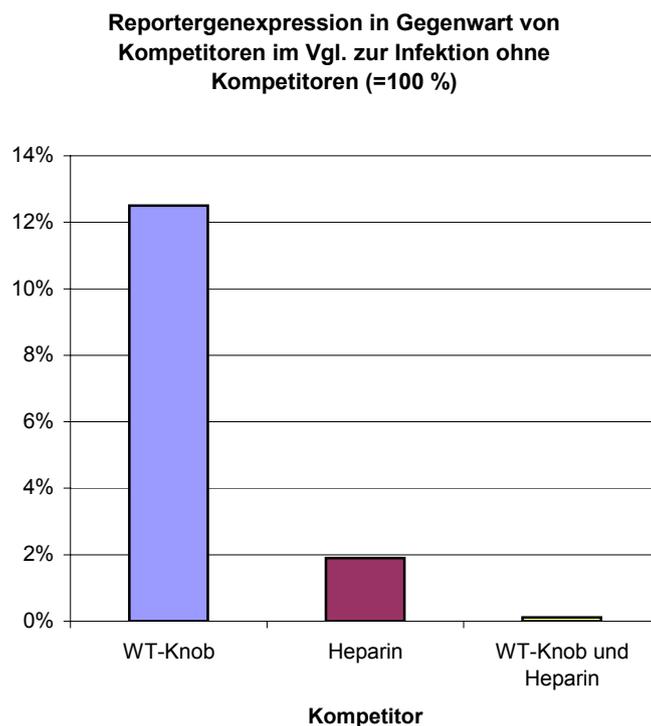


**Abb. 3.7:** Graphische Darstellung der Reporter-Gen-Quantifizierung eines Konkurrenzexperimentes mit glatten Muskelzellen. Die RLUs im Verdünnungsbereich von  $5,00E+09$  bis  $3,13E+08$  zwischen den beiden schwarzen Balken entsprechen dem zum Quantifizierung des Einflusses der Kompetitoren herangezogenen Bereiches.

Die Summe der RLUs aus dem Ansatz ohne Kompetitoren wurde mit 100 % gleichgesetzt und die Summe der RLUs aus den Ansätzen mit Kompetitoren innerhalb des Bereiches von  $5,00E+09$  bis  $3,13E+08$  hierauf bezogen (Abb. 3.8). In Abb. 3.9 ist der Prozentwert der Reporterexpression in Gegenwart der Kompetitoren im Vergleich zur Infektion ohne Kompetitoren graphisch dargestellt.

OP/Well	Infektion ohne Kompetitoren	Kompetition mit WT-Knob	Kompetition mit Heparin	Kompetition mit WT-Knob und Heparin
5,00E+09 bis 3,13E+08	13269938	1669893	251844	15264
% Reporterexpression	100%	12,50%	1,90%	0,12%

**Abb. 3.8:** Summen der RLUs im Verdünnungsbereich von  $5,00E+09$  bis  $3,13E+08$ . Die Summe der RLUs aus dem Ansatz ohne Kompetitoren wurde mit 100 % gleichgesetzt und die Ansätze mit Kompetitoren hierauf bezogen.



**Abb. 3.9:** Graphische Darstellung der Reporterexpression in Anwesenheit von Kompetitoren in % im Vergleich zur Infektion ohne Kompetitoren (= 100 %; nicht dargestellt).

### 3.10 Abkürzungen

Ad (Ads)	Adenovirus (Adenoviren)
Ad5	Adenovirus Subtyp5
Amp	Ampicillin
BSA	Rinderserumalbumin
CAR	Coxsackievirus und Adenovirus-Rezeptor
CHO	chinese hamster ovary cells
CPE	cytopathischer Effekt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FKS	Fötales Kälberserum
fw	forward
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
h-CAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cell
h-CASMC	Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell
HRP	Meerrettichperoxidase
HSPG	Heperansulfatproteoglykan
IU	infection units
kDa	Kilo Dalton
kb	Kilo Basenpaar
l	Liter
LB	Luria-Bertani
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MDa	Mega Dalton
ml	Milliliter
min	Minute
MSD	macromolecular structure database
NEB	New England Biolabs
NTA	nitriлотriacetic acid
OD	optische Dichte
OP	optische Partikel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PDB	protein data base
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pi	“post infection”
PNK	Polynukleotidkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	reverse
RLU	Relative Light Unit

s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
VP	virale Partikel

## 4. Ergebnisse

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit wurden alle im Rahmen von *in vitro*-Experimenten generiert. Hierzu wurden folgende Zelllinien eingesetzt:

CAR-positive Dauerzellen: HeLa-Zellen wurden verwendet, weil diese Zellen in einer großen Zahl von Ad-Infektionsstudien eingesetzt wurden. HepG2-Zellen waren aufgrund ihrer Herkunft interessant, weil die Leber das vornehmliche Organ der Aufnahme von Vektoren *in vivo* darstellt. Die Zelllinien HEK, 293T und 911 wurden mit einbezogen, weil sie als Helferzellen für die Vermehrung replikationsdefizienter Ad-Vektoren von grundsätzlicher Bedeutung sind. 911F-Zellen exprimieren stabil die Fiber und gehen auf 911-Zellen zurück; sie sind eine Helferzelllinie für die Herstellung genomisch fiberloser Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup>. Neben diesen in der Literatur als CAR-exprimierende Zellen beschriebenen Linien wurden CAR-negative CHO-Zellen charakterisiert, um die Rolle der HSPG in Abwesenheit der CAR-Interaktion zu charakterisieren. Bei A7r5-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte glatte Muskelzelllinie der Ratte, die zum Vergleich mit humanen glatten Muskelzellen herangezogen wurden, um eine mögliche artüberschreitende Rezeptorpräsenz zu charakterisieren. Primäre CASMC repräsentieren den Zielzelltypus für das Retargeting, in dessen Rahmen verschiedene potentiell für glatte Muskelzellen spezifische Peptide in den HI-Loop der adenoviralen Knobdomäne eingeführt wurden. Bei primären CAEC handelt es sich um Zellen, die im Rahmen einer vaskulären Therapie Kontakt zu den Ad-Vektoren haben und daher ebenfalls infiziert werden können, was in Abhängigkeit von der Therapie gewollt oder ungewollt sein kann. Im Kontext einer auf glatte Muskelzellen ausgerichteten Therapie ist eine Infektion von vaskulären Endothelzellen unerwünscht.

### 4.1 Der Einfluss der natürlichen Rezeptoren auf die Ad5 Infektion *in vitro*.

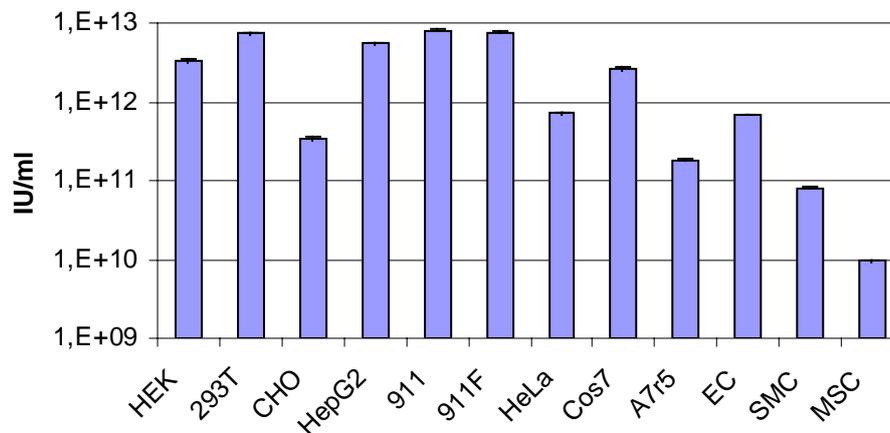
Der Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) und Heparansulfatproteoglykane (HSPG) sind natürliche Rezeptoren von Ad5. Der Einfluss dieser Rezeptoren auf die Ad5 Infektion ist für den Einsatz dieser Vektoren im Rahmen der Gentherapie von

grundsätzlicher Bedeutung. Daher ist eine genaue Kenntnis vom Zusammenspiel der verschiedenen infektionsvermittelnden Rezeptoren notwendig. Bislang existieren nur von wenigen Zelllinien Daten, die den kombinierten Einfluss beider natürlicher Rezeptoren beschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der singuläre und kombinierte Einfluss beider Rezeptoren auf die Infizierbarkeit unterschiedlicher Zelllinien untersucht und in *in vitro*-Kompetitionsexperimente mit löslichem Knob-Protein und Heparin durchgeführt. Zum einen kompetiert das lösliche Knob mit der Knobstruktur der Fiberproteine der Reporterviren, zum anderen kompetiert das HSPG-Analogon Heparin mit basischen Oberflächenstrukturen des viralen Kapsids. In beiden Fällen kommt es zu einem inhibitorischen Effekt der viralen Infektion.

### **4.1.1 Vergleich der Infizierbarkeit verschiedener Dauer- und Primärzellen mit Ad5.GFP mittels TCID-Bestimmung.**

Zunächst wurde die Infizierbarkeit verschiedener Dauerzellen und Primärzellen mit Ad5.GFP mittels der TCID-Bestimmung charakterisiert. Dieses Reportervirus exprimiert in infizierten Zellen GFP und ist mit einem wildtypischen Kapsid ausgestattet, so dass eine Infektion über die natürlichen Rezeptoren CAR und HSPG vermittelt wird. Hierzu wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und nach 24 – 48 h bei etwa 80 % konfluentem Zellrasen mit einer Verdünnungsreihe des Reportervirus infiziert. Der infektiöse Überstand wurde nicht abgenommen und verblieb bis zur fluoreszenzmikroskopischen Quantifizierung, 48 h pi, auf den Zellen. Der für die jeweilige Zelllinie infektiöse Titer (IU/ml) wurde nach der statistischen Kärber-Methode bestimmt (Abb. 4.1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

## TCID-Bestimmung mit Ad5.GFP



**Abb. 4.1:** Vergleich der Infizierbarkeit von Dauerzellen und Primärzellen mit Ad5.GFP anhand der TCID-Bestimmung. Die Zellen wurden 24 – 48 h vor Infektion in 96-Well-Platten ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz mit Verdünnungen von Ad5.GFP infiziert. 48 h pi erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung nach der Kärber-Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte der ermittelten viralen Titer (IU/ml) aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Ad5 zeigte gegenüber mesenchymalen Stammzellen (MSC) die geringste Infektiosität. Diese waren, im Vergleich zu den meisten CAR-exprimierenden Dauerzellen, um annähernd den Faktor  $10^3$  schlechter zu infizieren. Innerhalb der Gruppe der CAR-exprimierenden permanenten Zelllinien wurde eine Bandbreite in der Infizierbarkeit um etwa den Faktor 10 beobachtet, wobei HeLa-Zellen am schlechtesten und die Zelllinien 293T und 911 am effizientesten infizierbar waren. Die nicht CAR exprimierende Dauerzelllinie CHO war geringfügig schlechter zu infizieren als CAR-exprimierende HeLa-Zellen; beide unterschieden sich in der Infizierbarkeit etwa um den Faktor 2. Die CAR-exprimierenden primären EC zeigten eine Infizierbarkeit, die in etwa der von HeLa-Zellen entsprach, während primäre humane koronale glatte Muskelzellen (CASMC) um etwa den Faktor 10 schlechter zu infizieren waren als HeLa-Zellen bzw. den Faktor 100 im Vergleich zu 293T-Zellen und 911-Zellen. Im Vergleich zu CASMC zeigte die permanente glatte Muskelzelllinie der Ratte A7r5 eine vergleichbare Infizierbarkeit.

#### 4.1.2 Exposition verschiedener Dauerzellen und Primärzellen mit Ad5.Luc in einem therapeutisch relevanten Zeitfenster.

Im Rahmen der TCID-Bestimmungen wurde der infektiöse Überstand nicht abgenommen sondern verblieb bis zur Quantifizierung nach 48 h auf den Zellen. Im Unterschied dazu wurde hier die Infizierbarkeit der verschiedenen Zelllinien in einem therapeutisch relevanteren Zeitfenster charakterisiert. Hierzu wurden die Zellen in 24-Well-Platten Vortags ausgesät und 45 min mit Verdünnungen des Reportervirus Ad5.Luc 45 min infiziert. Ad5.Luc besitzt wie Ad5.GFP eine wildtypische Kapsidstruktur und unterscheidet sich lediglich in der Natur des exprimierten Reportergens. 48 h pi wurde die Reportergenexpression der einzelnen Verdünnungen im Luminometer gemessen und diejenige Verdünnung für die jeweilige Zelllinie bestimmt, bei der eine auf Reportergenexpression zurückzuführende Aktivität detektiert wurde, die sich vom Hintergrund durch etwa eine Verdoppelung der Lumineszenz unterschied (siehe spezielle Methoden 3.2.9). Der in den entsprechenden Wells eingesetzte Titer (OP) wurde dann auf die Anzahl der Zellen pro Well bezogen und in Abb. 4.2 als OP/Zelle dargestellt und spiegelt die relative Infizierbarkeit der verschiedenen Zelltypen untereinander wider.

Zelllinie	Zellen/cm <sup>2</sup>	OP/1,9 cm <sup>2</sup>	SD	OP/Zelle (relative Infizierbarkeit)
293T	5,27E+05	2,45E+06	1,87E+04	2
HEK	3,38E+05	4,89E+06	4,91E+04	8
CHO	1,69E+05	3,91E+07	3,33E+04	122
HepG2	2,59E+05	2,45E+06	3,29E+04	5
911	2,51E+05	1,23E+06	6,25E+04	3
911F	2,08E+05	1,23E+06	1,07E+04	3
HeLa	9,60E+04	9,78E+06	3,13E+04	54
Cos7	1,07E+05	2,45E+06	1,91E+04	12
A7r5	3,45E+04	9,78E+06	4,04E+03	150
CAEC	6,70E+04	4,89E+06	1,39E+04	38
CASMC	3,65E+04	1,96E+07	1,73E+03	283
MSC	3,17E+04	1,56E+08	1,19E+04	2593

**Abb. 4.2:** Vergleich der Infizierbarkeit von Dauerzellen und Primärzellen mit Ad5.Luc. Die Zellen wurden 24 – 48 h vor Infektion in 24-Well-Platten ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz mit Verdünnungen von Ad5.Luc 45 min infiziert. 48 h pi erfolgte die Messung der Reportergenexpression im Luminometer. Auf der Basis der Zellzahl wurde die Mindestanzahl von OP bestimmt, die zu einer detektierbaren Reportergenexpression der jeweiligen Zelllinie notwendig ist. Die dargestellten Partikelzahlen sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung (SD) ist angegeben.

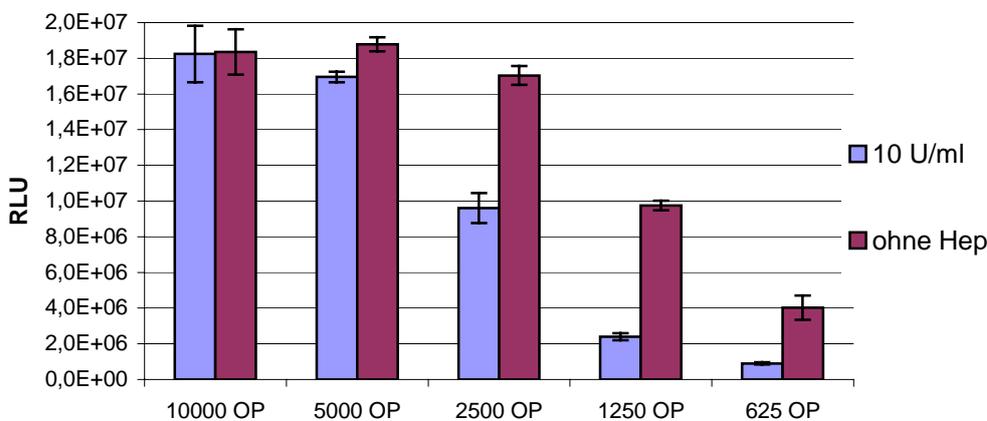
Innerhalb der Gruppe der CAR-exprimierenden Dauerzellen waren für die Infektion von 293T und der beiden 911-Linien 2 bzw. 3 OP/Zelle notwendig, um eine Reporterexpression in den entsprechenden Wells zu detektieren. Etwa die doppelte Anzahl an OP war zur messbaren Infektion von HepG2-Zellen nötig und 8 bzw. 12 OP für die Infektion von HEK-Zellen bzw. Cos7-Zellen. Dagegen waren für HeLa-Zellen mit 54 OP/Zelle wesentlich mehr virale Partikel für eine messbare Reporterexpression notwendig. Die ebenfalls CAR-exprimierenden primären humanen CAEC waren mit etwa 40 OP/Zelle genauso infizierbar wie HeLa-Zellen. Die nicht CAR-exprimierenden CHO-Zellen zeigten eine Reporterexpression bei 122 OP/Zelle und unterschieden sich in der Infizierbarkeit zu HeLa-Zellen lediglich um etwa den Faktor 2. Für eine messbare Infektion der permanenten Ratten-Muskelzelllinie A7r5 waren 150 OP/Zelle und für primäre humane CASMC etwa 300 OP/Zelle notwendig, was etwa der 100fachen Virusmenge entspricht, die für die Infektion der Linien 293T bzw. 911 notwendig war. Die etwa 1000fache Virusmenge war mit etwa 2600 OP/Zelle für die messbare Infektion von mesenchymalen Stammzellen (MSC) nötig, womit dieser Zelltyp von den getesteten am schlechtesten zu infizieren war. Die ermittelten Verhältnisse korrelieren mit den Ergebnissen der TCID-Bestimmung.

### **4.1.3 Einfluss von Heparinase auf die HSPG-vermittelte Ad5 Infektion**

Das Enzym Heparinase erkennt mit hoher Spezifität membranständige HSPG und spaltet diese. Adenoviren vom C-Typ interagieren über die mit Sulfatresten modifizierten Zuckergruppen dieser Glykoproteine und können (neben dem „klassischen“ Aufnahmemechanismus der CAR vermittelten Infektion) Zellen erfolgreich infizieren. Nach Inkubation von insbesondere CAR-defizienten Zellen mit Heparinase, sollte dieser Infektionsweg spezifisch inhibiert werden und in Form eines Rückgangs der Reporterexpression quantifizierbar sein. CHO-Zellen besitzen kein für CAR kodierendes Gen, weshalb sich diese Zelllinie besonders eignet, den Einfluss der HSPG auf die Infektion mit Ad5 zu charakterisieren. Die Zellen wurden 1 h vor Infektion mit dem Enzym Heparinase präinkubiert und anschließend mit Verdünnungen von Ad5.Luc infiziert und für 45 min inkubiert. Als Kontrolle wurden

Infektionen ohne vorherige Inkubation mit Heparinase durchgeführt. Die CHO-Zellen wurden 24 h vor dem Experiment in 24-Well-Platten ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz mit 10 bzw. 0 Units/ml Heparinase in Vollmedium (10 % FKS, 1 % Pen/Strep) 1 h inkubiert und danach mit Ad5.Luc 45 min infiziert. Der dabei eingesetzte virale Titer umfasste den Bereich von 625 - 10000 OP/Zelle. Die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 4.3 graphisch dargestellt.

### Einfluss von Heparinase auf die Ad5 Infektion von CHO



**Abb. 4.3:** Einfluss von Heparinase auf die Infizierbarkeit von CAR-defizienten CHO-Zellen mit Ad5.Luc. Die Zellen wurden Vortags in 24-Well-Platten ausgesät und mit 10 U/ml Heparinase bzw. ohne Heparinase (Kontrolle) 1 h inkubiert und anschließend mit Verdünnungen von Ad5.Luc 45 min infiziert. 48 h pi erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität (RLU). Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

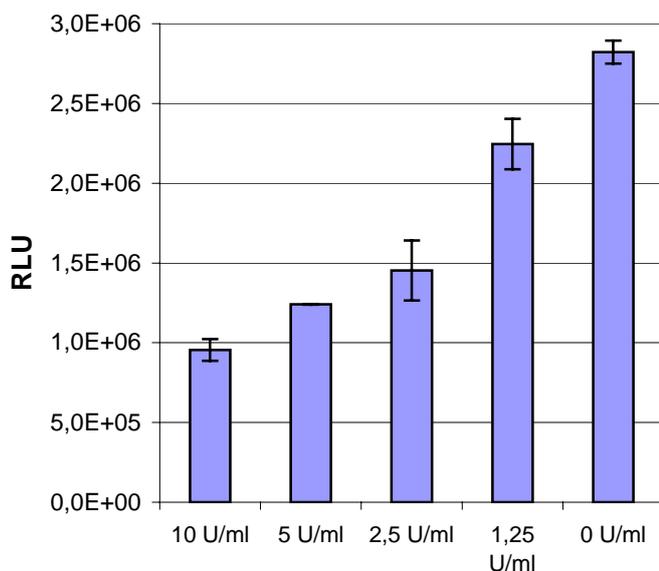
Die Ergebnisse zeigen, dass die Präinkubation von CHO-Zellen mit Heparinase zu einem signifikanten Rückgang der Transduktionseffizienz führt. Hierbei ist allerdings eine starke Abhängigkeit von der Anzahl der eingesetzten Reporterviren zu beobachten. Bei Infektion mit hohen Titern (10000 OP/Zelle) unterscheidet sich die Transduktionseffizienz bei Präinkubation mit Heparinase nicht mehr von der Transduktionseffizienz vom Kontrollansatz ohne Heparinase. Bei Infektion mit weniger Viren wird der Einfluss von Heparinase immer deutlicher, bis die Transduktionseffizienz im Ansatz mit den niedrigsten verwendeten Titern (625 OP/Zelle) nach Präinkubation mit Heparinase nur noch etwa 20 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht.

Wie in Abb. 4.2 dargestellt, sind mesenchymale Stammzellen und glatte Muskelzellen mit etwa 2600 OP/Zelle bzw. 300 OP/Zelle von allen untersuchten Zelltypen am schlechtesten zu infizieren. Daher konnte angenommen werden, dass

diese Zellen relativ wenige primäre Rezeptoren exprimieren und sich ein Einfluss der Heparinase auf die Infektion in diesen beiden Fällen stärker bemerkbar macht als beispielsweise bei den CAR-exprimierenden Zelllinien 911 bzw. 293T. Die Experimente mit CHO-Zellen haben gezeigt, dass der Einfluss der Heparinase in denjenigen Ansätzen am deutlichsten war, die mit weniger Virus inkubiert wurden. Bezogen auf die „relative Infizierbarkeit“ in Tabelle der Abb. 4.2 entsprachen die 625 bzw. 1250 OP, welche für die Infektion von CHO-Zellen eingesetzt wurden, einem Faktor 5 bzw. 10. Für die Infektion von CASMC wurden 2000 OP/Zelle eingesetzt, was in Anlehnung an Abb. 4.2 einem Faktor von etwa 7 entsprach. Für die Infektion der MSC wurden 4000 OP/Zelle verwendet, was einem Faktor von etwa 2 entsprach. CASMC und MSC wurden 48 h vor Versuchsbeginn in 24-Well-Platten ausgesät und etwa 75 % konfluente Zellrasen in 5 parallelen Versuchsreihen mit 10, 5, 2,5, 1,25 bzw. 0 Units/ml Heparinase in Vollmedium 1 h inkubiert, und anschließend mit 2000 bzw. 4000 OP/Zelle Ad5.Luc infiziert und für 45 min inkubiert. Als Kontrolle wurden Infektionen ohne vorherige Inkubation mit Heparinase durchgeführt. Die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 4.4 graphisch dargestellt.

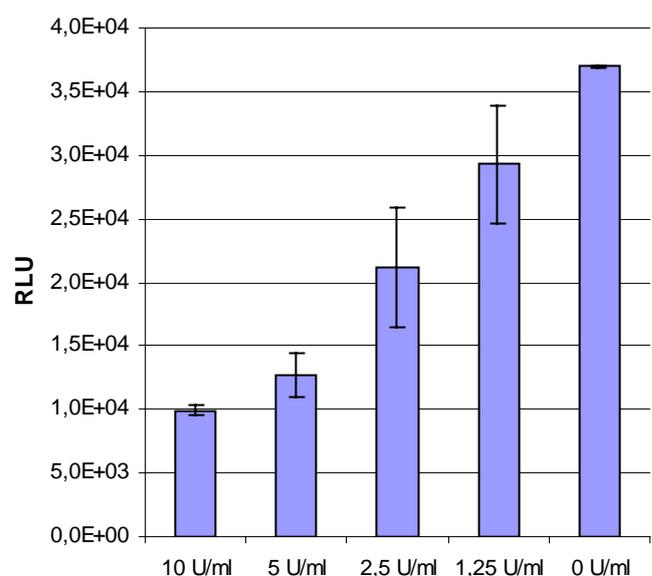
A

**Einfluss von Heparinase auf die Ad5 Infektion von CASMC**



B

**Einfluss von Heparinase auf die Ad5 Infektion von MSC**



**Abb. 4.4:** Einfluss von Heparinase auf die auf die Infizierbarkeit von Primärzellen mit geringer CAR-Expression mit Ad5.Luc. CASMC (A) und MSC (B) wurden 48 h vor Infektion in 24-Well-Platten ausgesät und parallel mit 10, 5, 2,5 und 1,25 U/ml Heparinase für 1 h inkubiert und anschließend mit Ad5.Luc 1 h infiziert (CASMC: 2000 OP/Zelle; MSC: 4000 OP/Zelle). 48 h pi erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität (RLU). Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten.

Die Präinkubation von CASMC und MSC mit Heparinase führte in beiden Fällen zu einem signifikanten Rückgang der Reporterexpression. Hierbei korrelierte der Rückgang der Reporterexpression mit der Konzentration an Heparinase. Beide Zelllinien unterschieden sich zwar in den absoluten Lumineszenzwerten um etwa den Faktor 100, zeigten aber ungeachtet dessen ein nahezu identisches Muster, was den Einfluss der eingesetzten Heparinase-Konzentrationen von 0 – 10 U/ml auf die Reporterexpression betrifft. So führte die Inkubation mit 10 U/ml Heparinase bei CASMC zu einer Reduktion der Reporterexpression auf etwa 30 % und bei MSC auf etwa 25 % relativ zur Infektion ohne Präinkubation mit Enzym. Diese Ergebnisse zeigen, dass die gentherapeutisch interessanten Zellen CASMC und MSC, trotz ihrer im Vergleich zu den CAR-positiven Dauerzellen schlechten Infizierbarkeit, HSPG exprimieren, die von Ad5 zur Infektion genutzt werden.

#### **4.1.4 Konkurrenzexperimente mit löslichem Knob und Heparin**

Im folgenden wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, in deren Rahmen zum einen die Zellen mit löslichem wildtypischen Knob-Protein präinkubiert wurden, um die freien CAR Bindungsstellen abzusättigen, und zum anderen die Reporterviren mit dem löslichen HSPG-Analogen Heparin präinkubiert wurden, um die für die Interaktion mit den HSPG verantwortlichen viralen Kapsidstrukturen abzusättigen. Die verschiedenen Zelllinien wurden in jeweils 4 parallelen Ansätzen folgendermaßen für 45 min mit den Reporterviren inkubiert:

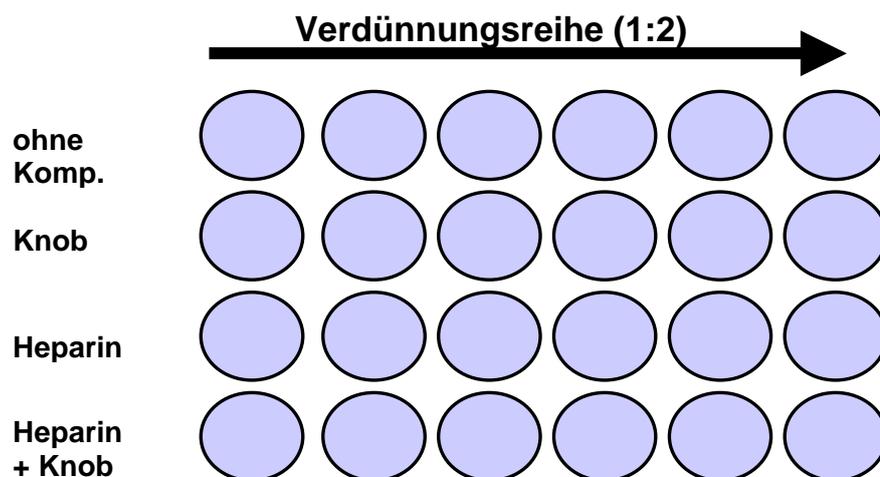
- ohne Kompetitoren,
- nur mit Knob-Protein
- nur mit Heparin
- in Anwesenheit beider Kompetitoren.

Die für eine nahezu vollständige Inhibition der Rezeptorinteraktion notwendigen Konzentrationen an Knob-Protein und Heparin wurden in entsprechenden Vorexperimenten ermittelt und diese Parameter auf alle untersuchten Zelllinien angewendet. Die Zellen wurden 20 min vor Infektion mit 100 µg Knob-Protein pro Well und die Reporterviren 60 min vor Infektion mit 20 µg/ml Heparin präinkubiert. Als Reporterviren wurden Ad5.Luc und Ad5.GFP eingesetzt.

Mit beiden Reporterviren wurden die gleichen Ergebnisse im Hinblick auf den kompetitiven Effekt von Knob und Heparin erzielt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Rezeptoren im Rahmen des natürlichen Infektionsverlaufes *in vitro* eine wesentliche Rolle spielen und in Anwesenheit beider Kompetitoren im Prinzip keine Infektion mehr stattfindet (Abb. 4.6). Hieraus kann geschlossen werden, dass keine weiteren primären Rezeptoren von Ad5 effektiv genutzt werden. Neben dieser Beobachtung diene das hier etablierte „2-Komponenten-Kompetitionssystem“ als Basis zur Charakterisierung von Kapsidmodifikationen insbesondere im Rahmen des Retargetings (siehe 4.3). Mit Hilfe dieses Kompetitionssystems können auch kleine Effekte auf die Infektiosität durch die Einführung kurzer Peptide detektiert werden, welche bei gleichzeitigem Vorhandensein natürlicher adenoviraler Rezeptoren möglicherweise nicht detektierbar wären.

#### 4.1.4.1 Ad5.Luc-Kompetitionsexperimente

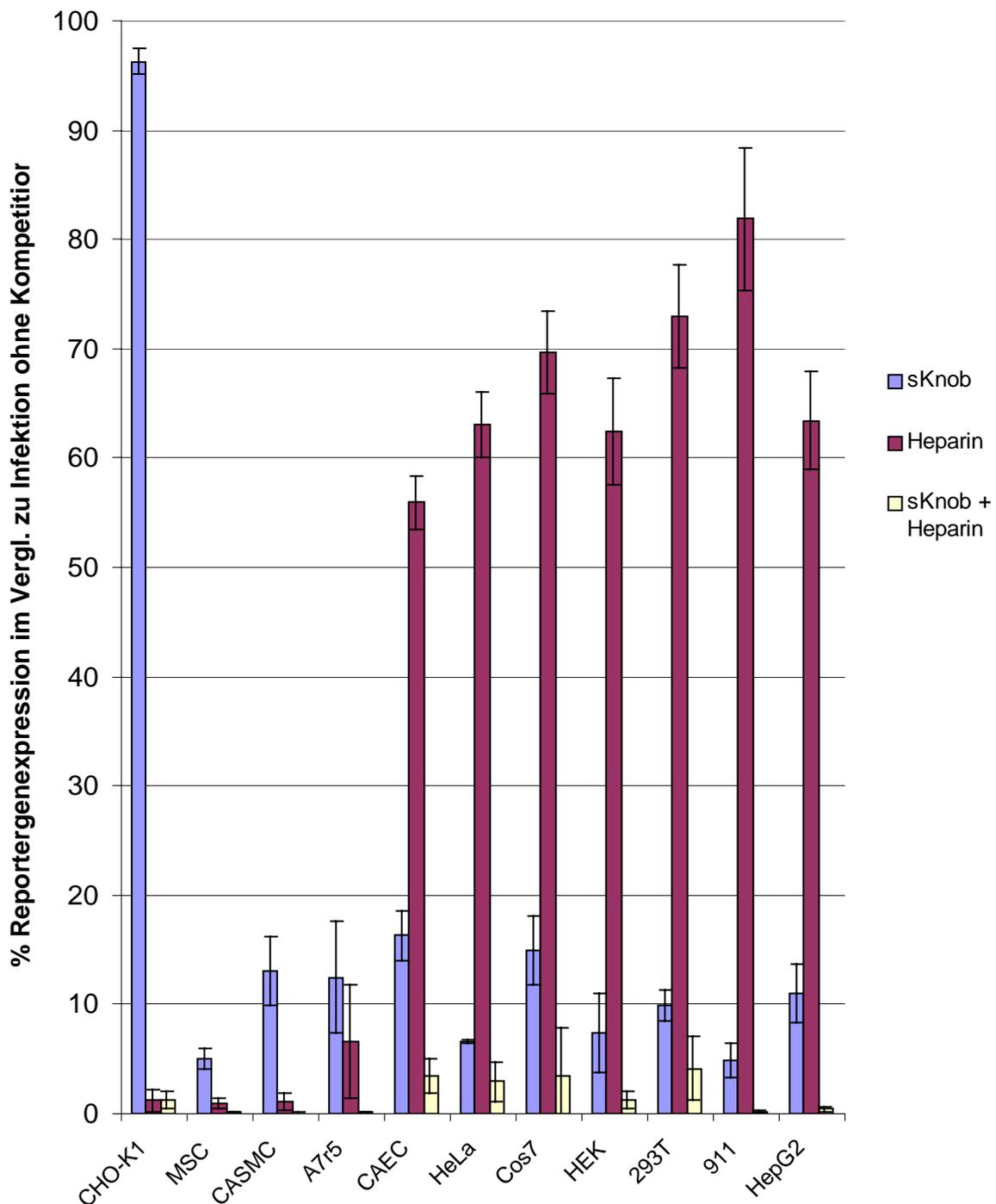
Die Zellen wurden am Tag vor dem Experiment in 24-Well-Platten so ausgesät, dass die Zellrasen zum Zeitpunkt des Experiments eine Konfluenz von etwa 80 % hatten. Die Infektion erfolgte 45 min in Verdünnungsreihen, die bei allen verwendeten Zellen von max. Sättigung bis zur Nachweisgrenze, der zur Infektion in Abwesenheit von Kompetitoren notwendigen Anzahl viraler Partikel, reichte (Abb. 4.5). Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte 48 h nach Infektion.



**Abb. 4.5:** Aufteilung der Gewebekulturplatten (24-Well) für die Kompetitionsexperimente mit Virusverdünnungsreihen von Ad5.Luc in An- und Abwesenheit von Kompetitoren. (ohne Kompetition, Kompetition mit Knob, Kompetition mit Heparin und Kompetition mit Heparin und Knob)

Zwischen max. Sättigung und der Nachweisgrenze war in jedem Fall mit zunehmender Virusverdünnung eine lineare Abnahme in der detektierten Reporterexpression zu beobachten. Die RLUs derjenigen Ansätze wurde addiert, die mit zunehmender Virusverdünnung eine solche lineare Abnahme in der Reporterexpression zeigten. Exemplarisch sind für ein entsprechendes Experiment mit glatten Muskelzellen die Messergebnisse der einzelnen Verdünnungsstufen im Abschnitt spezielle Methoden 3.9.6 graphisch dargestellt. Die Summe der RLUs aus den Ansätzen ohne Kompetitoren wurde mit 100 % gleichgesetzt und die Summe der RLUs aus den Ansätzen mit Kompetitoren darauf bezogen. In Abb. 4.6 sind die normalisierten Ergebnisse der verschiedenen Zelllinien in einer Graphik zusammengefasst und im Anhang 7.IV sind die normalisierten Ergebnisse für die verschiedenen Zelllinien im Einzelnen aufgelistet. Die dargestellten Ergebnisse sind die jeweiligen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

### Kompetitiver Effekt von Knob und Heparin auf die Ad5.Luc Infektiösität *in-vitro*



**Abb. 4.6:** Einfluss der Kompetitoren Knob und Heparin auf die Infektion verschiedener Dauerzellen und Primärzellen mit Ad5.Luc. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und in Verdünnungsreihen mit Ad5.Luc in Gegenwart von Kompetitoren und ohne Kompetitoren für 45 min infiziert. 48 h pi erfolgte die Messung der Luziferase-Aktivität. Die RLUs derjenigen Ansätze wurde addiert, die mit zunehmender Virusverdünnung eine lineare Abnahme in der Reporterexpression zeigen. Die resultierenden RLUs aus den Ansätzen mit Kompetitoren wurden dann durch die RLUs aus den Ansätzen ohne Kompetitoren dividiert und als Prozent der Reporterexpression in Anwesenheit der Kompetitoren dargestellt. Die gezeigten Daten sind das Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten.

*CHO*: Die Anwesenheit von Knob hatte bei diesem CAR-defizienten Zelltyp keinen Einfluss auf die Effizienz der Infizierbarkeit mit Ad5.Luc. Im Gegensatz dazu führte die Präinkubation der Reporterviren mit Heparin zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Reporterexpression von 99 %. Das gleiche Ergebnis ergab die simultane Konkurrenz mit Knob und Heparin.

*MSC*: Die erfolgreiche Infektion dieses Stammzelltyps mit Ad5 war in Gegenwart von Knob erheblich inhibiert. Die Reporterexpression sank im Vergleich zur Infektion ohne Konkurrenten auf etwa 5 %. In Gegenwart von Heparin ging die Reporterexpression auf etwa 1 % und in Anwesenheit beider Konkurrenten auf 0,1 – 0,2 % zurück.

*CASMC*: Bei einer Infektion primärer humaner glatter Muskelzellen in Anwesenheit von Knob kam es zu einer Reduktion der Reporterexpression auf etwa 12 %, im Vergleich zur Infektion ohne Konkurrenten. In Gegenwart von Heparin ging die Reporterexpression auf weniger als 1 % zurück. Die Verwendung beider Konkurrenten führte auch hier zu einer nahezu vollständigen Reduktion der Reporterexpression im Promillebereich.

*A7r5*: Diese permanente Muskelzelllinie aus der Ratte zeigte ein ähnliches Profil im Konkurrenzverhalten wie primäre CASMC. Die Anwesenheit von Knob führte zu einem Rückgang auf etwa 12 % und die Doppelkonkurrenz zu einer nahezu vollständigen Reduktion der Reporterexpression. Im Unterschied zu CASMC führte die Konkurrenz mit Heparin zu einem Rückgang der Reporterexpression auf etwa 6 %.

*CAEC*: Die Infektion primärer Endothelzellen in Anwesenheit von Knob führte zu einer Reduktion der Reporterexpression auf etwa 18 %. Die Konkurrenz mit Heparin führte zu einem weniger starken Rückgang auf etwa 55 %. Erst die Konkurrenz mit Knob und Heparin zusammen führte zu einem Rückgang der Reporterexpression auf etwa 3 %.

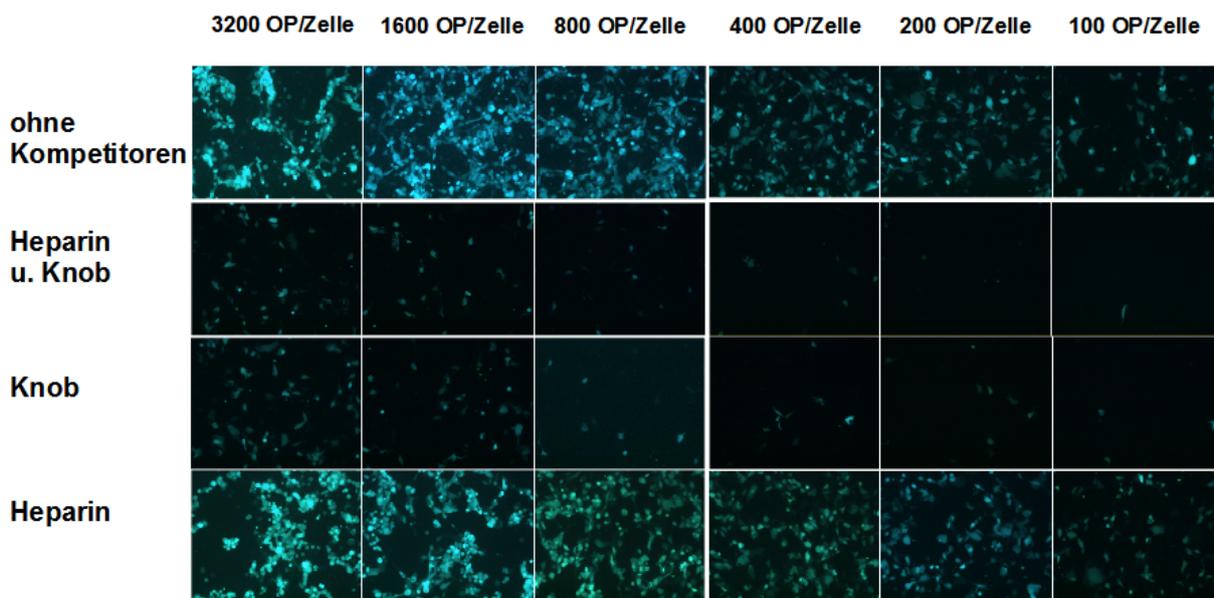
*CAR-exprimierende permanente Zellen*: Diese Gruppe zeigte in ihrem Konkurrenzverhalten ein recht homogenes Bild. Die Anwesenheit von Knob führte zu einem Rückgang der Reporterexpression auf etwa 5 % bei 911-Zellen bis 15 % im Falle von Cos7-Zellen. Der Rückgang der Reporterexpression war dagegen bei der Konkurrenz mit Heparin weniger stark ausgeprägt und ging auf etwa 60 % (HEK-Zellen) bis 80 % (911-Zellen) zurück. Die Anwesenheit beider Konkurrenten

reduzierte die Reporterexpression auf etwa 5 % bei Cos7-Zellen bis in den Promillebereich bei 911-Zellen bzw. HepG2-Zellen.

#### 4.1.4.2 Ad5.GFP-Kompetitionsexperimente

Die Ergebnisse aus den Kompetitionsexperimenten mit Ad5.Luc wurden exemplarisch mit Ad5.GFP bestätigt. Hierzu wurden 911-Zellen mit einer Verdünnungsreihe von 3200 OP/Zelle bis 100 OP/Zelle in An- und Abwesenheit der Kompetitoren 45 min infiziert und die resultierende GFP-Expression 48 h pi fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und dokumentiert (Abb. 4.7).

#### Infektion von 911 mit Verdünnungsreihe Ad5.GFP +/- Kompetitoren



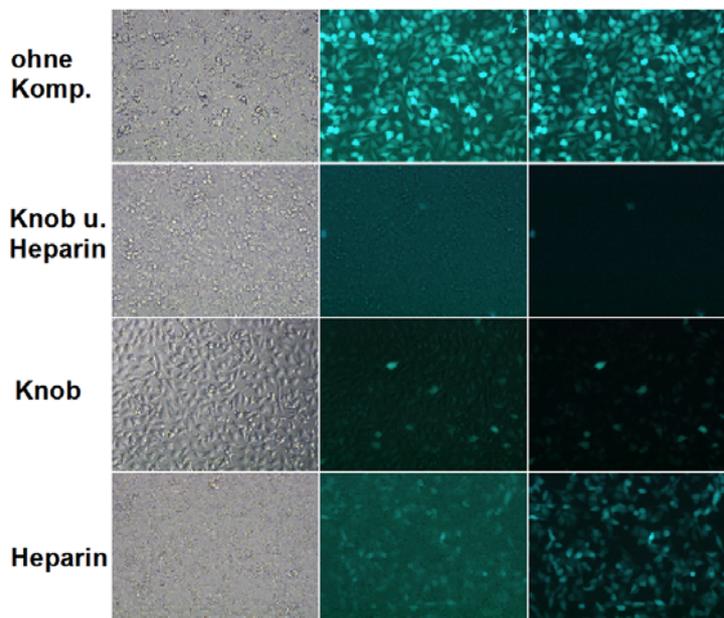
**Abb. 4.7:** Einfluss der Kompetitoren Knob und Heparin auf die Infektion von 911-Zellen mit Ad5.GFP. Die Zellen wurden Vortags in 24-Well-Platten ausgesät und mit einer Verdünnungsreihe von 3200 bis 100 OP/Zelle in Gegenwart von Kompetitoren und ohne Kompetitoren 45 min infiziert. 48 h pi wurde die GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert. Vergrößerung 40 x.

Die Infektion ohne Kompetition zeigte bei 3200 OP/Zelle einen cytotoxischen Effekt in Form von Ablösen der adherenten Zellen vom Boden der Wells. Erst ab einer Partikelzahl zwischen 1600 und 800 exprimierten nahezu alle Zellen GFP ohne augenfälligen Einfluss auf die Zellmorphologie. Bei einer Partikelzahl von 100 exprimierten noch etwa 15 –20 % der Zellen das Reporterogen. Die Ansätze mit Heparin zeigten das gleiche Expressionsmuster. Die Anwesenheit dieses

Kompetitors erzeugte kaum einen inhibitorischen Effekt und war vergleichbar mit dem Ergebnis, welches ohne Kompetitoren erzielt wurde. Dagegen wurde durch die Konkurrenz mit Knob die Zahl GFP-positiver Zellen erheblich reduziert. Der 3200 OP/Zelle enthaltende Ansatz entsprach denen mit 100 OP/Zelle aus den Ansätzen ohne Kompetitoren bzw. in Anwesenheit von Heparin (= Faktor 32). Die gleichzeitige Konkurrenz mit Knob und Heparin verstärkte den durch Knob alleine erzeugten inhibitorischen Effekt nur noch geringfügig. Die Ergebnisse aus den Konkurrenzexperimenten mit Ad5.Luc konnten somit mittels Ad5.GFP an der Zelllinie 911 exemplarisch bestätigt werden.

Als weitere CAR-positive Zelllinie wurden HeLa mit 1000 OP/Zelle in An- und Abwesenheit von Kompetitoren 45 min infiziert und die resultierende GFP-Expression nach 48 h fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und dokumentiert (Abb. 4.8). Bei Infektion in Abwesenheit von Kompetitoren exprimierten etwa 90 % der Zellen GFP. In Anwesenheit von Heparin zeigten etwa 50 % der Zellen GFP-Expression. Die Präsenz von Knob führte zu etwa 10 – 15 % und das Vorhandensein beider Kompetitoren zu weniger als 1 % GFP-positiver Zellen.

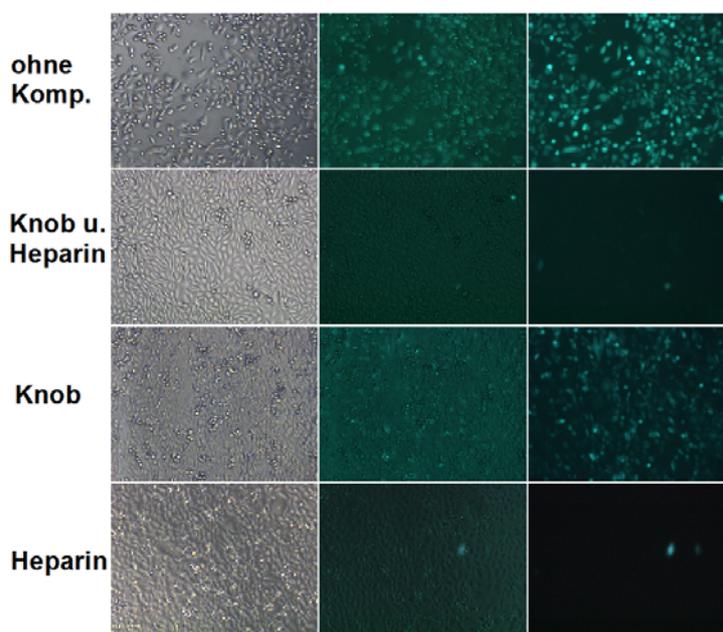
#### Infektion von HeLa mit Ad5.GFP +/- Kompetitoren



**Abb. 4.8:** Einfluss der Kompetitoren Knob und Heparin auf die Infektion von HeLa-Zellen mit Ad5.GFP. Die Zellen wurden Vortags in 24-Well-Platten ausgesät und mit 1000 OP/Zelle in Gegenwart von Kompetitoren und ohne Kompetitoren 45 min infiziert. 48 h pi wurde die GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert. Linke Spalte: Durchlicht; mittlere Spalte: überlagert; rechte Spalte: Fluoreszenz (GFP-Filter), Belichtung 10 Sek. Vergrößerung 40 x.

Entsprechend wurde die CAR-negative Zelllinie CHO mit 2000 OP/Zelle in An- und Abwesenheit von Kompetitoren 45 min infiziert und die resultierende GFP-Expression nach 48 h fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und dokumentiert (Abb. 4.9). Bei Infektion in Abwesenheit von Kompetitoren exprimierten etwa 90 % der Zellen GFP. In Anwesenheit von Heparin zeigten weniger als 1 % der Zellen GFP-Expression. Im Gegensatz dazu zeigte die Konkurrenz mit Knob, wie zu erwarten, keinen Effekt.

#### Infektion von CHO mit Ad5.GFP +/- Kompetitoren



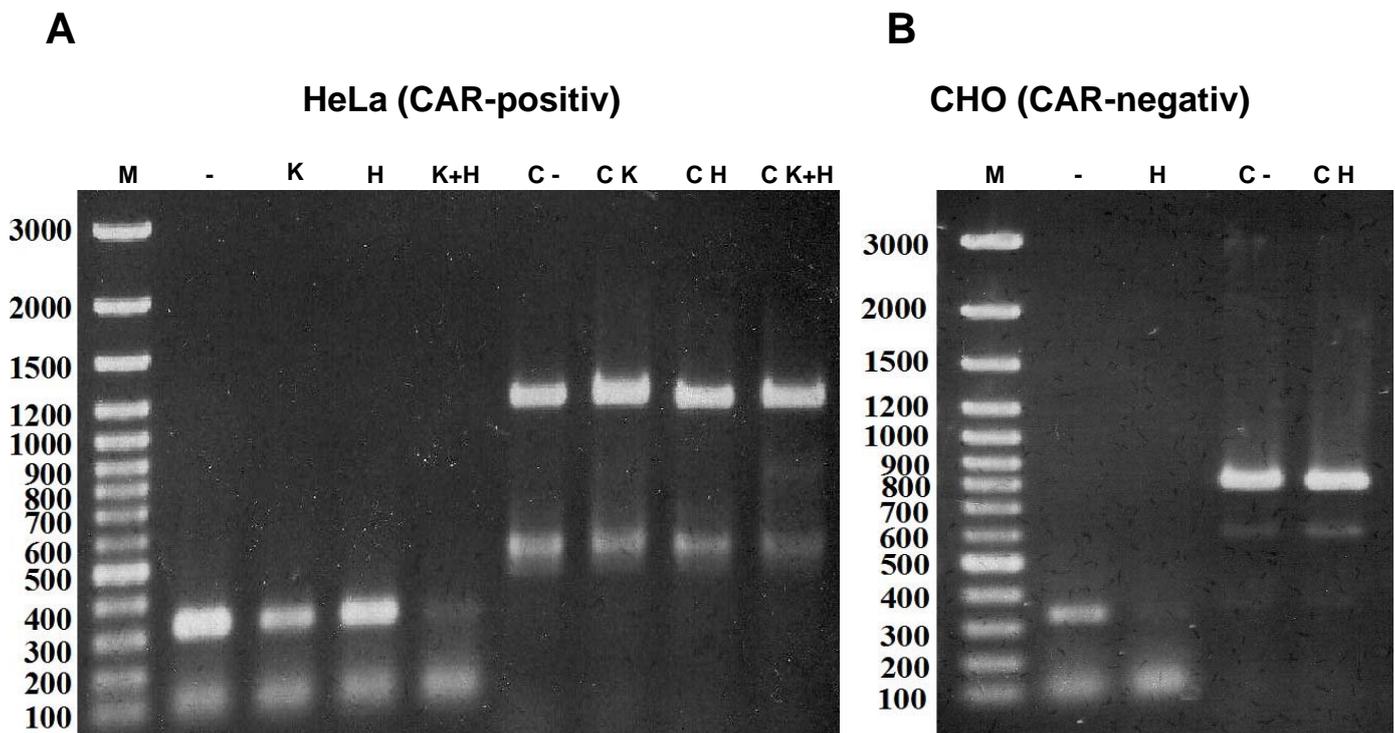
**Abb. 4.9:** Einfluss der Kompetitoren Knob und Heparin auf die Infektion von CHO-Zellen mit Ad5.GFP. Die Zellen wurden Vortags in 24-Well-Platten ausgesät und mit 2000 OP/Zelle in Gegenwart von Kompetitoren und ohne Kompetitoren 45 min infiziert. 48 h pi wurde die GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert. Linke Spalte: Durchlicht; mittlere Spalte: überlagert; rechte Spalte: Fluoreszenz (GFP-Filter), Belichtung 10 Sek. Vergrößerung 10 x.

Somit war es möglich mittels der beiden Reporterviren Ad5.Luc und Ad5.GFP den Einfluss von CAR und HSPG auf die Infizierbarkeit *in vitro* zu dokumentieren. Dabei konnte demonstriert werden, dass keine effizienten weiteren primären Rezeptoren bei den getesteten Zelllinien existieren und ein entsprechend ablatiertes Virus im Vergleich zum Wildtyp im Prinzip nicht mehr infektiös ist.

#### **4.1.5 Semiquantitative Bestimmung der Ad5 DNA nach Internalisierung in An- und Abwesenheit von Kompetitoren**

Ein wesentliches Augenmerk dieser Arbeit liegt in der Manipulation der Interaktionen von Ad5 mit seinen natürlichen Rezeptoren. Die daraus resultierenden Konsequenzen auf die Infektiosität wurden oben in Form von Messungen der Reporter-genaktivität erfasst. Die Reporter-genexpression im Kern der infizierten Zelle selbst ist aber das Ergebnis einer Folge von Ereignissen, die der Wechselwirkung mit den Rezeptoren nachgeschaltet ist und daher von weiteren Faktoren beeinflusst sein kann. Aus diesem Grund wurde mittels PCR die Menge an Ad5 DNA in den infizierten Zellen unmittelbar nach Infektion in An- und Abwesenheit von Kompetitoren bestimmt, um zu klären ob der Einfluss auf die Reporter-genexpression mit der internalisierten Menge an Ad korreliert.

Hierzu wurden CAR-positive HeLa-Zellen und CAR-negative CHO-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag bei 80 % Konfluenz mit 1000 OP 20 min mit Ad5.Luc infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, um die nicht gebundenen Viren weitestgehend zu entfernen. Dann wurden die Zellen trypsinisiert um gebundene, nicht internalisierte Viren zu entfernen und wieder gewaschen. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen und die Überstände als Template in einer PCR eingesetzt. Mit Fiber-spezifischen Primern, die ein etwa 350 bp-Fragment des Fibergens amplifizieren und Kontrollprimern, die ein etwa 1,2 kb-Fragment auf dem humanen X-Chromosom amplifizieren bzw. ein etwa 800 bp-Fragment aus der chromosomalen DNA von CHO-Zellen amplifizieren, wurde der DNA-Gehalt bestimmt (3.9.5). Bei chromosomaler HeLa-DNA als auch bei chromosomaler CHO-DNA zeigen die Kontrollbanden in etwa die gleiche Intensität, was für eine gleiche Anzahl jeweils eingesetzter Zellen spricht (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10:** Quantifizierung von Ad-DNA unmittelbar nach Internalisierung in An- und Abwesenheit von Kompetitoren in HeLa-Zellen (A) und CHO-Zellen (B). Nach 20 min Inkubation mit 1000 OP/Zelle Ad5.Luc wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert, anschließend aufgeschlossen und der DNA-Gehalt im ÜS mittels PCR bestimmt. Hierzu wurden Fiber-spezifische Primer, die ein etwa 350 bp-Fragment amplifizieren und Kontrollprimer, die ein etwa 1,3 kb-Fragment vom humanen X-Chromosom (in A) bzw. ein etwa 900 bp-Fragment vom Genom von CHO-Zellen amplifizieren (in B), eingesetzt. Dargestellt sind die entsprechenden Banden im 1 % Agarosegel. A: (M) 100 bp Ladder+; (-) ohne Kompetitoren; (K) Konkurrenz mit Knob; (H) Konkurrenz mit Heparin; (K+H) Konkurrenz mit Knob und Heparin; (C-) Kontrolle zu -; (CK) Kontrolle zu K; (CH) Kontrolle zu H; (CK+H) Kontrolle zu K+H. B: (M) 100 bp Ladder+; (-) ohne Kompetitoren; (H) Konkurrenz mit Heparin; (C-) Kontrolle zu -; (CH) Kontrolle zu H.

Wie erwartet war der adenovirale DNA-Gehalt in HeLa-Zellen und CHO-Zellen in den Ansätzen am größten, die in Abwesenheit von Kompetitoren infiziert wurden.

Die Infektion von HeLa-Zellen in Anwesenheit von Heparin führte zu einer Abnahme der Virus-DNA in den Zellen, die im Hinblick auf die Banden-Intensität etwa einem Faktor 2 entsprach. Dies entspräche einem Rückgang der Transduktionseffizienz von HeLa-Zellen bei Inhibition der HSPG-Interaktion von etwa 50 %. Im Vergleich dazu war die auf Knob-Konkurrenz zurückgehende Bande deutlich schwächer und sehr schwach war die auf Doppel-Konkurrenz basierende Bande.

Im Falle von CHO-Zellen wurden nur zwei Ansätze mit und ohne Heparin untersucht, da die Infektion dieses Zelltyps, wie bereits gezeigt wurde, nicht mit Knob inhibierbar ist. Die Infektion in Abwesenheit von Heparin resultierte in einer deutlichen Fiber-spezifischen Bande, die aber weniger intensiv war als die entsprechende Bande aus dem Ansatz mit HeLa-Zellen. Die Anwesenheit von Heparin resultierte in einer sehr

schwachen, fast nicht mehr sichtbaren Fiber-spezifischen Bande. Eine signifikante unspezifische, nicht über die Reporterengenquantifizierung erfassbare Virusaufnahme konnte nicht festgestellt werden.

## **4.2 Modifikation von Kontaktaminosäuren für die Interaktion mit CAR innerhalb der Knobdomäne (Detargeting)**

Der Einsatz von Ad5 als spezifischer Vektor in der Gentherapie wird durch die ubiquitäre Präsenz der primären Rezeptoren limitiert. Daher ist es im Rahmen des Vektordesigns eine zwingende Voraussetzung, die damit verbundene unspezifische Virusaufnahme zu inhibieren bzw. durch Modifikation der Interaktionsbereiche weitestgehend aufzuheben (Detargeting). Die Affinität der Knobdomäne von Ad5 zu CAR wird durch den Austausch verschiedener Aminosäuren unterschiedlich stark herabgesetzt. Es wurden hier verschiedene Kombinationen von Aminosäure-Austauschen mit dem Ziel vorgenommen, diejenige Kombination zu identifizieren, welche die Affinität zu CAR am weitest gehenden verloren hat. Hierzu wurden die Modifikationen zunächst mittels zielgerichteter Mutagenese in die lösliche Form des Knob-Proteins eingeführt und in Konkurrenzexperimenten mit den kompetitiven Eigenschaften der wildtypischen Form des löslichen Knob-Proteins *in vitro* verglichen. Im nächsten Schritt wurden ausgewählte Kombinationen an Austauschen in Fibern von Reporterviren eingefügt und die Infektiosität dieser modifizierten Viren mit der von Reporterviren mit wildtypischen Fibern verglichen.

### **4.2.1 Konkurrenzexperimente mit modifiziertem löslichen Knob-Protein**

In den Konkurrenzexperimenten im Abschnitt 4.1 wurde lösliches wildtypisches Knob-Protein als Kompetitor der CAR-vermittelten Infektion von Ad5 verwendet. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden verschiedene Knobmutanten generiert, die sich in Anzahl und Kombination der Aminosäure-Austausche unterschieden. Die rekombinanten Knob-Proteine wurden bakteriell exprimiert und mittels Nickel-NTA über einen N-terminal exprimierten HisTag aufgereinigt. Die Integrität der

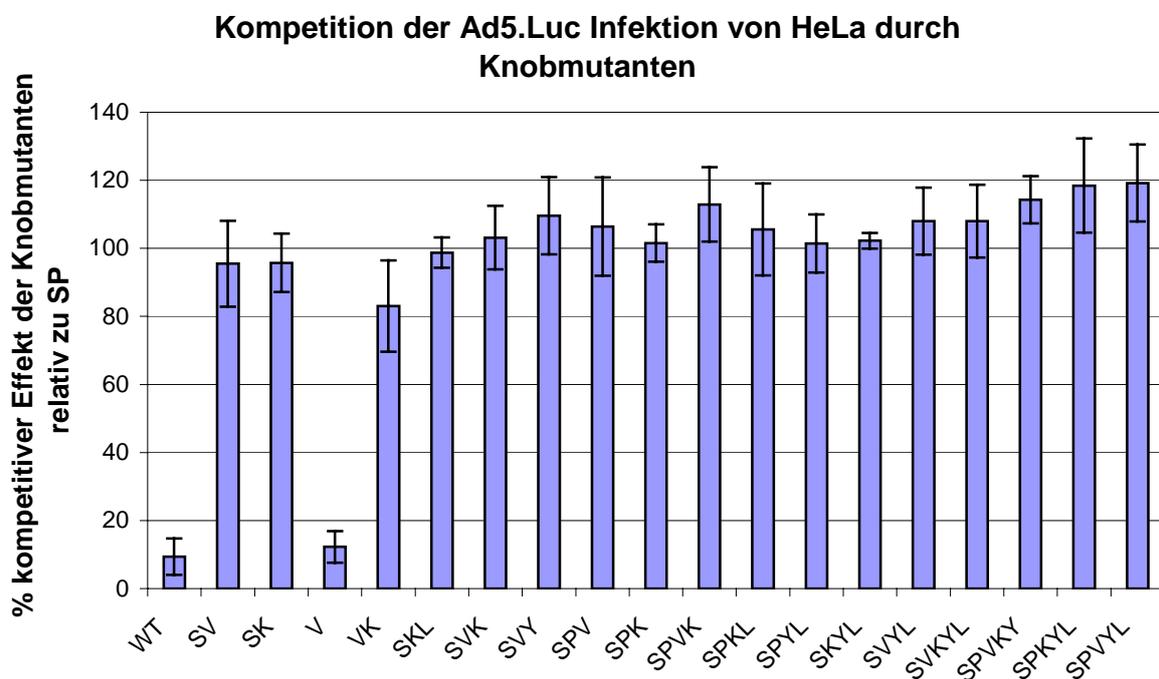
homotrimeren Struktur der modifizierten Knob-Proteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Austausch von bis zu 6 Aminosäuren möglich ist, ohne die spontane Ausbildung der homotrimeren Form zu stören (siehe 3.6.2). Dagegen zeigten die Ergebnisse meiner Diplomarbeit 2003, dass sich die Deletion einzelner Aminosäuren wie V441 oder K442 negativ auf die Trimerisierung auswirkt, da die Monomere der Fibern nicht in die Kapside während des Assemblierung inkorporiert werden. Aus diesem Grund wurden hier anstelle der Deletion, diese Aminosäuren gegen solche mit anderen Eigenschaften ausgetauscht. In Abb. 4.11 sind die trimersisierenden Knobmutanten aufgelistet. Die Benennung erfolgte nach den modifizierten Aminosäuren und entspricht der 1-Buchstaben-Nomenklatur.

Knobmutante	Modifikationen
SP	S408E/P409A
SV	S408E/V441T
SK	S408E/K442E
V	V441T
VK	V441I/K442D
SKL	S408E/K442E/L485K
SVK	S408E/V441I/K442D
SVY	S408E/V441T/Y477A
SPV	S408E/P409A/V441T
SPK	S408E/P409A/K442E
SPVK	S408E/P409A/V441I/K442D
SPKL	S408E/P409A/K442E/L485K
SPYL	S408E/P409A/Y477A/L485K
SKYL	S408E/K442E/Y477A/L485K
SVYL	S408E/V441T/Y477A/L485K
SVKYL	S408E/V441I/K442D/Y477A/L485K
SPVKY	S408E/P409A/V441I/K442DY/477A
SPKYL	S408E/P409A/K442E/Y477A/L485K
SPVYL	S408E/P409A/V441T/Y477A/L485K

**Abb. 4.11:** Auflistung der generierten trimersisierenden Knobmutanten in tabellarischer Form.

Im Rahmen der Konkurrenzexperimente wurden HeLa-Zellen Vortags in 24-Well-Platten ausgesät und bei etwa 80 % Konfluenz je Well mit 100 µg/250 µl der verschiedenen Knobmutanten 20 min inkubiert und anschließend mit 5000 OP/Zelle

45 min mit Ad5.Luc infiziert. Die Messung der Reporterexpression erfolgte 48 h nach Infektion am Luminometer. Die aus den Konkurrenzexperimenten resultierenden RLU wurden auf eine Infektion mit Ad5.Luc normalisiert, welche mit der SP-Knobmutante kompetiert wurde. Eine Konkurrenz mit SP-Knob entspricht dabei 100%. Die SP-Mutante wurde auf Grundlage der Ergebnisse meiner Diplomarbeit 2003 als Bezugsgröße verwendet, weil diese Kombination, von den dort getesteten, die Interaktion mit CAR am weitestgehenden herabsetzte. In Abb. 4.12 sind die normalisierten Ergebnisse dargestellt.



**Abb. 4.12:** Die Abbildung zeigt das Ergebnis von zwei Konkurrenzexperimenten mit Wildtyp-Knob und Knobmutanten auf HeLa-Zellen. Die Konkurrenz erfolgte mit 100 µg Knob-Protein/Well und die Infektion mit Reportervirus mit 5000 OP. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Knob-Proteine angegeben. Die jeweiligen Bezeichnungen entsprechen den eingefügten Mutationen. Die dargestellten Balken sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchsansätzen. Die Werte wurden alle auf die Konkurrenz mit der SP-Mutante normalisiert, welche auf 100 % gesetzt wurde. Die Standardabweichung ist angegeben. Die Y-Achse zeigt die im Luminometer gemessenen RLU-Werte.

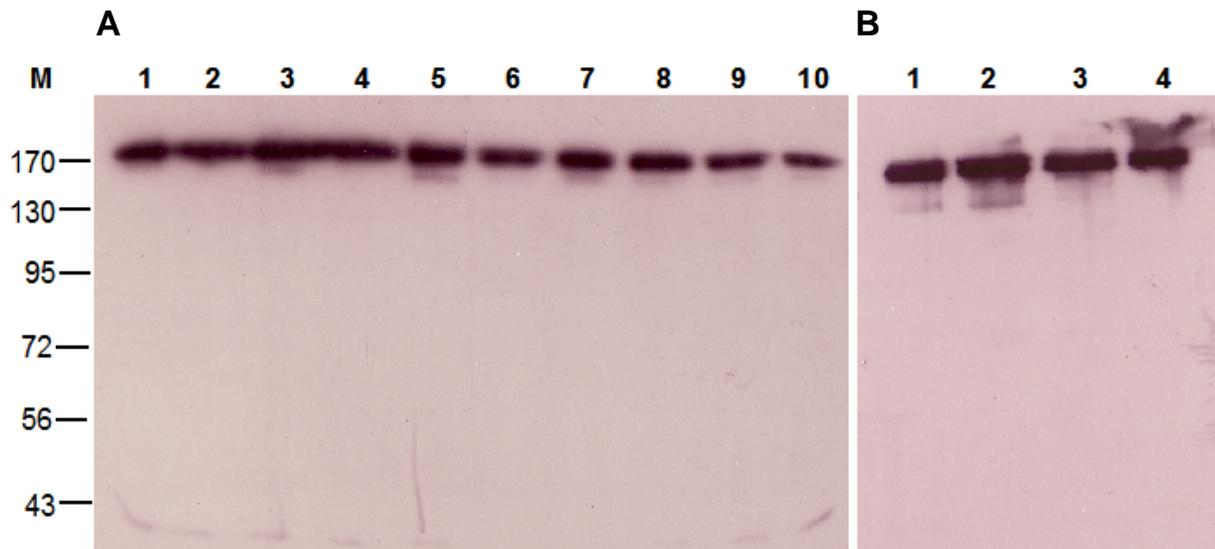
Der Hintergrund dieses experimentellen Ansatzes beruht auf der Tatsache, dass lösliches wildtypisches Knob mit hoher Affinität CAR-Bindungsstellen erkennt und diese blockiert, wodurch die Transduktionseffizienz bei Verwendung entsprechend hoher Titer nach anschließender Exposition mit Reporterviren weitestgehend herabgesetzt wird. Modifikationen in Kontaktbereichen reduzieren die Affinität zu CAR, und entsprechend geringer wirkt sich der kompetitive Effekt auf die Transduktionseffizienz aus. Daher hat diejenige Modifikation den größten Einfluss auf

die CAR-Interaktion im Rahmen eines Konkurrenzexperimentes, welche in der höchsten Reporterexpression resultiert. Im Bezug auf die als Referenz verwendete SP-Mutante nehmen daher Kombinationen, die eine noch geringere Affinität zu CAR zeigen einen Wert über 100 % an und Kombinationen, die eine stärkere Affinität zu CAR zeigen, einen Wert unter 100 % an. Hiernach zeigte die Mehrzahl der Kombinationsmutanten einen vergleichbaren kompetitiven Effekt auf die Interaktion mit CAR wie die SP-Mutante. Erst die Konkurrenz mit den Mehrfachmutanten SPVK, SPVKY, SPKYL und SPVYL führte zu einer moderaten Steigerung der Reporteraktivität im Vergleich zu SP auf maximal 120 %. Einen Rückgang der Reporteraktivität war im Fall der Knobmutanten V und VK zu beobachten. Die Konkurrenz mit VK führte zu einem Rückgang der Reporteraktivität auf etwa 80 % und im Falle der V-Mutante zu einem Rückgang auf etwa 10 %. Die singuläre Modifikation V441T hatte demnach im Prinzip keinen Einfluss auf die Affinität der Knobdomäne zu CAR und kompetierte mit einer vergleichbaren Effizienz wie wildtypisches Knob die Infektion von HeLa-Zellen. Im Ergebnis weisen die Daten darauf hin, dass durch die Einführung zusätzlicher Modifikationen, über SP hinaus, die Affinität zu CAR moderat weiter herabgesetzt wird. Daher wurden im Weiteren einige Kombinationen an Austausch im Kontext modifizierter Viren untersucht.

#### **4.2.2 Herstellung von detargeted Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup> in einem transienten Transfektions- und Infektionssystem**

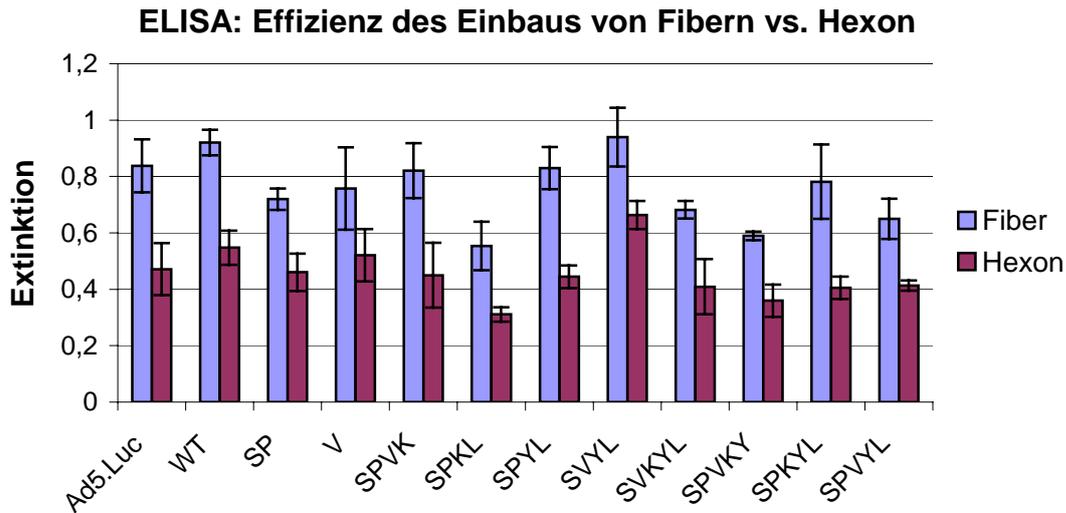
Im nächsten Schritt wurde eine Auswahl der auf der Ebene der löslichen Knob-Proteine analysierten Kombinationen an Aminosäure-Modifikationen im Kontext viraler Partikel untersucht: „WT“, SP, V, SPVK, SPKL, SPYL, SVYL, SVKYL, SPVKY, SPKYL, SPVYL. Hierzu wurden genomisch fiberlose Reporterviren (Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup>) in einem etablierten transienten Transfektions- und Infektionssystem mit den modifizierten Fibern ausgestattet (3.7.2.2). Die Viren wurden hinsichtlich der Effizienz des Einbaus der modifizierten Fibern charakterisiert. Mittels Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass alle generierten detargeted Ad5.GFP. $\Delta$ F mit modifizierten trimeren Fibern ausgestattet

waren. Hierzu wurden die Viren in Ladepuffer ohne SDS und ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol im Polyacrylamidgel (ohne SDS) aufgetrennt, wobei der Laufpuffer SDS enthielt. Unter diesen semidenaturierenden Bedingungen war es möglich die trimere Form der Fiberproteine (180 kDa) als Banden darzustellen (Abb. 4.13). Die Intensitäten der entsprechenden Banden der pseudogetypten Viren unterschieden sich nicht von der genotypisch mit einem Fibergen ausgestatteten Kontrolle Ad5.Luc. Hieraus kann geschlossen werden, dass die *trans*-Komplementation im transienten System zu einem effizienten Einbau der modifizierten Fibern geführt hat und die gewählten Modifikationen nicht die Trimerisierung inhibieren. Um allerdings die Effizienz des Einbaus der Fibern genau quantifizieren zu können, wurde der Gehalt an Fibern im Kapsid mit dem Gehalt an Hexon verglichen. Zum einen tragen die generierten Viren genomisch ein Hexon-Gen und zum anderen ist das Hexon die Hauptstrukturkomponente des Kapsids, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass deren Anzahl pro Partikel immer relativ konstant ist. Auf der anderen Seite ist die Präsenz genügender Fibern keine Voraussetzung für die Assemblierung, da das Fehlen von Fibern die Assemblierung weder qualitativ noch quantitativ stört. Um daher mögliche Effekte, die durch einen ungenügenden Einbau von Fibern verursacht werden ausschließen zu können, war es deshalb notwendig die generierten pseudogetypten Viren neben der qualitativen Charakterisierung mittels Westernblot-Analyse auch quantitativ zu analysieren.

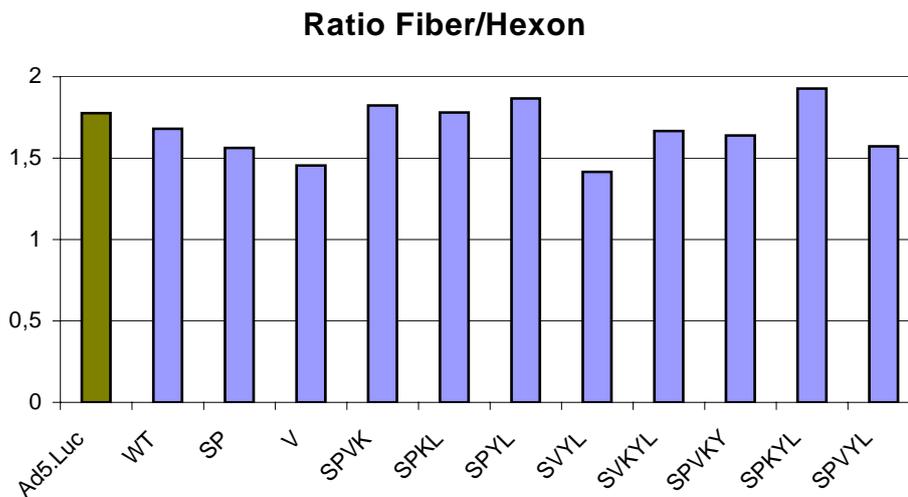


**Abb. 4.13:** Darstellung der Banden der adenoviralen Fibern in ihrer trimeren Form im Westernblot. Die im transienten Transfektions- und Infektionssystem generierten pseudogetypten Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup> wurden zusammen mit der Kontrolle Ad5.Luc hinsichtlich der Effizienz des Einbaus der Fibern analysiert. Je Spur wurden 1x10<sup>8</sup> OP im 10 % SDS-Gel unter seminativen Bedingungen aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und mit einem die homotrimere Struktur der Fiber erkennenden Maus-Ascides Antikörper inkubiert. A: (1) Ad5.Luc; (2) Ad5.GFP. $\Delta$ F/WT; (3) Ad5.GFP. $\Delta$ F/SP; (4) Ad5.GFP. $\Delta$ F/V; (5) Ad5.GFP. $\Delta$ F/SPVK; (6) Ad5.GFP. $\Delta$ F/SPKL; (7) Ad5.GFP. $\Delta$ F/SPYL; (8) Ad5.GFP. $\Delta$ F/SVYL; (9) Ad5.GFP. $\Delta$ F/SVKYL; (10) Ad5.GFP. $\Delta$ F/SPVKY. B: (1) Ad5.Luc; (2) Ad5.GFP. $\Delta$ F/WT; (3) Ad5.GFP. $\Delta$ F/SPKYL; (4) Ad5.GFP. $\Delta$ F/SPVYL. Marker (M): Page Ruler. Exposition: 1 min.

Die Effizienz des Einbaus der modifizierten Fibern in Ad5.GFP. $\Delta$ F wurde mittels ELISA quantifiziert (3.7.5.3). Die viralen Partikel wurden an Maxisorb-Platten gebunden und zunächst parallel mit Fiber- bzw. Hexon-spezifischen Maus-Antikörpern inkubiert und anschließend mit einem Maus-spezifischem HRP gekoppeltem Zweitantikörper. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abb. 4.14 dargestellt. Für jede Präparation wurde dann aus den Signalwerten von Fiber und Hexon der Ratio gebildet und die Anteiligkeit der beiden Strukturkomponenten verglichen (Abb. 4.15). Mittels ELISA konnte so gezeigt werden, dass die auf der Grundlage von Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup> generierten genomisch fiberlosen Viren ein gleiches Verhältnis von Fiber zu Hexon aufweisen wie das Fiber-codierende Virus Ad5.Luc. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Modifikationen im Rahmen des Detargeting den Einbau der Fibern in die Kapside während der Assemblierung nicht inhibieren, die Fibern effizient eingebaut werden und von daher die Qualität der Infektion nicht auf möglicherweise ungenügende Ausstattung mit Fibernmolekülen zurückzuführen ist.



**Abb. 4.14:** Quantifizierung des Einbaus der Fibern in Ad5.GFP.ΔF im transienten Transfektions- und Infektionssystem mittels ELISA. Die Viren wurden an Maxisorb-Platten gebunden und in parallelen Ansätzen der Gehalt an Fiber und Hexon der einzelnen Präparationen bestimmt. Als Kontrolle zu den genomisch fiberlosen Viren wurde das die Fiber kodierende Virus Ad5.Luc verwendet. Für den Nachweis der Fiber wurden  $1,25 \times 10^9$  OP/Well verwendet und für den Nachweis des Hexons  $5 \times 10^8$  OP/Well. In A sind die Mittelwerte der Extinktion aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppelten Ansätzen gezeigt. Die Standardabweichung ist angegeben.



**Abb. 4.15:** Darstellung des Verhältnisses Fiber vs. Hexon als Quotienten. In der Graphik ist der Ratio des Kontrollvirus als olivgrüner Balken hervorgehoben.

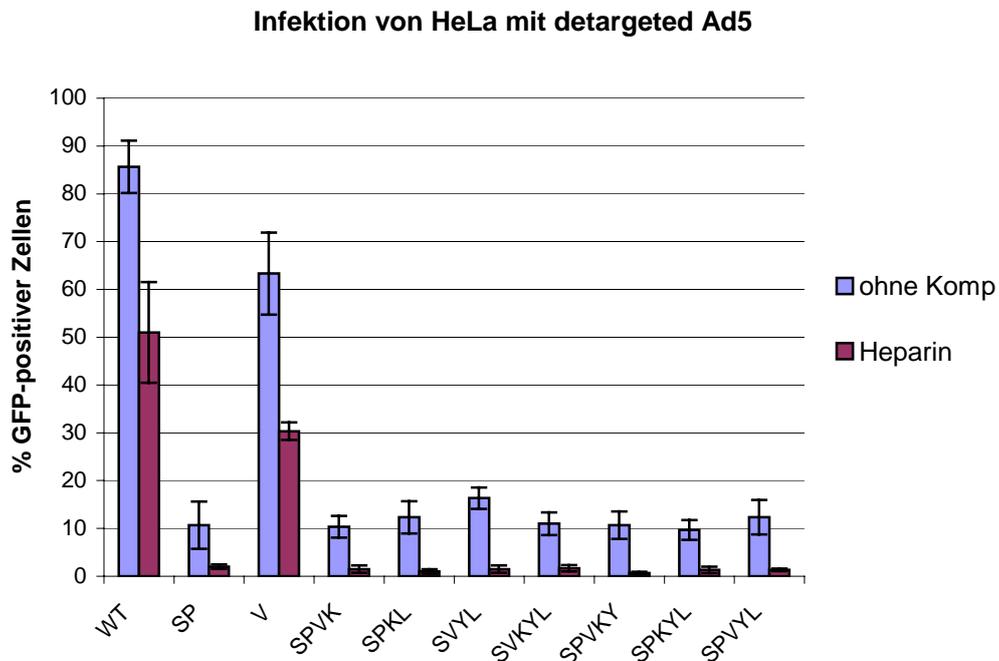
### 4.2.3 Infektionsexperimente mit detargeted Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup>

Der Einfluss der Modifikationen im Rahmen des Detargetings auf die CAR-vermittelte Infektion wurde in Infektionsexperimenten in An- und Abwesenheit von Heparin charakterisiert. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit 10.000 OP/Zelle und CHO-Zellen mit 25.000 OP/Zelle 45 min infiziert und 48 h später fluoreszenzmikroskopisch auf GFP-Expression hin untersucht. Hierzu wurden die Zellrasen trypsiniert und die vereinzelt Zellen in der Neubauer Zählkammer unter Fluoreszenzlicht quantifiziert (3.9.1).

#### 4.2.3.1 Infizierbarkeit von CAR-positiven HeLa-Zellen

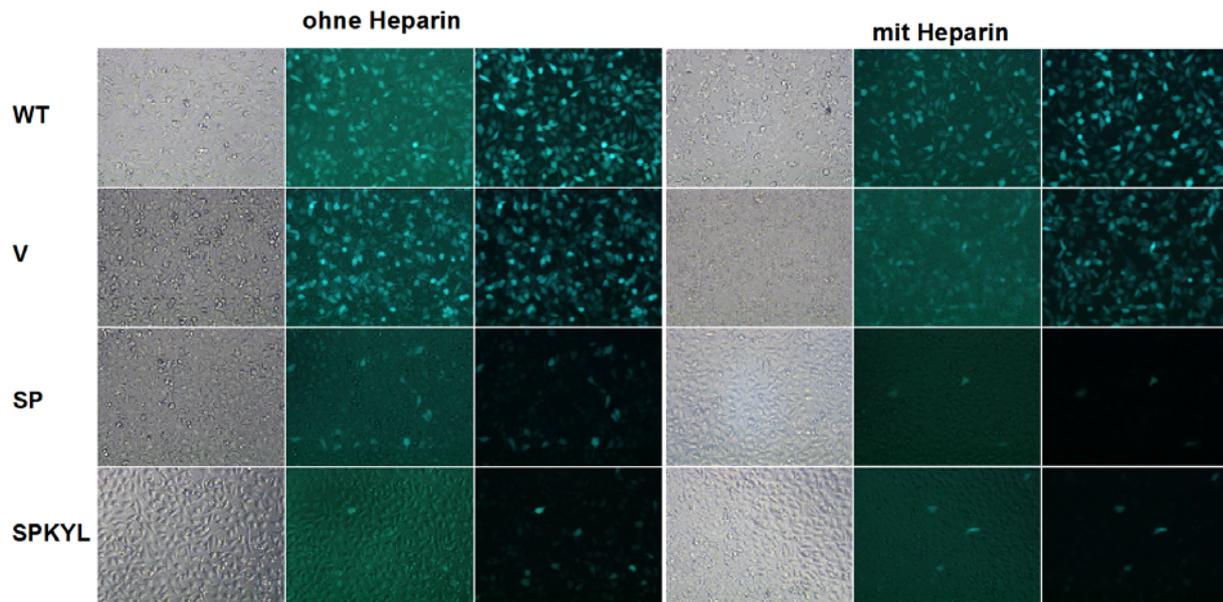
Die Infektion von HeLa-Zellen mit Ad5.GFP. $\Delta$ F/WT führte in Abwesenheit von Heparin zu etwa 85 % an GFP-exprimierenden Zellen. In Anwesenheit von Heparin waren nur etwa 50 % der Zellen GFP-positiv. Innerhalb der Gruppe der detargeted Viren zeigte die Modifikation V441T den geringsten Effekt auf die Affinität zu CAR. In Abwesenheit von Heparin wurden etwa 60 % GFP-positive Zellen gezählt und in Anwesenheit des Kompetitors noch 30 %. Die weiteren, kombinierten Austausche, die alle den Austausch der Aminosäure S408E gemeinsam hatten, zeigten ein relativ einheitliches Infektionsmuster. In Abwesenheit von Heparin waren diese modifizierten Viren nur noch in der Lage in etwa 10 % der Zellen GFP zu exprimieren. In Anwesenheit des Kompetitors waren nur noch weniger als 1 % der Zellen GFP-positiv Abb. 4.16. Die Infektiosität dieser detargeted Viren war somit im Vergleich zu Viren mit wildtypischer Fiber erheblich herabgesetzt und die verbleibende Infektiosität stand alleine im Zusammenhang mit den HSPG. Dieser Sachverhalt wird durch die Aufnahmen im GFP-Filter in Abb. 4.17 verdeutlicht. Die Aufnahmen zeigen exemplarisch die GFP-Expression von HeLa-Zellen nach Infektion mit Ad5.GFP. $\Delta$ F, pseudogetypt mit wildtypischer bzw. V-, SP- und SPKYL-modifizierten Fibern, in An- und Abwesenheit von Heparin. Die Modifikation V441T führte im Vergleich zum WT nur zu einem geringen Rückgang der Anzahl GFP-exprimierender Zellen, während die Modifikationen SP und SPKYL zu einen erheblichen Rückgang der GFP-Expression führten. Hierbei unterscheiden sich die Doppel- und Fünffachmutante nicht. Die Competition mit Heparin zeigte bei WT und V nur einem geringen Effekt, da in beiden Fällen noch eine effektive Infektion über CAR möglich war. Dagegen wirkte

sich Heparin auf die Infektion der SP- und SPKYL-modifizierten Viren stärker aus. Waren in Abwesenheit von Heparin noch etwa 10 % der Zellen GFP-positiv, reduzierte sich die Anzahl auf wenige Zellen in Anwesenheit von Heparin.



**Abb. 4.16:** Einfluss der Modifikationen von Kontaktaminoaciden auf die CAR-vermittelte Infektion von HeLa-Zellen. Die auf der Basis von Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup> generierten Viren mit wildtypischen bzw. modifizierten Fibern wurden mit 10.000 OP/Zelle in An- u. Abwesenheit von Heparin 45 min inkubiert und die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen nach 48 h quantifiziert. Die Anteiligkeit der GFP-positiven Zellen ist in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

### Infektion von HeLa mit detargeted Ad5.GFP.<d>F/F



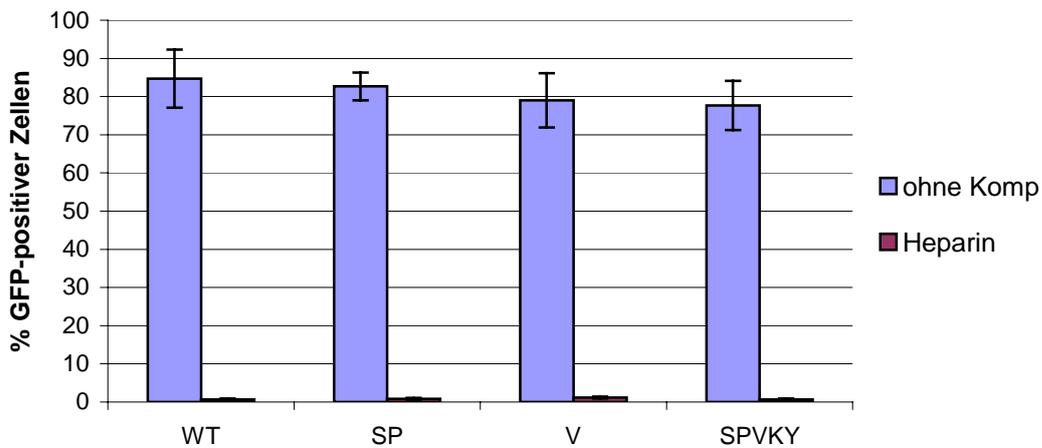
**Abb. 4.17:** Aufnahmen GFP-exprimierender HeLa-Zellen nach Infektion mit Ad5.GFP. $\Delta$ F, pseudogetypt mit wildtypischen, V-, SP- bzw. SPKYL-modifizierten Fibern in An- u. Abwesenheit von Heparin. Die Virusinkubation erfolgte 45 min mit 10.000 OP/Zelle. Dargestellt sind in der linken Hälfte der Abbildung Aufnahmen von Ansätzen die ohne Heparin inkubiert wurden und in der rechten Hälfte die entsprechenden mit Heparin präinkubierten Ansätze. Je ein Durchlichtbild (links), ein überlagertes Bild (Mitte) und eine Aufnahme im GFP-Kanal (rechts). Die Bilder wurden 48 h nach Infektion mit einem Zeiss Axiovert 200-Mikroskop aufgenommen. Belichtung im GFP-Filter 5 Sek; Vergrößerung: 40x.

#### 4.2.3.2 Infizierbarkeit von CAR-negativen CHO-Zellen

Um zu klären, in wie weit der auf CAR-positiven HeLa-Zellen beobachtete Rückgang der Infektiosität im Rahmen des Detargetings im Zusammenhang mit der CAR-Interaktion steht, wurden mit CAR-defizienten CHO-Zellen die Experimente wiederholt. Im Unterschied zu den Experimenten mit HeLa-Zellen wurde zum einen anstelle von SPKYL, das SPVKY-modifizierte Virus eingesetzt und zum anderen mit 25.000 OP/Zelle infiziert.

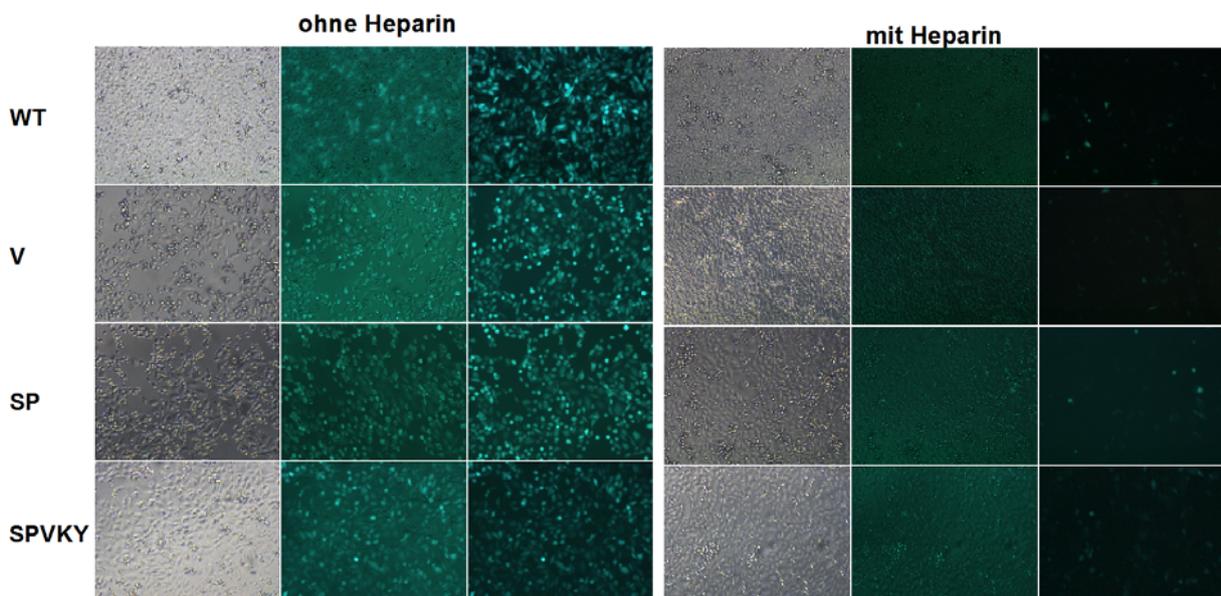
Im Gegensatz zu HeLa-Zellen unterschied sich die Infektiosität des mit einer wildtypischen Fiber ausgestatteten Virus nicht von der modifizierter Viren. In allen Fällen lag der Anteil GFP-positiver Zellen in einem Bereich von 75 – 80 % und in Anwesenheit von Heparin zeigten nur noch vereinzelte Zellen eine GFP-Expression (Abb. 4.18 und 4.19).

## Infektion von CHO mit detargeted Ad5



**Abb. 4.18:** Einfluss der Modifikationen von Kontaktaminosäuren auf die Infektion von CAR-defizienten CHO-Zellen. Die auf der Basis von Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup> generierten Viren mit wildtypischen bzw. modifizierten Fibern wurden mit 25.000 OP/Zelle in An- u. Abwesenheit von Heparin 45 min inkubiert und die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen nach 48 h quantifiziert. Die Anteiligkeit der GFP-positiven Zellen ist in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

## Infektion von CHO mit detargeted Ad5.GFP.&lt;d&gt;F/F



**Abb. 4.19:** Aufnahmen GFP-exprimierender CHO-Zellen nach Infektion mit Ad5.GFP. $\Delta$ F, pseudogetypt mit wildtypischen, V-, SP- bzw. SPKYL-modifizierten Fibern in An- u. Abwesenheit von Heparin. Die Virusinkubation erfolgte 45 min mit 25.000 OP/Zelle. Dargestellt sind in der linken Hälfte der Abbildung Aufnahmen von Ansätzen die ohne Heparin inkubiert wurden und in der rechten Hälfte die entsprechenden Ansätze die mit Heparin präinkubiert wurden: je ein Durchlichtbild (links), ein überlagertes Bild (Mitte) und eine Aufnahme im GFP-Kanal (rechts). Die Bilder wurden 48 h nach Infektion mit einem Zeiss Axiovert 200-Mikroskop aufgenommen. Belichtung im GFP-Filter 5 Sek; Vergrößerung: 40x.

### 4.3 Retargeting

Die für die Interaktion mit CAR verantwortlichen Aminosäuren sind in der Knobdomäne der distalen Fiberprojektion lokalisiert. Innerhalb der Knobdomäne hat sich der HI-Loop als potentieller Ort für das Einfügen kurzer Peptide erwiesen, der es gestattet den Tropismus von Ad5 gegenüber Rezeptoren zu erhöhen, die für einen gewünschten Zielzelltypus spezifisch sind (Retargeting). Das Einfügen solcher Peptide kann sich negativ auf die Fähigkeit der Fibern auswirken, spontan funktionelle Homotrimere auszubilden. Neben dem Einfügen von Peptiden in den HI-Loop der Knobdomäne ist es für ein spezifisches Vektordesign notwendig, das Retargeting mit der Ablation der Interaktion mit CAR zu kombinieren. Im Rahmen des Detargetings hat sich gezeigt, dass die Interaktion mit CAR durch die Modifikation S408E/P409A weitestgehend eliminiert wurde. Die zusätzliche Modifikation weiterer Kontakt-Aminosäuren führte zu keiner weiteren Verstärkung dieses Effekts. Daher erfolgte das Retargeting auf der Basis eines SP-modifizierten Fiberproteins.

#### 4.3.1 Inkorporation von publizierten Peptiden und von Peptiden mit potentieller Spezifität für Glatte Muskelzellen in den HI-Loop der SP-modifizierten Fiber

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptide mit einer potentiellen Spezifität für humane koronale arterielle Glatte Muskelzellen (CASMC) in den HI-Loop zwischen die Aminosäuren T542 und G543 kloniert. Diese Peptide wurden mittels der Technik des Phage Display identifiziert. Hierzu wurde eine lineare 12mer fd-Phagenbibliothek mit humanen koronalen arteriellen Endothelzellen (CAEC) präinkubiert, die im Überstand verbliebene Phagenfraktion mit Glatten Muskelzellen inkubiert und von der internalisierten Phagenfraktion die Nukleotid- und Peptidsequenz bestimmt (Die Phage Display-Arbeiten wurden im Labor Petersen von Dr. Pamela Okun und Rabea Matlouthi durchgeführt). Die Sequenzen der entsprechenden Peptide sind in Abb. 4.20 aufgelistet. Daneben wurden die publizierten Sequenzen eines für vaskuläre Glatte Muskelzellen spezifischen Epitops (Michon *et al.*, 2002), eines für vaskuläre

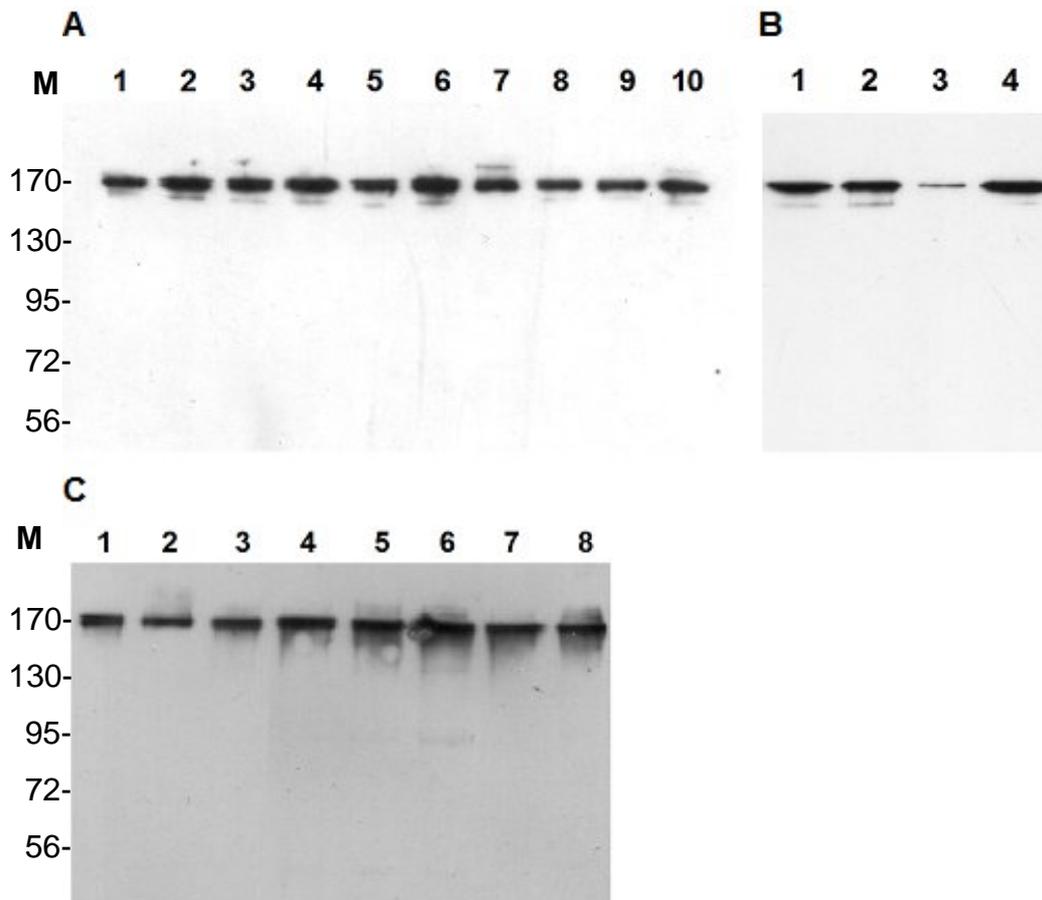
Endothelzellen spezifisches Epitop und eines Peptids mit einem RGD-Motiv in den HI-Loop des SP-modifizierten Fibrogens kloniert.

Retargeting: Peptidsequenzen in HI-Loop													
Name	Aminosäuren												
A	Q	N	T	L	H	S	L	G	F	F	H	Y	
B	T	N	A	A	W	K	H	P	S	S	L	I	
C	T	S	H	Y	Y	W	A	P	H	L	P	I	
D	T	H	T	L	N	T	T	K	M	R	V	L	
E	F	S	L	P	K	L	S	P	Y	T	N	P	
F	S	A	L	P	Y	P	L	R	L	P	T	Q	
H	R	I	R	K	I	C	N	A	H	D	G	E	
J	A	S	D	T	Q	R	N	E	Y	L	Q	T	
K	S	V	P	R	A	N	L	G	Y	L	S	F	
M	Y	T	P	S	Y	L	G	F	S	T	I	Q	
N	N	H	S	W	L	Y	N	T	D	N	L	P	
O	G	T	T	T	W	Q	K	T	S	S	D	L	
Q	F	P	M	G	I	G	M	T	I	K	M	S	
S	T	P	Q	R	P	L	L	A	H	G	S	G	
VSMC	C	N	I	W	G	V	V	L	S	W	I	G	V F P E C
EC	S	I	G	Y	P	L	P						
RGD	C	D	C	R	G	D	C	F	C				
	basisch			sauer			polar			neutral			

**Abb. 4.20:** Auflistung der Peptide die im Rahmen des Retargetings in den HI-Loop des SP-modifizierten Fibrogens kloniert und exprimiert wurden. Die Benennung der Aminosäuren erfolgte nach dem 1-Buchstaben-Kode; die Ladungseigenschaften der Aminosäuren sind farbig hervorgehoben.

#### 4.3.2 Herstellung von retargeted Ad5.GFP.ΔF/F<sup>+</sup>

Im transienten Transfektions- und Infektionssystem wurden die modifizierten Fibern exprimiert und die Effizienz des Einbaus der trimeren Fibern in das Kapsid von Ad5 analysiert. Hierzu wurden je  $5 \times 10^9$  OP unter seminativen Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und die trimeren Fibern mit einem nur das Trimer erkennenden Antikörper detektiert (Abb. 4.21). Dabei konnte gezeigt werden, dass es mit Ausnahme des VSMC-spezifischen Epitopes in jedem Fall zu einem effektiven Einbau der modifizierten trimeren Fibern gekommen ist.

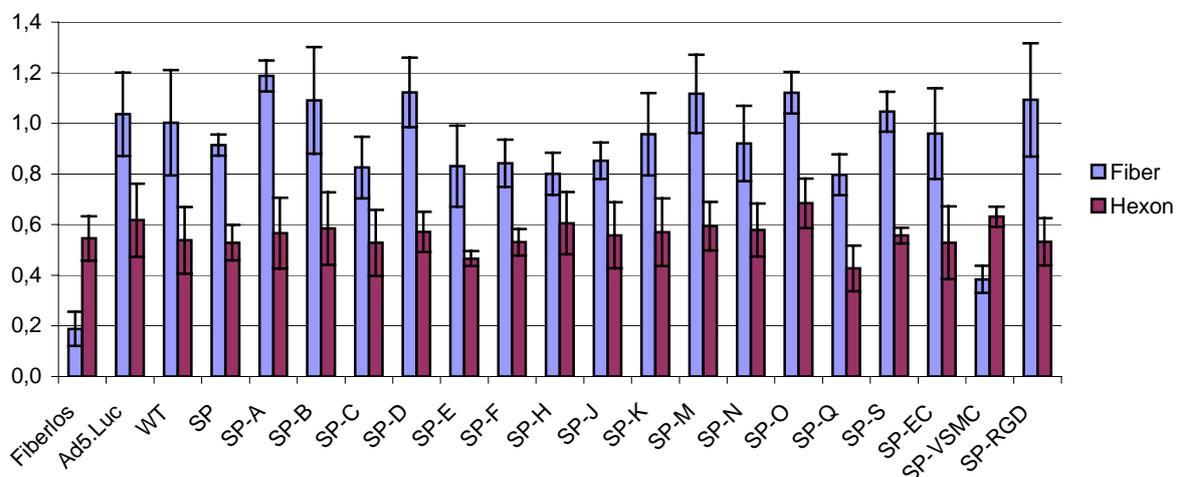


**Abb. 4.21:** Nachweis der im Retargeting generierten Fiberproteine. Je  $5 \times 10^9$  OP wurden unter seminativen Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis der trimeren Fiber erfolgte mittels monoklonalem Maus  $\alpha$ -Fiber AK 8C2.2.. (A): WT, SP, SP-A, SP-B SP-C, SP-D, SP-E, SP-F, SP-H, SP-J; (B): WT, SP-EC, SP-VSMC, SP-RGD; (C): WT, SP, SP-K, SP-M, SP-N, SP-O, SP-Q, SP-S. Marker (M): Page Ruler (Belichtung: 2 min)

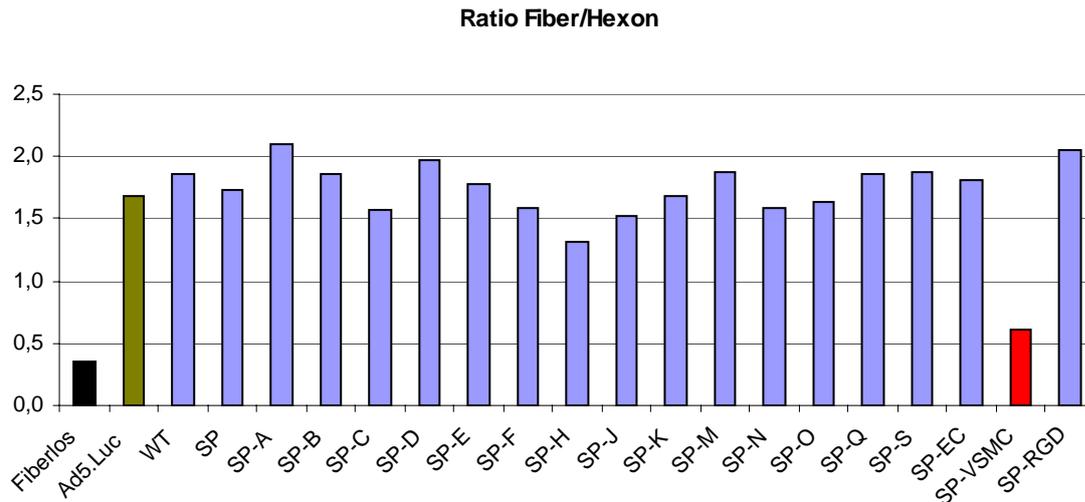
Die Effizienz des Einbaus der Fibern in das Kapsid wurde wie in Abschnitt 4.2.2 mittels ELISA quantifiziert (Abb. 4.22). Als Kontrollen diente das genomisch mit einem Fibrogen ausgestattete Virus Ad5.Luc und ein sowohl genotypisch wie auch phänotypisch fiberloses Virus (siehe 3.7.2.2). Der Fiber-spezifische Antikörper erzeugte unter den gewählten experimentellen Bedingungen bei fast allen untersuchten Viruspräparationen ein stärkeres Signal als der Antikörper gegen das Hexon (Ausnahme: fiberloses Virus und die Ad-Variante SP-VSMC). Für jede Viruspräparation wurden die Ratio aus den Messwerten der Ansätze mit Fiber-spezifischem und Hexon-spezifischem Antikörper gebildet und ist in Abb. 4.23 dargestellt. Der Balken für das Verhältnis Fiber zu Hexon des fiberlosen Virus ist schwarz hervorgehoben, die Messwerte entsprechen dem Hintergrund. Das Verhältnis der Messwerte von Fiber zu Hexon lag bei den Ad-Varianten, mit

Ausnahme von SP-VSMC, in einem Bereich von etwa 1,4 bis 2,1. Der Ratio des Kontrollvirus Ad5.Luc betrug etwa 1,6 und daher konnte davon ausgegangen werden, dass der Einbau der modifizierten Fibern im transienten System ähnlich effizient war wie bei Ad5.Luc. Die Ad-Variante SP-VSMC unterschied sich mit einer Ratio von etwa 0,6 nur geringfügig von der Ratio von 0,35 der fiberlosen Viren. Die Inkorporation von trimeren Fibern mit entsprechender SP-VSMC Modifikation verlief daher sehr ineffizient (siehe 5.3). Aus diesem Grund wurden diese Viren nicht für die anschließenden Infektionsexperimente verwendet.

**ELISA: Effizienz des Einbaus von Fiber vs. Hexon bei Ad-Varianten**



**Abb. 4.22:** Quantifizierung des Einbaus der Fibern in Ad5.GFP. $\Delta$ F im transienten Transfektions- und Infektionssystem mittels ELISA. Die Viren wurden an Maxisorb-Platten gebunden und in parallelen Ansätzen der Gehalt an Fiber und Hexon der einzelnen Präparationen bestimmt. Als Kontrolle zu den genomisch fiberlosen Viren wurde das die Fiber kodierende Virus Ad5.Luc verwendet. Für den Nachweis der Fiber wurden  $1,25 \times 10^9$  OP/Well verwendet und für den Nachweis des Hexons  $5 \times 10^8$  OP/Well. Dargestellt sind die Mittelwerte der Extinktion aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppelten Ansätzen. Die Standardabweichung ist angegeben.



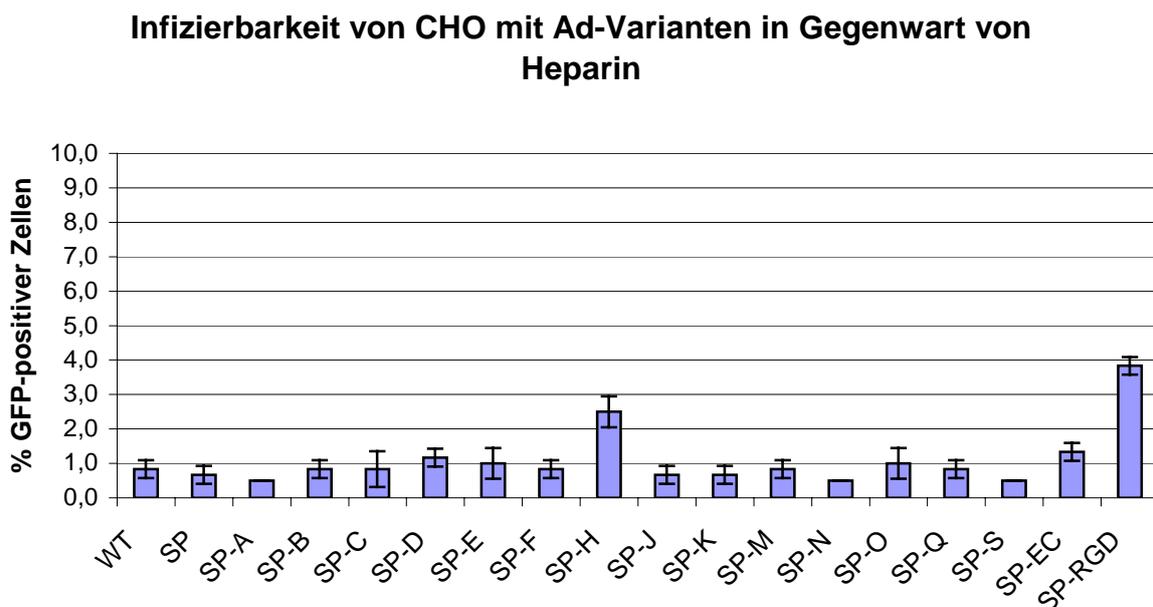
**Abb. 4.23:** Darstellung des Verhältnisses Fiber vs. Hexon als Quotienten. In der Graphik ist der Ratio des Kontrollvirus als olivgrüner Balken hervorgehoben. Der Ratio des fiberlosen Virus entspricht dem Hintergrund. Der Ratio von SP-VSMC (rot hervorgehoben) unterscheidet sich im Vergleich zu den anderen Viruspräparationen nur geringfügig vom Hintergrund.

### 4.3.3 Infektions- und Konkurrenzexperimente mit Ad5.GFP. $\Delta$ F/F<sup>+</sup>

Der Einfluss der in den HI-Loop eingefügten Peptide auf die Infektiosität der pseudogetypten Viren wurde in Infektionsexperimenten in Anwesenheit von Konkurrenten auf verschiedenen Zelllinien untersucht. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die einzelnen Experimente wurden in doppelten Ansätzen in 24-Well-Platten mit etwa 80 % konfluentem Zellrasen durchgeführt. Die Quantifikation der GFP-positiven Zellen erfolgte nach 48 h fluoreszenzmikroskopisch. Dazu wurden wie in Abschnitt 4.2.3 die Zellen mit Trypsin-EDTA behandelt und unter Fluoreszenzlicht in der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

### 4.3.3.1 Infektion von CHO-Zellen

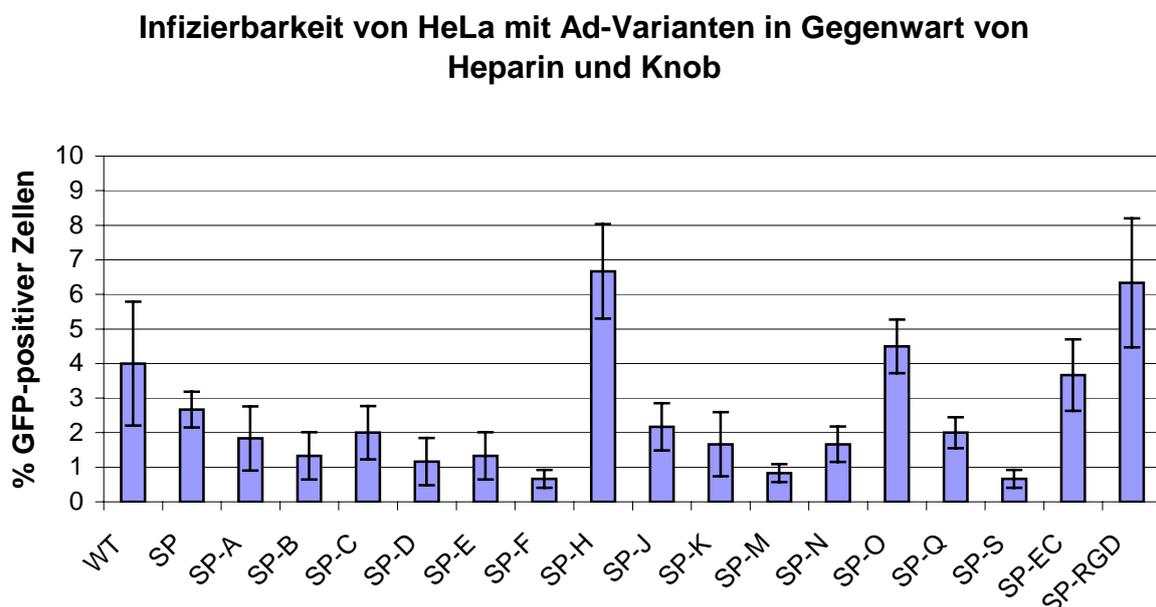
Die Infektion erfolgte für 45 min mit 25.000 OP/Zelle nach Präinkubation der Viren mit Heparin. Wie in 4.2.2.1 waren weder das mit wildtypischer Fiber ausgestattete Virus noch das SP-modifizierte Virus in der Lage mehr als 1 % der Zellen erfolgreich zu infizieren. Von der Gruppe der Ad-Varianten wurden nach Inkubation mit SP-H und SP-RGD etwa 2,5 bzw. 3,75 % GFP-positiver Zellen gezählt. Alle weiteren Ad-Varianten lagen mit einer Effizienz von 1 % im Bereich der beiden Kontrollen mit wildtypischer bzw. SP-modifizierter Fiber. Allein das Peptid RIRKICNAHDGE von SP-H und das RGD-Motiv in SP-RGD zu einer geringen Steigerung der Infektiosität. Die Ergebnisse für die Infektionsexperimente mit CHO-Zellen sind in Abb. 4.24 graphisch zusammengefasst.



**Abb. 4.24:** De- und Retargeting: Einfluss der in den HI-Loop der Ad-Varianten inkorporierten Peptide auf die Infizierbarkeit von CHO-Zellen. Die Zellen wurden mit 25.000 OP/Zelle in Anwesenheit von Heparin 45 min inkubiert und die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen nach 48 h quantifiziert. Die Anteiligkeit der GFP-positiven Zellen ist in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

### 4.3.3.2 Infektion von HeLa-Zellen

Die Infektion erfolgte 45 min mit 10.000 OP/Zelle nach Präinkubation der Zellen mit wildtypischem löslichen Knob und der Viren mit Heparin. Die Mehrzahl der Ad-Varianten war nicht in der Lage HeLa-Zellen effizienter zu infizieren als die beiden Kontrollviren mit wildtypischer Fiber (4 %) und mit SP-modifizierter Fiber (2%). Das Peptid GTTTWQKTSSDL in SP-O zeigte ebenfalls 4 % GFP-positive Zellen. Dagegen war SP-O gegenüber CHO-Zellen nicht infektiöser als der Großteil der Ad-Varianten. Die Infektion mit der Ad-Variante SP-H, die bereits gegenüber CHO-Zellen etwa um den Faktor 2 infektiöser war als der Großteil der anderen Viren, führte zu etwa 6 % GFP-positiver Zellen. Etwa genauso infektiös wie SP-H verhielt sich die Ad-Variante mit dem exponierten RGD-Motiv. Die Ergebnisse für die Infektionsexperimente auf HeLa-Zellen sind in Abb. 4.25 graphisch zusammengefasst.

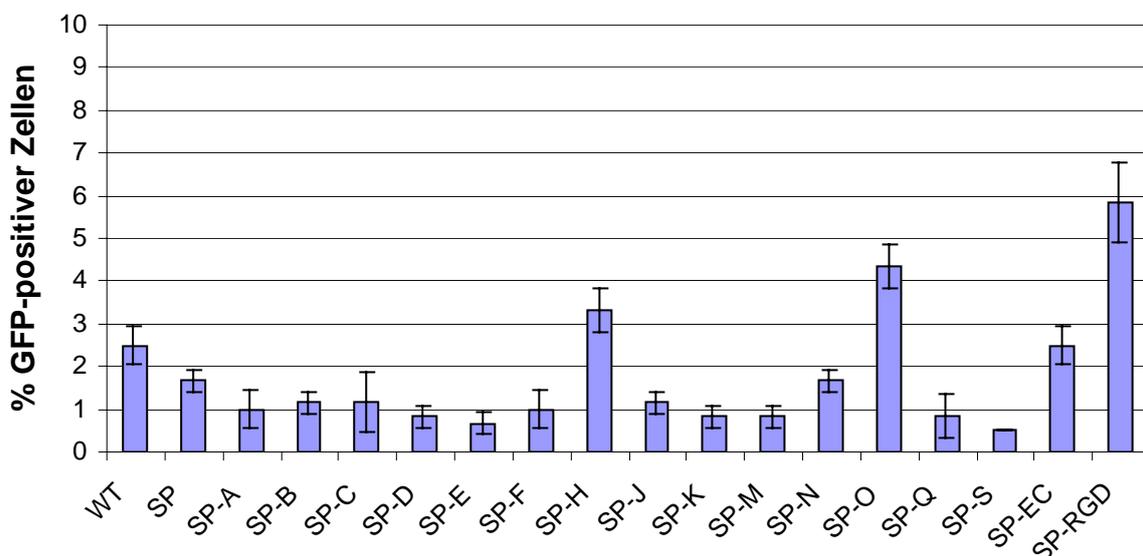


**Abb. 4.25:** De- und Retargeting: Einfluss der in den HI-Loop der Ad-Varianten inkorporierten Peptide auf die Infizierbarkeit von HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit 10.000 OP/Zelle in Anwesenheit von Heparin und löslichem wildtypischem Knob 45 min inkubiert und die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen nach 48 h quantifiziert. Die Anteiligkeit der GFP-positiven Zellen ist in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

### 4.3.3.3 Infektion von A7r5

Die Infektion dieser immortalisierten Glatten Muskelzelllinie der Ratte erfolgte 45 min mit 30.000 OP/Zelle nach Präinkubation der Zellen mit wildtypischem löslichen Knob und der Viren mit Heparin. Das mit wildtypischer Fiber ausgestattete Virus infizierte etwa 2,5 % der Zellen und das SP-modifizierte sowie der Großteil der Ad-Varianten etwa 1 % der Zellen. Die Mehrzahl der potentiell für humane Glatte Muskelzellen spezifischen Peptide konnten daher die Infektiosität gegenüber den nichthumanen Muskelzellen nicht erhöhen. Die Ad-Varainten SP-H und SP-RGD waren mit etwa 3,2 bzw. 5,8 % GFP-positiver Zellen infektiöser als die Mehrzahl der Ad-Varianten, was der Tendenz gegenüber CHO-Zellen und HeLa-Zellen entspricht. Die Ad-Variante SP-O lag mit etwa 4,3 % GFP-positiver Zellen zwischen SP-H und SP-RGD. Dagegen war die Infektiosität von SP-O gegenüber CHO-Zellen und HeLa-Zellen im Vergleich zu den anderen Ad-Varianten nicht maßgeblich erhöht. Die Ergebnisse für die Infektionsexperimente auf A7r5 sind in Abb. 4.26 graphisch zusammengefasst.

**Infizierbarkeit von A7r5 mit retargeted Ad in Gegenwart von Heparin und Knob**

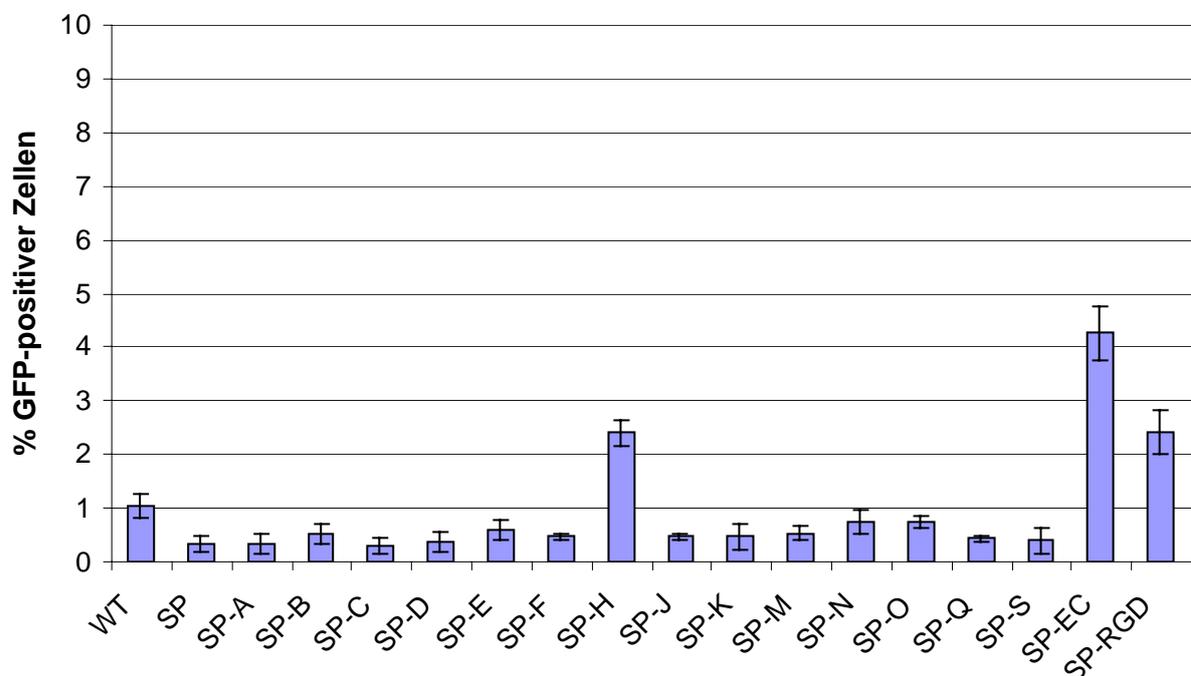


**Abb. 4.26:** De- und Retargeting: Einfluss der in den HI-Loop der Ad-Varianten inkorporierten Peptide auf die Infizierbarkeit von A7r5. Die Zellen wurden mit 30.000 OP/Zelle in Anwesenheit von Heparin und löslichem wildtypischen Knob 45 min inkubiert und die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen nach 48 h quantifiziert. Die Anteiligkeit der GFP-positiven Zellen ist in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

#### 4.3.3.4 Infektion von CAEC

Die Infektion dieser primären humanen Endothelzelllinie erfolgte für 45 min mit 10.000 OP/Zelle nach Präinkubation der Zellen mit wildtypischem löslichen Knob und der Viren mit Heparin. Das mit wildtypischer Fiber ausgestattete Virus infizierte etwa 1 % der Zellen erfolgreich. Mit Ausnahme von SP-H, SP-RGD und SP-EC war der Anteil GFP-exprimierender Zellen in der Gruppe der Ad-Varianten unter 1 %. SP-O zeigte im Gegensatz zu den Ergebnissen auf den Glatten Muskelzellen der Ratte gegenüber dieser gentherapeutisch wichtigen Zellen keine erhöhte Infektiosität. Sowohl SP-H wie auch SP-RGD waren mit etwa 2 % GFP-positiver Zellen wiederum infektiöser als der Großteil der Ad-Varianten. SP-EC mit dem HSVEC-spezifischen Peptid SIGYPLP infizierte mit etwa 4 % GFP-positiver Zellen am effektivsten. Die Ergebnisse für die Infektionsexperimente auf CAEC sind in Abb. 4.27 graphisch zusammengefasst.

**Infizierbarkeit von CAEC mit Ad-Varianten in Gegenwart von Heparin und Knob**

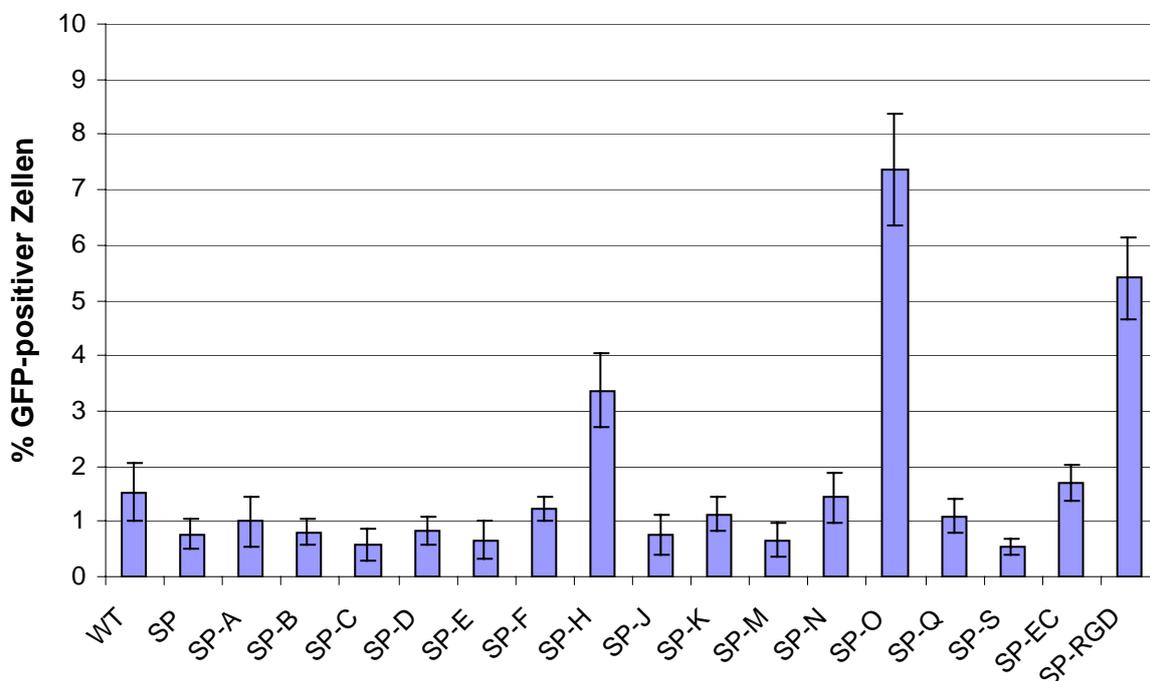


**Abb. 4.27:** De- und Retargeting: Einfluss der in den HI-Loop der Ad-Varianten inkorporierten Peptide auf die Infizierbarkeit von CAEC. Die Zellen wurden mit 10.000 OP/Zelle in Anwesenheit von Heparin und löslichem wildtypischen Knob 45 min inkubiert und die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen nach 48 h quantifiziert. Die Anteiligkeit der GFP-positiven Zellen ist in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

#### 4.3.3.5 Infektion von CASMC

Die Infektion der primären humanen Muskelzellen erfolgte 45 min mit 50.000 OP/Zelle nach Präinkubation der Zellen mit wildtypischem löslichen Knob und der Viren mit Heparin. Das mit wildtypischer Fiber ausgestattete Virus infizierte etwa 1,5 % der Zellen erfolgreich. Obwohl das Biopanning auf diesen Zelltyp ausgerichtet war, verlief die Infektion der Mehrzahl der Ad-Varianten ähnlich ineffizient mit 0,5 bis 1,5 % GFP-exprimierender Zellen. Dagegen verliefen die Infektionen der beiden Ad-Varianten SP-H und SP-RGD mit etwa 3,5 bzw. 5,5 % GFP-positiver Zellen, wiederum effizienter. SP-EC zeigte im Gegensatz zu den Ergebnissen auf Endothelzellen mit 1,5 % GFP-exprimierender Zellen, keine besondere Affinität zu diesem Zelltyp. Eine signifikante Spezifität für Glatte Muskelzellen zeigte die Ad-Variante SP-O mit etwa 7,5 % GFP-positiver Zellen. Die Ergebnisse für die Infektionsexperimente auf CASMC sind in Abb. 4.28 graphisch zusammengefasst.

**Infizierbarkeit von CASMC mit Ad-Varianten in Gegenwart von Heparin und Knob**



**Abb. 4.28:** De- und Retargeting: Einfluss der in den HI-Loop der Ad-Varianten inkorporierten Peptide auf die Infizierbarkeit von CASMC. Die Zellen wurden mit 50.000 OP/Zelle in Anwesenheit von Heparin und löslichem wildtypischem Knob 45 min inkubiert und die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen nach 48 h quantifiziert. Die Anteiligkeit der GFP-positiven Zellen ist in % angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Die Ergebnisse des Retargetings bestätigen, dass es möglich ist, adenovirale Vektoren durch die Einführung von Peptiden in den exponierten HI-Loop in der Knobdomäne eine neue Spezifität zu verleihen. Hierdurch ist es möglich solche Zelltypen spezifisch zu infizieren, die Rezeptoren exprimieren, welche mit den inkorporierten Peptiden interagieren und hierdurch die Infektion ermöglichen. So konnten die Ergebnisse bereits publizierter Peptide (EC-spezifisches Epitop und RGD-Motiv) bestätigt werden und darüber hinaus 2 weitere Peptide mit charakteristischen Spezifitäten identifiziert werden. Das Peptid O (GTTTWQKTSSDL) konnte als ein für CASMC-spezifisches Motiv identifiziert werden, das die Infektiosität von Ad5 gegenüber diesem therapeutisch interessanten Zelltyp erhöht. Das Peptid H (RIRKICNAHDGE) konnte als ein „RGD-artiges“ Peptid identifiziert werden, das die Infektiosität von Ad5 gegenüber allen getesteten Zellen erhöht und sich damit genauso verhält wie das RGD-Peptid und der bis dato unbekannte Interaktionspartner genauso ubiquitär exprimiert wird wie Integrine.

## 5. Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand die Modifikation des adenoviralen Tropismus von Ad5 durch De- und Retargeting im Hinblick auf dessen Einsatz als spezifischer Vektor im Rahmen systemischer gentherapeutischer Applikationen. Die ubiquitäre Präsenz der primären Rezeptoren ermöglichen Adenoviren die Infektion aller bislang getesteter Zelltypen *in vitro* und führt im Rahmen einer systemischen Applikation zu einer bevorzugten Aufnahme im Lebergewebe. Ein idealer viraler Vektor sollte aber keine Affinität zu solchen Zellen besitzen, die er auf dem Weg vom Applikationsort zur Zielzelle passiert und sollte gleichzeitig die Zielzellen effizient infizieren. Im Fall von adenoviralen Vektoren hat dies zur Konsequenz, dass die Interaktion mit den natürlichen Rezeptoren durch Detargeting unterbrochen und eine neue Spezifität eingeführt werden muss, die eine spezifische und effiziente Aufnahme in das Zielgewebe ermöglicht. In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von Ad5 mit seinen natürlichen Rezeptoren sowie die Modifikation des viralen Tropismus durch Einführung Zelltyp-spezifischer Peptide untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Klärung der Frage, wie effektiv potentiell spezifische Peptide in der Transduktionsvermittlung der Zielzellen sind, wenn keine primären Rezeptoren zur Verfügung stehen.

### 5.1 Die Wechselwirkungen von Ad5 mit seinen natürlichen Rezeptoren

In der Literatur wurde nach Entdeckung der hochaffinen Interaktion zwischen Knobdomäne und CAR davon ausgegangen, dass die Infektosität von Ad5 nur von dieser Wechselwirkung abhängig ist. Entsprechend galten Zellen die genügend CAR exprimieren als infizierbar und Zellen die kein oder nur sehr wenig CAR exprimieren als nicht infizierbar. So beruft sich Nicklin *et al.* 2001 auf nicht veröffentlichte Daten von Von Seggern, wonach die Modifikation der Aminosäuren S408 und P409 zu einem Rückgang der Transduktionseffizienz um 99 % bei HeLa-Zellen führen soll. Entsprechend groß war aber dann letzten Endes die Enttäuschung, als sich gezeigt hat, dass entsprechende detargeted Viren *in vivo* genauso effizient die Leber transduzieren wie Vektoren mit wildtypischen Fibern (*Leissner et al., 2001; Alemany*

*et al.*, 2001; Mizuguchi *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003a). Diese äußerst effiziente Aufnahme systemisch applizierter adenoviraler Vektoren in der Leber und die damit verbundene schnelle Eliminierung aus dem Blutstrom verhindern bislang den Einsatz von Ad5 in systemischen Therapien (Alemany *et al.*, 2000; Koizumi *et al.*, 2003b). Nachdem feststand, dass die Interaktion mit CAR nicht die primäre Ursache für die Lebertransduktion darstellt, wurde der Einfluss der Interaktion zwischen dem RGD-Motiv im Pentonbasis-Protein und Integrinen untersucht. Die Deletion des RGD-Motives zeigte sowohl alleine wie auch in Kombination mit der Ablation der CAR-Interaktion keinen inhibitorischen Effekt auf die Transduktionseffizienz (Mizuguchi *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003a). Als weitere mögliche Ursache für die effiziente Transduktion der Leber wurde dann besonderes Augenmerk auf die Interaktion mit den HSPG gelegt. Durch die Arbeiten von Dechechchi *et al.* konnte gezeigt werden, dass HSPG ebenfalls einen signifikanten Einfluss als Rezeptoren auf die Infektiosität von C-Typ Ads haben (Dechechchi *et al.*, 2000 und 2001). Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass ein basisches KKTK-Motiv im Fiberschaft eine putative HSPG-Bindestelle darstellen könnte. Verschiedene Autoren modifizierten die von Dechechchi postulierte putative Bindestelle im Fiberschaft von C-Typ Ads (Smith *et al.*, 2003a, 2003b; Koizumi *et al.*, 2003, 2006; Nicol *et al.*, 2004; Bayo-Puxan *et al.*, 2006). Es konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass die Eliminierung des KKTK-Motives die Transduktion *in vivo* und hier insbesondere im Lebergewebe nahezu vollständig inhibiert. Auch *in vitro* führte diese Modifikation zu einem Rückgang der Reporterexpression um etwa den Faktor 10 bei A549-Zellen (Bayo-Puxan *et al.*, 2006). Dieser Rückgang steht aber in keinem Verhältnis zu den Ergebnissen von Dechechchi *et al.*, die in ihrem experimentellen Ansatz lösliches Heparin als Kompetitor verwendeten um die HSPG-Interaktion zu inhibieren. Diese Untersucher konnten zeigen, dass die Präinkubation von CAR-positiven A549-Zellen mit Heparin zu einer Reduktion der Reporterexpression um „nur“ etwa 50 % führt. Einen Ansatz, um diese Diskrepanz zwischen Faktor 2 und 10 zu erklären, zeigen Kritz *et al.* 2007 auf. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass der enorme Einfluss des KKTK-Motives auf die Transduktionseffizienz weniger durch die Interaktion mit HSPG bedingt ist, als vielmehr durch Folgeereignisse wie Internalisierung und intrazellulärem Transport verursacht wird. Vor diesem Hintergrund sind daher Ergebnisse hinsichtlich der HSPG-Interaktion auf der Basis eines modifizierten Fiberschaftes sehr kritisch zu bewerten (Bayo-Puxan *et al.*, 2006, Kritz *et al.*, 2007).

Der von Dehecchi *et al.* aufgezeigte Ansatz der Inhibition durch Heparin bietet die Möglichkeit potentielle Effekte durch eine Modifikation des Fiberschaftes zu umgehen. Allerdings sind bislang nur von wenigen Zelllinien Daten verfügbar, welche die HSPG-Interaktion auf der Ebene von Konkurrenzexperimenten mit Heparin beschreiben.

### **5.1.1 Etablierung eines 2-Komponenten-Kompetitionssystems zur Simulation von detargeted Ad-Vektoren**

Eine genaue Kenntnis des Zusammenspiels infektionsvermittelnder Rezeptoren ist eine Voraussetzung für ein optimales Vektordesign. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der primären Rezeptoren CAR und HSPG in Konkurrenzexperimenten *in vitro* mit sättigenden Konzentrationen von löslichem Knob und Heparin an verschiedenen CAR-positiven und CAR-negativen Dauerzellen sowie Primärzellen untersucht. Hierzu wurden ein Luziferase-exprimierendes und ein GFP-exprimierendes Reportervirus eingesetzt. Das Luziferase-exprimierende Virus ermöglichte eine sehr genaue Quantifikation der Reporterexpression im Luminometer. Das GFP-exprimierende Virus bestätigte die mit Ad5.Luc generierten Ergebnisse. So konnte die Möglichkeit von Effekten weitgehend minimiert werden, die eher im Zusammenhang mit der Viruspräparation stehen als mit grundlegenden Eigenschaften von Ad5. Wie gezeigt werden konnte, wurden mit beiden Viruspräparationen die gleichen Ergebnisse erzielt und deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die aus den Experimenten abgeleiteten Schlüsse für Ad5 im allgemeinen zutreffen.

Mittels dieses neuen experimentellen Ansatzes der Doppelkompetition durch Knob und Heparin konnte so gezeigt werden, dass die Infizierbarkeit der getesteten Zelllinien weitestgehend von den Wechselwirkungen mit beiden primären Rezeptoren bestimmt wird. Sind dabei die Wechselwirkungen mit beiden Rezeptoren durch Kompetitoren inhibiert, ist Ad5 nicht mehr in der Lage, Zellen effizient zu transduzieren. Es kann daher angenommen werden, dass Ad5 *in vitro* keine weiteren natürlichen Rezeptoren besitzt, eine unspezifische Aufnahme nicht stattfindet und beide Rezeptoren von allen untersuchten Zelllinien exprimiert werden (Ausnahme: CAR-negative CHO). Darüber hinaus sprechen diese Ergebnisse indirekt dafür, dass

auch die Interaktion der Integrine mit den in der Pentonbasis lokalisierten RGD-Motiven keine signifikante Rolle bei der primären Rezeptorerkennung spielt, da sonst deren Einfluss auf die Transduktionseffizienz hätte detektiert werden müssen. Daher sprechen die Daten hier dafür, dass Integrine keine Rolle als primäre Rezeptoren spielen (Martin et al., 2003; Mizuguchi et al., 2002; Smith et al., 2003).

### **5.1.2 Der Einfluss der primären Rezeptoren auf die Infektion gentherapeutischer Zielzellen mit Ad5.Luc**

*Mesenchymale Stammzellen* und die Dauerzelllinie 293T unterschieden sich in ihrer Infizierbarkeit zwar um den Faktor 1000, doch sind in beiden Fällen ausschließlich CAR und HSPG die infektionsvermittelnden Rezeptoren. Bei diesen Stammzellen führten sowohl Knob wie auch Heparin als Einzelkompetitoren zu einem Rückgang der Reporterexpression auf etwa 5 bzw. 1 % und in Gegenwart beider Kompetitoren auf etwa 0,1 % im Vergleich zur Infektion ohne Kompetitoren. Hieraus kann geschlossen, dass diese Stammzellen sowohl CAR als auch HSPG in geringer Zahl exprimieren, die in synergistischer Weise in der Vermittlung der adenoviralen Infektion zusammenwirken, wobei der Einfluss der HSPG größer ist als der von CAR. Von besonderem Interesse war die Charakterisierung der Infizierbarkeit primärer *glatter Muskelzellen*, dem Zielzelltypus des Retargetings. Diese Primärzellen waren etwa um den Faktor 100 schlechter infizierbar als 293T-Zellen, aber andererseits um den Faktor 10 besser zu infizieren als mesenchymale Stammzellen. In Gegenwart von Knob kam es zu einem Rückgang der Reporterexpression auf etwa 10 %, in Gegenwart von Heparin auf etwa 1 % und bei Doppelkompetition auf unter 0,1 %. Ähnlich wie bei mesenchymalen Stammzellen lässt der starke Rückgang der Reporterexpression bei Einzelkompetition auf einen synergistischen Effekt beider Rezeptoren in der Infektionsvermittlung schließen. Die Abhängigkeit der Infizierbarkeit koronaler glatter Muskelzellen von der CAR-Interaktion konnte bereits von Work *et al.* 2004 gezeigt werden. Allerdings scheint die Abhängigkeit von der HSPG-Interaktion noch signifikanter zu sein als die CAR-Interaktion, da in Gegenwart von Heparin die Transduktionseffizienz im Vergleich zu Knob nochmals um den Faktor 10 stärker inhibiert ist (siehe 7.IV).

Im Hinblick auf eine vaskuläre Therapie repräsentieren Gefäße auskleidende *Endothelzellen* ebenfalls potentielle Zielzellen die in direkten Kontakt mit adenoviralen Vektoren treten können, weshalb auch die Infizierbarkeit primärer koronaler Endothelzellen quantifiziert wurde. Zytometrische Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Primärzellen im Vergleich zu den als CAR-positiv bekannten Dauerzellen HeLa und HepG2 zwar weniger CAR exprimieren, aber dennoch eine moderate Expression aufweisen (Havenga *et al.* 2002). Die Daten aus den Konkurrenzexperimenten dieser Arbeit zeigen, dass CAR bei diesen Primärzellen einen wesentlich größeren Anteil an der Infektionsvermittlung spielt als bei mesenchymalen Stammzellen und primären glatten Muskelzellen. So führt die Konkurrenz mit Heparin nicht zu einem Rückgang der Reporterexpression von etwa 99 %, sondern nur zu einer Reduktion um etwa 40 %, wie sie auch für die meisten CAR-positiven Dauerzellen beobachtet wurde. Die Konkurrenz mit Knob führte zu einem Rückgang der Reporterexpression um etwa 85 % und bewegte sich damit in einem ähnlichen Bereich wie CAR-positive Dauerzellen. Primäre Endothelzellen sind zwar um etwa den Faktor 10 schlechter infizierbar als 293T- bzw. 911-Zellen aber andererseits etwas besser infizierbar als die ebenfalls als CAR-positiv charakterisierten HeLa-Zellen und um den Faktor 100 besser infizierbar als primäre glatte Muskelzellen. Dies kann für eine auf die Infektion von glatten Muskelzellen ausgerichteten adenoviralen Therapie problematisch werden, wenn dabei bevorzugt das Endothelium infiziert wird. Daher erscheint ein CAR-Detargeting für einen entsprechenden potentiellen Therapieansatz in jedem Fall sinnvoll.

### **5.1.3 Nachweis des Einflusses der HSPG-Interaktion auf die Ad5-Infektion durch Heparinase**

Um zu zeigen, dass der Rückgang der Reporterexpression nach Präinkubation der Reporterviren mit Heparin im Zusammenhang mit der Blockade einer Interaktion mit HSPG steht, wurde diese Wechselwirkung durch die Behandlung mit der HSPG-spezifischen Protease Heparinase analysiert. In entsprechenden Experimenten konnten Dechecchi *et al.* unter anderem an CAR-defizienten CHO-Zellen und HSPG-defizienten Raji-Zellen die spezifische Interaktion von C-Typ Ads mit diesen Rezeptoren aufzeigen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Ergebnisse mit CHO-Zellen verifiziert und zusätzlich an den gentherapeutisch interessanten

mesenchymalen Stammzellen und glatten Muskelzellen überprüft werden. Beide Zelltypen verzeichneten neben CHO-Zellen in den Konkurrenzexperimenten mit Heparin den größten Rückgang der Reporterexpression in einem Bereich von 99 %, während der Heparin-vermittelte Einfluss bei CAR-positiven Dauerzellen nur zu einem Rückgang um 20 bis max. 40 % führte. Daher konnte angenommen werden, dass Effekte durch eine Behandlung mit Heparinase insbesondere an mesenchymalen Stammzellen und glatten Muskelzellen zu beobachten sind.

Die Zellen (CASMC und MSC) wurden dazu mit unterschiedlichen Konzentrationen an Heparinase vor der Infektion präinkubiert. Dabei nahm die Transduktionseffizienz mit zunehmender Enzymkonzentration linear ab. Bei der maximal eingesetzten Enzymmenge von 10 U ging die resultierende Reporterexpression um etwa 70 - 75 % zurück und untermauert damit die Rolle der HSPG bei der Infektion dieser Zellen. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass beim Einsatz einer Enzymmenge von 10 U noch keine Sättigung erreicht war. Allerdings war der Einfluss der HSPG auf die Infizierbarkeit bei dieser Enzymmenge bereits sehr deutlich zu sehen und genügte daher als qualitativer Nachweis. Die Präinkubation von CHO-Zellen mit einer Enzymmenge von 10 U führte zu einem Rückgang der Reporterexpression um etwa 80 % bei der niedrigsten verwendeten Virusmenge. Der Einsatz größerer Virusmengen führte zu einem geringeren Rückgang der Reporterexpression und zeigte bei der größten Anzahl eingesetzter Viren im Prinzip keinen Effekt mehr. Diese starke Abhängigkeit der Ergebnisse von der Anzahl der eingesetzten Viren bei der Verwendung von Heparinase wurde im Falle der Konkurrenz mit Heparin nicht beobachtet. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der HSPG anhand der Konkurrenzexperimente mit Heparin quantifiziert und die Experimente mit Heparinase nur zum qualitativen Nachweis der Interaktion verwendet.

### **5.1.4 Semiquantitativer Nachweis viraler DNA unmittelbar nach Internalisierung in An- und Abwesenheit von Knob und Heparin**

Im Rahmen dieses Ansatzes wurde die Menge internalisierter adenoviraler Vektoren anhand der viralen DNA semiquantitativ nachgewiesen. Die Quantifizierung der Transduktionseffizienz durch Messung der Reporterexpression sagt nichts darüber aus, wie viele Viren mittels der beiden primären Rezeptoren überhaupt

internalisieren. Die Reporterexpression stellt den letzten Schritt in der Transduktionskette dar, während die primären Rezeptorinteraktionen den ersten Schritt repräsentieren. Es ist nicht bekannt, ob die nachfolgenden Schritte beim CAR- und HSPG-vermittelten Infektionsweg ähnlich effizient ablaufen. Daher war nicht auszuschließen, dass über den HSPG-vermittelten Aufnahmemechanismus wesentlich mehr Vektoren aufgenommen werden als es die Reporterexpression erwarten lässt. Darüber hinaus sollte in diesem experimentellen Ansatz geprüft werden, ob neben beiden primären Rezeptorinteraktionen eine signifikante unspezifische, in der Degradation mündende Aufnahme stattfindet, was über die Quantifizierung der Reporterexpression nicht nachweisbar ist. Dazu wurde der DNA-Gehalt CAR-positiver HeLa-Zellen und CAR-negativer CHO-Zellen semiquantitativ erfasst. Hierzu wurden die Zellen unmittelbar nach der Virusexposition in An- und Abwesenheit von Knob und Heparin trypsiniert, um an der Membran gebundene und nicht internalisierte Viren zu entfernen. Danach wurden die Zellen aufgeschlossen und die Zellysate für eine PCR mit Ad5-spezifischen Primern eingesetzt. Um die Möglichkeit einer sich der Internalisierung anschließenden sehr schnell ablaufenden Degradation zu minimieren, wurde zum einen eine kurze Expositionszeit von 20 min gewählt und zum anderen die Aufarbeitungsschritte auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt.

Wie gezeigt werden konnte, korrelierte der DNA-Gehalt bei CAR-positiven HeLa-Zellen in An- und Abwesenheit von Kompetitoren in etwa mit den Ergebnissen aus den entsprechenden Quantifikationen der Reporterexpression. Die Infektion in Abwesenheit von Kompetitoren resultierte in der intensivsten DNA-Bande. Die Infektion in Anwesenheit von Heparin ergab eine DNA-Bande die etwa um den Faktor 2 weniger intensiv war als die Bande aus dem Ansatz ohne Kompetitoren. Dieses Ergebnis deckt sich mit der entsprechenden Quantifikation der Reporterexpression, wo es in Anwesenheit von Heparin zu einem Rückgang um etwa 40 % kam, was sich mit dem Faktor 2 aus der DNA-Quantifizierung deckt. Wie von den Ergebnissen der Reporterquantifizierung her zu erwarten, war bei CAR-positiven HeLa-Zellen der Unterschied in der Bandenintensität zwischen dem Ansatz mit Heparin und dem Ansatz mit Knob relativ groß. Genauso passt die sehr schwache DNA-Bande aus dem Ansatz der Doppelkompetition zu der entsprechenden sehr geringen Reporterexpression und unterstreicht die Folgerung aus der Quantifizierung der Reporterexpression, wonach keine

weiteren Rezeptoren von Ad5 genutzt werden und im Prinzip keine signifikante unspezifische Aufnahme stattfindet. Bei CAR-negativen CHO-Zellen wurde aufgrund der CAR-Defizienz auf eine Kompetition mit Knob verzichtet. Die Abwesenheit des Kompetitors Heparin resultierte im Vergleich zu den HeLa-Zellen eine deutlich schwächere DNA-Bande. Dieses Ergebnis korreliert tendenziell mit der in 4.1.2 bestimmten relativen Infizierbarkeit. Hiernach war für die erfolgreiche Transduktion von CHO-Zellen etwa die 2,5fache Virusmenge nötig wie für HeLa-Zellen. Daher kann angenommen werden, dass der HSPG-vermittelte Infektionsweg ähnlich effizient abläuft wie der CAR-vermittelte, da sonst eine wesentlich stärkere Bande hätte resultieren müssen. In Gegenwart von Heparin findet auch bei CHO-Zellen offensichtlich keine Virusaufnahme statt, da auch hier keine definierte Bande im entsprechenden Ansatz resultierte. Somit unterstreichen diese Ergebnisse die Daten aus den Reporterengenquantifizierungen, wonach *in vitro* bei Blockade der Interaktion mit den natürlichen Rezeptoren keine signifikante Virusaufnahme stattfindet; auch keine abortive in der Degradation mündende, die über die Reporterengenquantifizierung nicht hätte erfasst werden können.

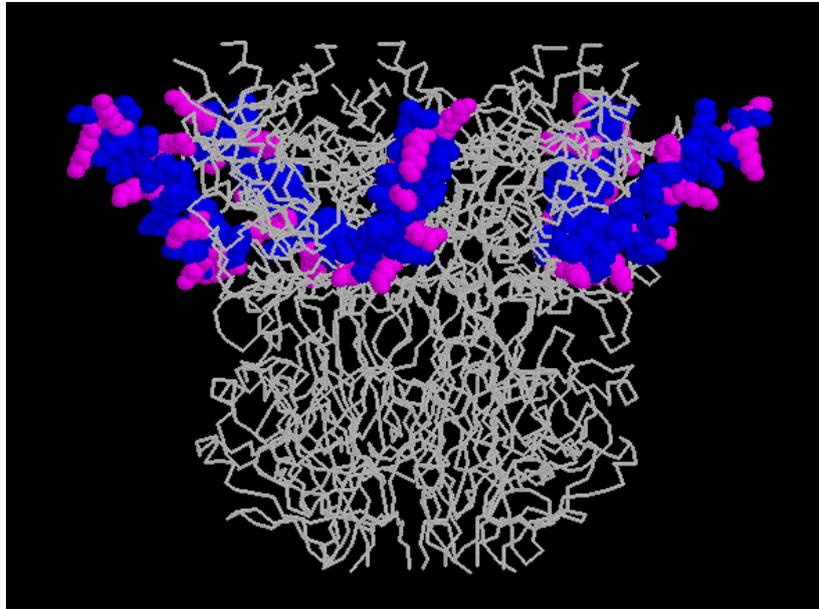
## 5.2 Detargeting

Unter Detargeting wird die Ablation der Interaktionen mit den natürlichen Rezeptoren verstanden.

Im Bezug auf die Interaktion mit den HSPG ist dies allerdings nicht ohne weiteres möglich. Wie unten dargestellt, beeinflusst die Modifikation des KKTK-Motives die sich der primären Rezeptorerkennung anschließenden Infektionsschritte negativ. Aus diesem Grund wurde die Interaktion mit HSPG im Rahmen dieser Arbeit mit Heparin inhibiert. Im Hinblick auf die Modifikation des KKTK-Motives und der HSPG-Interaktion zeigte keine der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien einen nur annähernd so dramatischen Rückgang in der Transduktionseffizienz wie er von anderen Autoren bei der Modifikation des KKTK-Motives beobachtet wurde. Daher untermauern die hier präsentierten Daten die Möglichkeit, dass sich die Modifikation dieses Motives auf Folgeereignisse innerhalb der Infektionskette auswirkt, die unabhängig von der reinen Rezeptorerkennung sind und sich in der Konsequenz auf die Transduktionseffizienz auswirken. Aus diesem Grund kann angenommen

werden, dass die Modifikation des KKTK-Motives nicht für das Detargeting adenoviraler Vektoren geeignet ist. Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass eine Möglichkeit diese Problematik zu umgehen darin bestehen könnte, zu überprüfen, in wie weit die Interaktion der Vektoren mit Heparin auch im Rahmen einer Applikation *in vivo* stabil ist und ob solche mit Heparin komplexierte Vektoren genau wie *in vitro* nicht mehr mit HSPG interagieren können. Im Idealfall könnte ein solches aus zwei Komponenten bestehendes Vektorsystem (Vektor + Heparin) die HSPG-vermittelte Aufnahme verhindern ohne elementare Schritte im weiteren Infektionsverlauf zu stören wie dies bei der Modifikation des KKTK-Motives offensichtlich der Fall ist. Bisher sind keine kristallographischen Daten bekannt, welche diese Interaktion auf Strukturebene zeigen. So hielten Dehecchi *et al.* es durchaus für möglich, dass neben dem KKTK-Motiv noch weitere Motive für die HSPG-Interaktion verantwortlich sein könnten. Solche Motive könnten sich aus der Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins ergeben, indem basische Aminosäuren in räumliche Nähe zueinander treten, die in der Primärstruktur getrennt voneinander vorliegen. Die Autoren betonen bei der Identifikation des KKTK-Motives nur die Primärstruktur in Betracht gezogen zu haben. So konnte Sonja Matt in ihrer Diplomarbeit 2006 zeigen, dass KKTK-modifizierte Viren immer noch durch Heparin inhibierbar sind und deshalb dieses Motiv nicht exklusiv für die HSPG-Interaktion verantwortlich ist. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich im oberen, nach außen exponierten Bereich des Ad5-Pentons in räumlicher Nähe zum KKTK-Motiv des Fiberschaftes ein variabler Loop befindetet, dessen Länge und Sequenz sich zwischen den verschiedenen Subtypen unterscheidet und über dessen Funktion bislang nichts bekannt ist. Bei Ad5 umfasst der variable Loop die Aminosäuren 142-169 und enthält 7 basische Aminosäuren, was einem Anteil von etwa 26 % entspricht. Eine Beteiligung an der Interaktion mit HSPG ist durchaus vorstellbar. Interessant sind in diesem Zusammenhang Ergebnisse, die zeigen, dass subvirale Ad3-Partikel, sogenannte Dodecahedrons, die ausschließlich aus Pentonprotein bestehen, in der Lage sind, effizient Zellen via HSPG zu infizieren. (Vives *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte mittels rekombinant hergestelltem Pentonprotein sowohl dessen Export, als auch dessen Aufnahme in Zellen gezeigt werden, was für eine Rezeptor-Interaktion unabhängig von Fiberschaft und Knobdomäne spricht (Hong *et al.*, 1999; Trotman *et al.*, 2003). Daher böte der Einsatz von Heparin die Möglichkeit, neben dem KKTK-Motiv auch weitere potentiell an der Wechselwirkung

mit HSPG beteiligte und bislang noch nicht identifizierte Bereiche, ohne Modifikationen der Kapsidstruktur „abzuschirmen“.

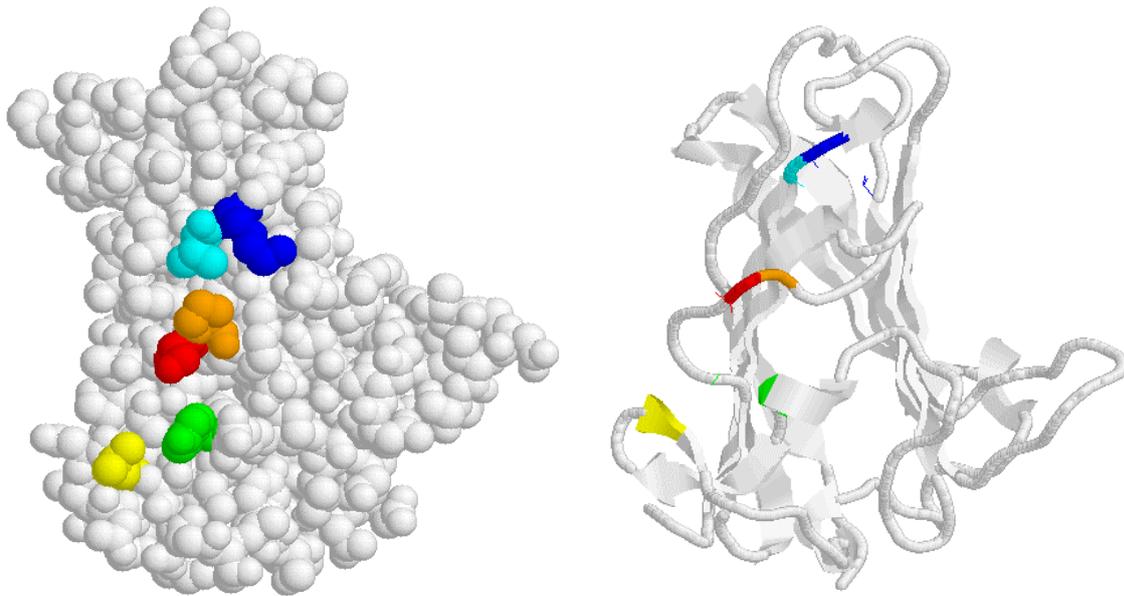


**Abb. 5.1** : Modell des pentameren Pentonproteins in der Seitenansicht. Der variable Loop ist in blau dargestellt und die basischen Aminosäuren innerhalb des Loops magenta. (2BLD; dargestellt mit Rasmol, modifiziert)

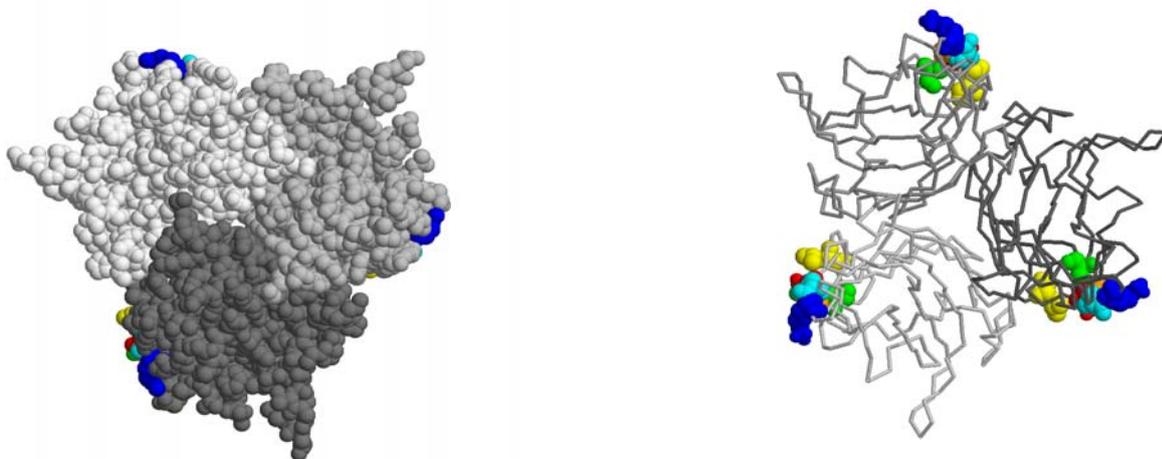
Anders gestalten sich die Verhältnisse bei der Knob-CAR-Interaktion. Diese Interaktion ist auf der Ebene der Kristallstruktur der Knobdomäne (Xia *et al.*, 1994) und der Kristallstruktur der Knobdomäne im Komplex mit CAR (Bewley *et al.*, 1999) bekannt. Von den in der Literatur beschriebenen Aminosäuren, deren Modifikation zu einem signifikanten Rückgang der Knob-CAR-Interaktion führen, wurden diejenigen hier herangezogen und als Kombinationsmutanten analysiert die einen besonders großen Einfluss auf die Interaktion zeigen und eine räumliche Einheit bilden. Alle 6 Aminosäuren liegen quasi auf einer Linie bzw. bilden einen länglichen Bereich. Die Abbildung 5.2 zeigt die Orientierung der ausgetauschten Aminosäuren in raumfüllenden Modellen als Monomer und als funktionelles Trimer. Hierbei handelt es sich um die Aminosäuren S408, P409, V441, K442, Y477 und L485. Es ist zu sehen, dass die recht große basische Seitenkette von K442 sowie die beiden hydrophoben Arme der Seitenkette von V441 in unmittelbare Nähe zu S408 und P409 liegen. Innerhalb dieses Bereiches kommen sich die beiden unpolaren bzw. hydrophoben Aminosäuren P409 und V441 besonders nah, während der basische Rest von K442 seitlich überragt und die obere Begrenzung dieses für die CAR-

Interaktion favorisierten Bereiches bildet. Die Aminosäure S408 nimmt mit seiner OH-Gruppe eine zentrale Position ein und kann eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen. In der räumlichen Abfolge schließt sich Y477 an, eine ebenfalls Wasserstoffbrücken ausbildende polare Aminosäure. Der Abschluss dieser räumlichen Struktur wird von der hydrophoben Aminosäure L485 gebildet. Zusammen mit der ebenfalls hydrophoben Aminosäuren V441 und der unpolaren Aminosäure P409 wird der zu Wasserstoffbrücken befähigte zentrale Bereich regelrecht eingeschlossen.

Es sollte hier diejenige Kombination an Austauschen identifiziert werden, die zu einem weitest gehenden Verlust der Affinität zu CAR führt und eventuell über das Potential von Einzel- und Doppelmutanten hinausgeht. Dieser Ansatz wurde bereits in meiner Diplomarbeit verfolgt, allerdings wurden dort die Aminosäuren V441 und K442 nicht modifiziert, sondern deletiert. Entsprechende Deletionsmutanten waren nicht mehr in der Lage spontan zu trimerisieren und waren nur in ihrer monomeren Form darstellbar. Aus diesem Grund wurden die Mutagenesestudien hier unter Verwendung von Aminosäuremodifikationen anstelle von Deletionen an den Positionen V441 und K442 fortgeführt. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde unter den untersuchten Kombinationen an Austauschen, die Modifikation S408E/P409A als diejenige mit der geringsten Affinität zu CAR identifiziert. Aus diesem Grund wurde die SP-Modifikation in den weiterführenden Studien hier als Referenz verwendet und die Affinität zu CAR aller hier generierten Kombinationsmutanten damit verglichen. Um die Fülle an dabei möglichen Kombinationen einzugrenzen, wurde auf solche verzichtet, die bereits in meiner Diplomarbeit charakterisiert wurden. In dieser Arbeit konnte der Austausch S408E als eine „Schlüsselmodifikation“ identifiziert werden, die im Vergleich zu den anderen dort getesteten Austauschen, den größten Einfluss auf die CAR-Interaktion zeigte. Aus diesem Grund wurde hier bei der Auswahl der Austausche diese Modifikation immer Berücksichtigt.



**Abb. 5.2:** Linke Seite: Raumfüllendes Modell der monomeren Knobdomäne ohne Wasserstoff- und Heteroatome (MSD: 1knb). Rechte Seite: Modell der Sekundärstruktur. Die Modelle zeigen eine Seitenansicht des Moleküls; das untere Ende weist in Richtung Virion. Die modifizierten Aminosäuren im seitlichen Bereich der Rezeptorerkennungsstelle sind farbig markiert. S408 (rot), P409 (orange), V441 (cyan), K442 (blau), Y477 (grün), L485 (gelb).



**Abb. 5.3:** Linke Seite: Raumfüllendes Modell der trimeren Knobdomäne ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Rechte Seite: Modell der Sekundärstruktur; die modifizierten Aminosäuren sind raumfüllend dargestellt (MSD: 1knb). S408 (rot), P409 (orange), V441 (cyan), K442 (blau), Y477 (grün), L485 (gelb).. Die drei Untereinheiten des Homotrimers sind unterschiedlich schattiert. Die Blickrichtung zeigt entlang der dreifachen Symmetrieachse von oben auf die dem Virion zugewandte Seite. Die drei Untereinheiten sind in unterschiedlichen Grautönen schattiert.

Die verschiedenen Kombinationen an Austauschen wurden zunächst auf der Ebene von löslichem Knob-Protein in Konkurrenzexperimenten hinsichtlich ihrer Affinität zu CAR verglichen. Eine verkürzte Form des Knob-Proteins, welches aus der globulären

Knobdomäne und der letzten Wiederholung des Schafts besteht, wurde mittels zielgerichteter Mutagenese modifiziert, bakteriell exprimiert und in Konkurrenzexperimenten hinsichtlich ihrer Affinität zu CAR charakterisiert (4.2.1). Es war zwar möglich alle 6 Kontaktaminoaciden gleichzeitig zu modifizieren und als trimere Knob-Proteine darzustellen, allerdings betrug die aus der bakteriellen Expression resultierende Proteinmenge im Vergleich zu den anderen Kombinationen nur etwa 15 – 20 %, weshalb die Mutante mit 6 Austauschen nicht in den Konkurrenzexperimenten verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Dagegen führte der Austausch von bis zu 5 Aminosäuren zu Proteinmengen, die mit denen von wildtypischem Knob bzw. SP-modifiziertem Knob vergleichbar waren.

In den Konkurrenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass der singuläre Austausch des hydrophoben Valins an Position 441 gegen polares Threonin keinen Einfluss auf die CAR-Interaktion hatte. Entsprechendes modifiziertes Knob-Protein hatte die gleiche Affinität zu CAR wie wildtypisches Knob-Protein. Erst der kombinierte Austausch von Valin gegen das sehr ähnliche Isoleucin und des basischen Lysins an Position 442 gegen die saure Asparaginsäure führte zu einem signifikanten Verlust der Affinität zu CAR, der aber im Vergleich zur SP-Referenz deutlich geringer war. Da Deletionen an den Positionen 441 und 442 die Integrität der trimeren Faserstruktur störten und deshalb nicht auszuschließen war, dass auch Austausche an dieser Stelle Auswirkungen auf die Trimerisierbarkeit haben, wurde bei der singulären Modifikation von V441 eine polare statt einer geladenen Aminosäure ausgewählt. Aus dem gleichen Grund wurde beim Doppelaustausch V441 „nur“ gegen eine andere unpolare Aminosäure ausgetauscht, die sich in der Seitenkette lediglich durch eine CH<sub>3</sub>-Gruppe unterschied, da an Position 442 das basische Lysin gegen eine saure Asparaginsäure ausgetauscht wurde. Alle übrigen Kombinationsmutanten enthielten die „Schlüsselmodifikation“ S408E, die im Rahmen meiner Diplomarbeit als diejenige Mutante mit der geringsten Affinität zu CAR identifiziert wurde. Die Doppelaustausche S408E/V441T und S408E/K442E zeigten eine geringfügig höhere Affinität zu CAR als die SP-Referenz. Die Drei- bis Fünfachmodifikationen wirkten sich entweder genauso auf die Affinität aus wie die SP-Referenz oder hatten eine noch bis zu 20 % geringere Affinität zu CAR (SPKYL- und SPVYL-Mutante). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Aminosäuren S408 und P409 eine zentrale Rolle in der CAR-Interaktion einnehmen, die durch zusätzliche Austausche nur noch geringfügig weiter herabgesetzt werden kann.

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Kombinationen an Austauschen im Kontext viraler Partikel untersucht. Hierzu wurden die Austausche in ein Fiber-Expressionsplasmid eingeführt, welches für die komplette Fiber (Knob-, Schaft- und Schwanzdomäne) kodiert. Die Plasmide mit den modifizierten Fibrogenen dienten dann als Grundlage für die Herstellung von pseudogetypten Viren im transienten Transfektions- und Infektionssystem (3.7.2.2). Auf der Basis dieses Systems war es möglich, genomisch fiberlose virale Partikel herzustellen, die mit den gewünschten modifizierten Fibern ausgestattet waren. Um später mögliche Effekte auszuschließen, die nicht mit den eingeführten Modifikationen zusammenhängen und rein auf der Anzahl der eingebauten modifizierten Fiberproteine beruhen, wurde die Effizienz des Fibereinbaus mittels Westernblot-Analyse und ELISA untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle Viruspräparationen mit genauso vielen Fibern ausgestattet waren, wie genomisch mit einem Fibrogen ausgestattete Kontrollviren, die nicht im transienten Transfektions- und Infektionssystem generiert wurden, sondern „konventionell“ propagiert wurden (4.2.2). Als weiteres Kriterium zur Sicherstellung der Qualität der Viruspräparation wurde der DNA-Gehalt der Vektoren überprüft, wobei gezeigt werden konnte, dass bei allen Viruspräparationen die Partikel einen vergleichbaren DNA-Gehalt aufwiesen (3.7.5.1).

Die Infektiosität der pseudogetypten Viren wurde in Infektionsexperimenten in An- und Abwesenheit von Heparin auf CAR-positiven HeLa-Zellen und CAR-negativen CHO-Zellen untersucht. Wie sich in Vorexperimenten gezeigt hatte, waren für eine Transduktionseffizienz von 80 – 90 % GFP-positiver Zellen im Falle von HeLa 10.000 und im Falle von CHO 25.000 mit wildtypischen Fibern pseudogetypte Viren nötig. Daher wurden in den verschiedenen Experimenten die gleiche Anzahl pseudogetypter Viren mit modifizierten Fibern eingesetzt. In den Kontrollexperimenten mit CAR-negativen CHO-Zellen unterschieden sich pseudogetypte Viren mit wildtypischen bzw. V-, SP- oder SPVKY-modifizierten Fibern nicht in ihrer Transduktionseffizienz. In allen Fällen wurden in Abwesenheit von Heparin etwa 80 % GFP-positive Zellen detektiert und in Anwesenheit von Heparin weniger als 1 %. Damit bestätigte dieses Experiment, dass sich die pseudogetypten Viren qualitativ nicht nur im Hinblick auf die physische Ausstattung mit Fibern glichen, sondern auch eine vergleichbare Infektiosität besaßen. Die Ergebnisse mit HeLa-Zellen zeigten, dass V-modifizierte Viren (etwa 60 % GFP-positive Zellen) eine nur geringfügig schwächere Affinität zu CAR besaßen als

pseudogetypte Viren mit wildtypischen Fibern (etwa 85 % GFP-positiver Zellen). Dagegen waren die SP-modifizierten und die übrigen mehrfach modifizierten pseudogetypten Viren im Vergleich zum Wildtyp erheblich in ihrer Affinität zu CAR herabgesetzt. Der Anteil GFP-positiver Zellen ging in Abwesenheit von Heparin in allen Fällen auf etwa 10 % zurück und sank in Anwesenheit von Heparin auf etwa 1 %, was sich durch die Interaktion mit HSPG-Rezeptoren bzw. deren Blockade erklärt. Der Wert von 10 % GFP-positiver Zellen liegt nur geringfügig über den etwa 6 % Transduktionseffizienz, die im Abschnitt 4.1.4.1 in Anwesenheit von konkurrierendem Knob-Protein im Rahmen der Infektion von HeLa-Zellen mit Ad5.Luc in einer Verdünnungsreihe erzielt wurde. Der Rückgang der Transduktionseffizienz in Anwesenheit von Heparin auf etwa 1 % zeigt, dass keine effektive Infektion über CAR mehr stattfindet. Es kann daher gefolgert werden, dass mit der Modifikation S408E/P409A die Affinität zu CAR soweit herabgesetzt wird, dass zusätzliche Modifikationen diesen Effekt nicht weiter verstärken.

Da innerhalb der Knobdomäne neben der Modifikation von Kontaktaminosäuren für die Interaktion mit CAR zusätzlich Peptide in den HI-Loop im Rahmen des Retargetings inkorporiert werden sollen, könnten sich dann zu viele Modifikationen negativ auf die Integrität der trimeren Fiberstruktur auswirken. Aus diesem Grund wurde die Modifikation S408E/P409A als Basis für das anschließende Retargeting ausgewählt.

### 5.3 Retargeting

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte ist ein adenoviraler Vektor, der durch Modifikation der Kontaktaminosäuren S408E und P409A nicht mehr mit CAR interagiert und durch Präinkubation mit Heparin an der Wechselwirkung mit HSPG gehindert wird, nicht mehr in der Lage *in vitro* effizient zu infizieren. Daher wird durch diese Bedingungen ein detargeted Vektor simuliert, auf dessen Grundlage potentielle spezifische Peptide identifiziert werden können, die dem Vektor einen neuen Tropismus verleihen, um so eine gewebsspezifische Infektion zu ermöglichen, ohne dass Wechselwirkungen mit den beiden nativen primären Rezeptoren stören. Alle bisherigen in der Literatur beschriebenen Ansätze zur Modifikation des adenoviralen Tropismus durch Retargeting (1.3.3 – 1.3.5)

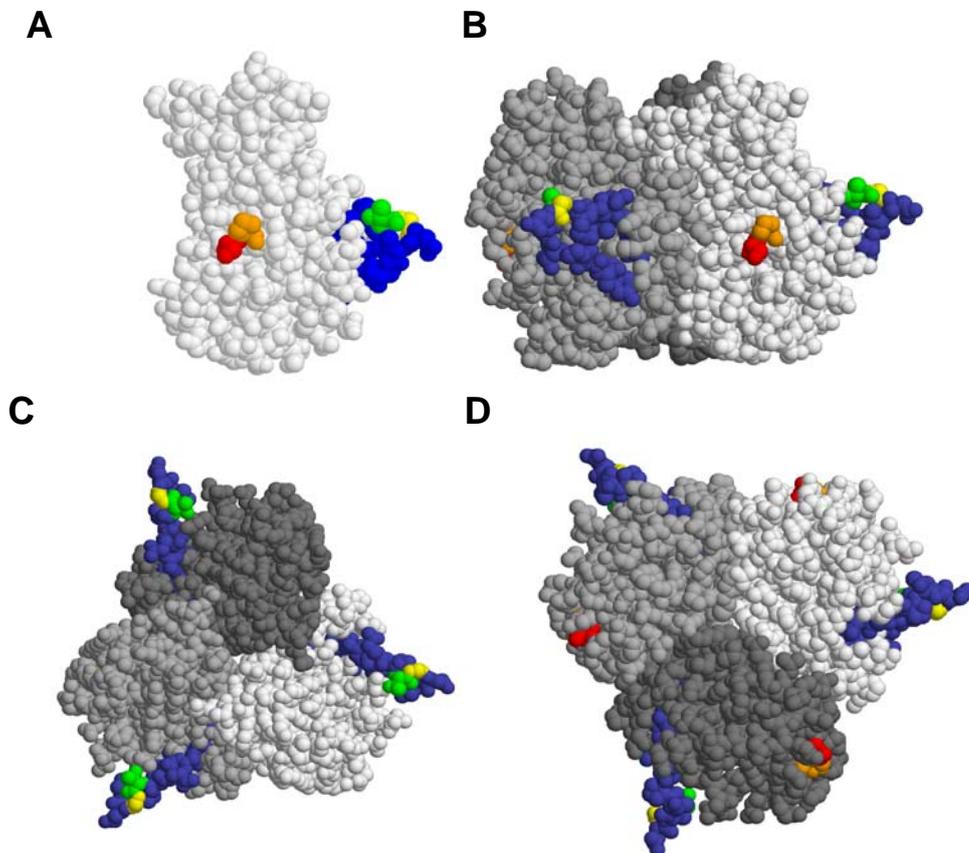
wurden hinsichtlich der Transduktionseffizienz ohne die gleichzeitige Inhibition der Interaktion mit beiden natürlichen Rezeptoren analysiert. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die dort beobachteten Effekte auf die Transduktionseffizienz - ähnlich wie beim Zusammenspiel von CAR und HSPG bei Zelltypen die relativ wenige dieser Rezeptoren exprimieren, wie den mesenchymalen Stammzellen und glatten Muskelzellen - ebenfalls durch einen synergistischen Effekt unter Anteilnahme primärer Rezeptoren vermittelt wird. Zwar wurde von den anderen Untersuchern teilweise die CAR-Interaktion durch Modifikation von Kontaktaminosäuren unterbunden, allerdings hatten in allen Fällen die getesteten retargeted Vektoren die Möglichkeit, zusätzlich mit HSPG zu interagieren. So kann angenommen werden, dass die dabei erzielten Transduktionseffizienzen durch einen synergistischen Effekt von HSPG und der spezifischen Wechselwirkung mit Rezeptoren durch Retargeting-Effekte zustande gekommen sind. Einzig Wickham *et al.* verwendeten in ihren Zellbindungs- und Transduktionsstudien mit Ad-Vektoren, die durch Anfügung eines Polylysin-Peptids an den C-Terminus der Fiber modifiziert waren, lösliches Fiberprotein und Heparin als Kompetitoren (Wickham *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass retargeted Vektoren im Vergleich zum Wildtyp *in vitro* um den Faktor 2 – 3 besser an Zellen binden. Allerdings unterschied sich dieser experimentelle Ansatz von dem hier etablierten System an einem sehr kritischen Punkt. Die Untersucher präinkubierten die Zellen mit Heparin anstatt wie hier die Vektoren. Daher hatte das Heparin keinen Interaktionspartner, weil es als HSPG-Analogon dieses sehr wahrscheinlich selbst nicht inhibiert. Bei der anschließenden Exposition mit Reporterviren bestand also die Möglichkeit entweder mit zellulären HSPG oder mit dem Heparin im Zellkulturmedium zu interagieren. Im Gegensatz dazu wurden hier die Reporterviren direkt mit Heparin präinkubiert, weshalb die HSPG-Interaktionsbereiche bereits mit Heparin abgesättigt waren, bevor die Zugabe zu den Zellen erfolgte.

Dmitriev *et al.* inkorporierten ein RGD-Motiv in den HI-Loop einer wildtypischen Fiber und kompetierten mit Knob-Protein die Infektion CAR-defizienter RD-Zellen (Dmitriev *et al.* 1998). Im Vergleich zum Wildtyp kam es zu einer Steigerung der Transduktionseffizienz um den Faktor 5 – 10. Hierbei berücksichtigten die Untersucher den gerade bei CAR-defizienten Zellen signifikanten Einfluss der HSPG nicht. Es ist daher unklar, in wie weit dieses Motiv die Transduktionseffizienz ohne die „Hilfestellung“ der HSPG beeinflusst. Ein weiteres entsprechendes Beispiel, bei

dem die Interaktion mit den HSPG keine Berücksichtigung fand, ist die Publikation eines HUVEC-spezifischen Epitopes von Nicklin *et al.* 2001. Diese Untersucher identifizierten mittels Phage Display ein potentiell für Endothelzellen spezifisches Epitop und inkorporierten es in den HI-Loop einer SP-modifizierten Fiber. Im Vergleich zu Vektoren mit wildtypischen Fibern erreichte der de- und retargeted Vektor nach Exposition auf HUVEC 50 %, HSVEC 30 % und HepG2-Zellen 3 % der Transduktionseffizienz, während SP-detargeted Vektoren ohne dieses Peptid gegenüber allen untersuchten Zelltypen im gleichen Maße einen erheblichen Rückgang in der Transduktionseffizienz zeigten. Da dieser Rückgang bei Endothelzellen (und hier insbesondere bei HUVEC) im Vergleich zu den HepG2-Zellen durch das eingefügte Peptid erheblich kompensiert werden konnte, folgerten die Autoren, dass dieses Peptid adenoviralen Vektoren eine Spezifität für diesen Zelltyp verleiht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen das RGD-Motiv und das HUVEC-spezifische Peptid sowie verschiedene potentiell für koronale glatte Muskelzellen spezifische Epitope, die im Labor Petersen mittels Phage Display identifiziert wurden, in den HI-Loop einer SP-modifizierten Fiber zwischen die Aminosäuren T542 und G543 eingefügt. Die Abb. 5.4 vermittelt anhand eines Modells der monomeren und trimeren Knobstruktur einen Eindruck von der exponierten Lage des HI-Loops, der für die Insertion und Faltung von eingefügten Peptiden einen gewissen Spielraum bietet. Allerdings konnte hier gezeigt werden, dass durch die Einführung eines publizierten, für vaskuläre glatte Muskelzellen spezifischen Epitops die Integrität der trimeren Struktur gestört wird. Entsprechend modifizierte Fibern waren nicht mehr in der Lage, spontan zu trimerisieren und es erfolgte deshalb kein Einbau der Fibern in das Kapsid, da dieser nur in der trimeren Form möglich ist. Das Peptid wurde mittels Phage Display identifiziert und wurde hinsichtlich seiner Spezifität für VSMC auf der Ebene der Phagen-Transduktion beschrieben (Michon *et al.*, 2002). Die Autoren inkorporierten dieses Peptid nicht in die Fiber um es im Kontext adenoviraler Vektoren zu untersuchen, weshalb dieses Peptid in die Studien hier mit einbezogen wurde. Das Peptid selbst besteht aus 17 Aminosäuren und war damit zwischen 5 und 10 Aminosäuren länger als die übrigen analysierten Peptide. Jedoch kann die Länge alleine nicht für den negativen Einfluss auf die Trimerisierung verantwortlich sein, da gezeigt werden konnte, dass Peptide aus bis zu 100 Aminosäuren in den HI-Loop eingefügt werden können, ohne die Trimerisierung zu beeinflussen (Belousova *et al.*,

2002). Ein möglicher Ansatzpunkt für eine Erklärung könnte aber die Natur der Aminosäurereste bieten; von den 17 Resten haben 13 einen hydrophoben Charakter, was über 75 % entspricht.



**Abb. 5.4:** Raumfüllende Modelle der Knobdomäne ohne Wasserstoff- und Heteroatome: Monomere Form (A) und trimere Form (B-D). (MSD: 1knb, modifiziert). Die Kontakt-Aminosäuren für die CAR-Interaktion S408 (rot) und P409 (orange) sowie der HI-Loop (blau) als Ort des Retargetings, wo zwischen den beiden Aminosäuren T542 (grün) und G543 (gelb) Peptide inkorporiert wurden, sind hervorgehoben. Die Untereinheiten der trimeren Form sind unterschiedlich schattiert. A + B: Seitenansicht, die unteren Enden weisen in Richtung Virion. C + D: Die Blickrichtung zeigt entlang der dreifachen Symmetrieachse von oben (C) bzw. unten (D) auf die dem Virion zugewandte Seite (C) bzw. abgewandte Seite (D).

Mit Ausnahme des VSMC-spezifischen Peptides war es möglich, alle übrigen Peptide erfolgreich in den HI-Loop einzufügen und pseudogetypte de- und retargeted Vektoren herzustellen. Die Analyse der Qualität der Viruspräparationen ergab auch hier, genauso wie im Falle der detargeted Vektoren in Abschnitt 5.2, dass die pseudogetypten Vektoren phänotypisch mit genauso vielen Fibern ausgestattet waren wie die Kontrolle Ad5.Luc. Es konnte deshalb angenommen werden, dass mögliche

Effekte im Hinblick auf Spezifität und Transduktionseffizienz auf die inkorporierten Peptide zurückzuführen sind und nicht mit der Qualität der Viruspräparation zusammenhängen.

Die Analyse der de- und retargeted Viren erfolgte im 2-Komponenten-Kompetitionssystem. Es wurde neben Heparin auch wildtypisches Knob als Kompetitor eingesetzt, um der möglichen Gefahr einer Kontamination der Viruspräparationen mit Adenoviren zu vermeiden, die mit wildtypischen Fibern ausgestattet sind und die Ergebnisse verfälschen könnten.

Es konnte so gezeigt werden, dass das von Nicklin *et al.* publizierte HUVEC-spezifische Peptid auch eine Spezifität für CAEC besitzt. Von allen untersuchten Zelltypen konnte nur im Falle von CAEC eine signifikant höhere Transduktionseffizienz detektiert werden (4 % GFP-positive Zellen) als bei Vektoren die mit wildtypischen Fibern ausgestattet waren (1 % GFP-positive Zellen). Es kann daher festgehalten werden, dass der für diese Interaktion verantwortliche und bislang unbekannt Receptor offensichtlich von verschiedenen Typen von Endothelzellen exprimiert wird. Kein anderes inkorporiertes Epitop war in der Lage diesen Zelltyp ähnlich effizient zu infizieren wie das HUVEC-spezifische Peptid. Daneben zeigten Vektoren die das RGD-Peptid enthielten mit 2,5 % GFP-positiver Zellen ebenfalls eine Spezifität für diesen Zelltyp, weshalb gefolgert werden kann, dass die Präsentation dieses Motives im exponierten HI-Loop eine spezifische Interaktion mit Integrinen ermöglicht. Andererseits sind die in der Pentonbasis lokalisierten RGD-Motive nicht in der Lage, ähnlich effektiv mit Integrinen zu interagieren, da ansonsten eine generell höhere Transduktionseffizienz hätte erwartet werden können; zumal in der Pentonbasis 5 RGD-Motive und in der Knobdomäne des RGD-Vektors dagegen nur 3 RGD-Motive vorhanden sind. Hieraus lassen sich zwei mögliche Erklärungsansätze ableiten. Zum einen könnte die Lokalisierung in der Pentonbasis in unmittelbarer Nähe zum Fiberschaft eine Wechselwirkung aus sterischen Gründen verhindern und zum anderen könnte erst durch die Steigerung der absoluten Anzahl an RGD-Motiven eine effiziente Transduktion vermittelt werden. Andererseits hat sich gezeigt, dass die Deletion des RGD-Motives in der Pentonbasis keinen Einfluss auf die Transduktionseffizienz hat (Mizuguchi *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003a). Neben Endothelzellen war der RGD-Vektor in der Lage, die Transduktionseffizienz im Vergleich zum Wildtyp auf allen getesteten Zelltypen zu

steigern, was im Einklang mit der ubiquitären Präsenz von Integrinen auf vielen Zelltypen steht.

Von den mittels Phage Display identifizierten Peptiden, die auf der Ebene der Phagentransduktion eine potentielle Spezifität für glatten Muskelzellen zeigten, konnten die meisten, im Kontext der adenoviralen Fiber, die Transduktionseffizienz gegenüber diesen Zellen nicht steigern (Ausnahmen: H-Peptid und O-Peptid). Das mittels Phage Display identifizierte H-Peptid steigerte, wenn auch nicht so effektiv, genau wie das RGD-Motiv, die Transduktionseffizienz auf allen untersuchten Zelltypen. Daher kann angenommen werden, dass dieses Peptid entweder eine Interaktion mit Integrinen unabhängig vom RGD-Motiv ermöglicht, oder die Wechselwirkung mit einem Rezeptor gestattet, der genau wie Integrine auf vielen Zelltypen präsent ist. Um die Eigenschaften des H-Peptids weiter zu charakterisieren, wären deshalb vergleichende Infektionsexperimente mit H-Vektoren und RGD-Vektoren hinsichtlich der Wechselwirkung mit Integrinen nötig. So könnte geklärt werden, ob das H-Peptid eine Alternative für den spezifischen Gentransfer in Integrindefiziente Zelltypen darstellen könnte.

Mit dem O-Peptid konnte hier erstmals ein für koronale glatte Muskelzellen spezifisches Peptid identifiziert werden, das inkorporiert in den HI-Loop in der Lage ist, den Gentransfer in diese wichtigen Zielzellen effizient zu steigern. Hierbei war die erzielte Transduktionseffizienz mit etwa 7 % GFP-positiver Zellen noch höher als die mit dem RGD-Motiv erzielten 5 %. Bereits Wickham *et al.* konnten in ihrer oben erwähnten Arbeit den Einfluss des RGD-Motives auf den Gentransfer in glatte Muskelzellen aufzeigen, wobei die Untersucher die entsprechenden Experimente ohne die gleichzeitige Anwesenheit von Kompetitoren durchführten. Im Hinblick auf einen auf glatte Muskelzellen ausgerichteten genterapeutischen Ansatz, hat das hier identifizierte O-Peptid den Vorteil, nicht wie Integrine auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert zu werden und dabei noch effizienter die Transduktion zu ermöglichen. Neben glatten Muskelzellen konnte bei keiner der untersuchten Zelltypen ein gesteigerter Gentransfer beobachtet werden, während das RGD-Motiv den Gentransfer in alle Zelltypen steigerte. Um zu klären, in wie weit der mit dem O-Peptid interagierende unbekanntere Rezeptor neben koronalen glatten Muskelzellen auch von anderen Typen glatter Muskelzellen exprimiert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine immortalisierte glatte Muskelzelllinie der Ratte (A7r5) untersucht. Wie gezeigt werden konnte, vermittelte das O-Peptid auch in diesen Zelltyp einen verstärkten

Gentransfer. Allerdings waren diese Zellen im Unterschied zu den humanen Primärzellen sensitiver gegenüber dem RGD-Peptid, was wie im Falle des Endothelzell-spezifischen Peptids hinsichtlich der unterschiedlichen Transduzierbarkeit von HUVEC und HSVEC, für ein unterschiedlich starkes Expressionsmuster des Rezeptors auf unterschiedlichen glatten Muskelzellen spricht. Die Tatsache, dass diese Rattenzellen diesen Rezeptor exprimieren, eröffnet die Möglichkeit am Tiermodell die transduktionsvermittelnden Eigenschaften des O-Peptids zu charakterisieren. Um aber letztendlich im Hinblick auf den Einsatz entsprechender Vektoren in der Gentherapie genauere Aussagen über das Expressionsmuster des O-Peptid-spezifischen Rezeptors treffen zu können, müssten weitere Experimente mit primären humanen glatten Muskelzellen anderer Herkunft - neben koronalen arteriellen Ursprungs - durchgeführt werden.

Als Fazit kann daher im Hinblick auf die Spezifität festgehalten werden, dass es mittels des hier etablierten 2-Komponenten-Kompetitionssystem möglich war, durch Retargeting einen spezifischen Gentransfer auf der Basis von Ad5 zu vermitteln. Im Hinblick auf die Effizienz des spezifischen Gentransfers wurde unter den gewählten experimentellen Bedingungen in allen Fällen nur eine Transduktionseffizienz von etwa 3 – 7 % erreicht. Dabei wurde jedes mal eine Virusmenge eingesetzt, die ausreichend war um in Abwesenheit beider Kompetitoren über die primären Rezeptoren eine Transduktionseffizienz von etwa 90 % zu erreichen. Es wäre deshalb im Rahmen weiterer Studien zu untersuchen, in wie weit eine Erhöhung des Virustiters von retargeted Vektoren zu einer Steigerung der Transduktionseffizienz über die spezifischen Rezeptoren führt. So könnte dann geklärt werden, ob die spezifischen Rezeptoren von allen Zielzellen in ausreichender Zahl exprimiert werden, um einen Gentransfer in einem therapeutisch relevanten Maß zu ermöglichen.

## 6. Literaturverzeichnis

**Akusjarvi G.** (1993) Proteins with transcription regulatory properties encoded by human adenoviruses. *Trends Microbiol.*, **1**: 163-170.

**Alemaný R, Suzuki K, Curiel DT.** (2000) Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol.*, **81**: 2605-2609.

**Alemaný R, Curiel DT.** (2001) CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther.*, **8**: 1347-1353.

**Amalfitano A, Hauser MA, Hu H, Serra D, Begy CR, Chamberlain JS.** (1998) Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol.*, **72**: 926-933.

**Anderson CW, Young ME, Flint SJ.** (1989) Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu. *Virology*, **172**: 506-512.

**Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., Livingston, D. M. & Eckner, R.** (1995) A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature*, **374**: 81-84.

**Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K.** (1994). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.

**Bailey, A., and Mautner, V.** (1994) Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology*, **205**: 438-452.

**Bauerschmitz GJ, Lam JT, Kanerva A, Suzuki K, Nettelbeck DM, Dmitriev I, Krasnykh V, Mikheeva GV, Barnes MN, Alvarez RD, Dall P, Alemaný R, Curiel DT, Hemminki A.** (2002) Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res.*, **62**: 1266-1270.

**Bayo-Puxan, N., Cascallo, M., Gros, A., Huch, M., Fillat, C., and Alemaný, R.** (2006) Role of the putative heparan sulfate glycosaminoglycan-binding site of the adenovirus type 5 fiber shaft on liver detargeting and knob-mediated retargeting. *J Gen Virol.*, **87**: 2487-2495.

**Behr, M.** Herstellung adenoviraler Knob-Varianten mit veränderter Rezeptorspezifität. (2003) *Diplom-Arbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.*

- Belousova, N., Krendelchtchikova, V., Curiel, D.T., and Krasnykh, V.** (2002) Modulation of adenovirus vector tropism via incorporation of polypeptide ligands into the fiber protein. *J Virol*, **76**: 8621-8631.
- Belousova N, Korokhov N, Krendelshchikova V, Simonenko V, Mikheeva G, Triozzi PL, Aldrich WA, Banerjee PT, Gillies SD, Curiel DT, Krasnykh V.** (2003) Genetically targeted adenovirus vector directed to CD40-expressing cells. *J Virol.*, **77**: 11367-11377.
- Bennett, E. M., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. & Brodsky, F. M.** (1999) Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol.*, **162**: 5049-5052.
- Bergelson, J.M. Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W.** (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, **275**:1320-1323.
- Bergelson, J. M., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M. S., Wickham, T., Crowell, R. L., and Finberg, R. W.** (1998) The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol.*, **72**: 415-419.
- Bergelson, J. M.** (1999) Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem Pharm*, **57**: 975-979.
- Bernards R, Schrier PI, Bos JL, Van der Eb AJ.** (1983) Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. *Virology*, **127**: 45-53.
- Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M.** (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.*, **68**: 729-777.
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL.** (1994) An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci.*, **91**: 8802-8806.
- Bett AJ, Krougliak V, Graham FL.** (1995) DNA sequence of the deletion/insertion in early region 3 of Ad5 dl309. *Virus Res.*, **39**: 75-82.
- Bewley, M.C., Springer, K., Zhang, Y.B., Freimuth, P., and Flanagan, J.M.** (1999) Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science*, **286**: 1579-1583.
- Bilbao, G., Gomez-Navarro, J., and Curiel, D.T.** (1998) Targeted adenoviral vectors for cancer gene therapy. *Adv Exp Med Biol.*, **451**: 365-374.

- Blumenthal R, Seth P, Willingham MC, Pastan I.** (1986) pH-dependent lysis of liposomes by adenovirus. *Biochemistry*, **25**: 2231-2237.
- Boyer, J., Rohleder, K. & Ketner, G.** (1999a) Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology*, **263**: 307-312.
- Boyer, T. G., Martin, M. E., Lees, E., Ricciardi, R. P. & Berk, A. J.** (1999b) Mammalian Srb/mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature*, **399**: 276-279.
- Braithwaite AW, Cheetham BF, Li P, Parish CR, Waldron-Stevens LK, Bellett AJ.** (1983) Adenovirus-induced alterations of the cell growth cycle: a requirement for expression of E1A but not of E1B. *J Virol.*, **45**: 192-199.
- Braithwaite AW, Blair GE, Nelson CC, McGovern J, Bellett AJ.** (1991) Adenovirus E1b-58 kD antigen binds to p53 during infection of rodent cells: evidence for an N-terminal binding site on p53. *Oncogene*, **6**: 781-787.
- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T.** (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, **391**: 597-601.
- BRENNER S, HORNE RW.** (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta.*, **34**: 103-110.
- Brenner M.** (1999) Gene transfer by adenovectors. *Blood*, **94**: 3965-3967.
- Buchsacher, G.L. Jr.** (2001) Introduction to retroviruses and retroviral vectors. *Som Cell Mol Gen.*, **26**:1-11.
- Buning, H., Ried, M.U., Perabo, L., Gerner, F.M., Huttner, N.A., Enssle, J., and Hallek, M.** (2003) Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Therapy*, **10**: 1142-51.
- Caplen, N. J., Higginbotham, J. N., Scheel, J. R., Vahanian, N., Yoshida, Y., Hamada, H., Blaese, R. M., and Ramsey, W. J.** (1999) Adeno-retroviral chimeric viruses as in vivo transducing agents. *Gene Therapy*, **6**: 454-459.
- Burton EA, Wechuck JB, Wendell SK, Goins WF, Fink DJ, Glorioso JC.** (2001) Multiple applications for replication-defective herpes simplex virus vectors. *Stem Cells*, **19**: 358-377.
- Chardonnet Y, Dales S.** (1970) Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. II. Comparative observations on the penetration of types 1, 5, 7, and 12. *Virology*, **40**: 478- 485.

**Chase M, Chung RY, Chiocca EA.** (1998) An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. *Nat Biotechnol.*, **16**: 444-448.

**Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM.** (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.*, **3**: 866-871.

**Chen Y, DeWeese T, Dilley J, Zhang Y, Li Y, Ramesh N, Lee J, Pennathur-Das R, Radzyminski J, Wypych J, Brignetti D, Scott S, Stephens J, Karpf DB, Henderson DR, Yu DC.** (2001) CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity. *Cancer Res.*, **61**: 5453-5460.

**Chiou SK, Tseng CC, Rao L, White E.** (1994a) Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol.*, **68**: 6553-6566.

**Chiou SK, Rao L, White E.** (1994b) Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol.*, **14**: 2556-2563.

**Chiu, C.Y., Mathias, P., Nemerow, G. R., and Stewart, P. L.** (1999) Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin. *J Virol.*, **73**: 6759-6768.

**Chiu, C.Y., Wu, E. Brown, S.L., Von Seggern, D.J., Nemerow, G.R., and Stewart, P.L.** (2001) Structural analysis of a fiber-pseudotyped adenovirus with ocular tropism suggests differential modes of cell receptor interactions. *J Virol.*, **75**: 5375-5380.

**Christ M, Lusky M, Stoeckel F, Dreyer D, Dieterlé A, Michou AI, Pavirani A, Mehtali M.** (1997) Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol Lett.*, **57**: 19-25.

**Chroboczek, J., Ruigrok, R.W., Cusack, S.** (1995) Adenovirus fiber. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **199**: 163-200.

**Chumakov A, Koeffler HP.** (1993) Specific interaction between adenoviral 55-kDa E1B protein and in vivo produced p53 fusion proteins. *Gene*, **131**: 231-236.

**Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM.** (2001) The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci.*, **98**: 15191-15196.

- Dehecchi, M.C., Melotti, P., Bonizzato, A., Santacatterina, M., Chilosi, M., and Cabrini, G.** (2001) Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J Virol*, **75**: 8772-8780.
- Dehecchi, M.C., Tamanini, A., Bonizzato, A., and Cabrini, G.** (2000) Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology*, **268**: 382-390.
- Delehedde M, Lyon M, Vidyasagar R, McDonnell TJ, Fernig DG.** (2002) Hepatocyte growth factor/scatter factor binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates the proliferation of human HaCaT keratinocytes. *J Biol Chem.*, **277**: 12456-12462.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., Kemp, G. D. & Hay, R. T.** (1999) Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitinlike protein SUMO-1. *J Biol Chem.*, **274**: 10618-10624.
- Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C. R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N., and Curiel, D. T.** (1998). An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.*, **72**: 9706-9713.
- Dmitriev IP, Kashentseva EA, Curiel DT.** (2002) Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J Virol.*, **76**: 6893-6899.
- Dorsman, J. C., Teunisse, A. F. A. S., Zantema, A. & van der Eb, A. J.** (1997) The adenovirus 12 E1A proteins can bind directly to proteins of the p300 transcription co-activator family, including the CREB-binding protein CBP and p300. *J Gen Virol.*, **78**: 423-426.
- Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J, Engelhardt JF.** (2000) Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest.*, **105**: 1573-1587.
- Einfeld DA, Brough DE, Roelvink PW, Kovesdi I, Wickham TJ.** (1999) Construction of a pseudoreceptor that mediates transduction by adenoviruses expressing a ligand in fiber or penton base. *J Virol.*, **73**: 9130-9136.
- Engelhardt, J. F., Ye, X., Doranz, B., and Wilson, J. M.** (1994). Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **91**: 6196-6200.
- Esko, J.D., and Lindhal, U.** (2001) Molecular diversity of heparan sulphate. *J Clin Invest*, **108**: 169-173.

**Fager, G., Hansson, G.K., Gown, A.M., Larson, D.M., Skalli, O., and Bondjers, G.** (1989) Human arterial smooth muscle cells in culture: inverse relationship between proliferation and expression of contractile proteins. *In vitro Cell Develop Biol*, **25**: 511-520.

**Falgout B, Ketner G.** (1988) Characterization of adenovirus particles made by deletion mutants lacking the fiber gene. *J Virol.*, **62**: 622-625.

**Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R.C., and Van Der Eb, A.J.** (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Human Gene Therapy*, **7**: 215-222.

**Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC.** (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther.* **9**: 1909-1917.

**Farnig KT, Wu KG, Lee YS, Lin YH, Hwang BT.** (2002) Comparison of clinical characteristics of adenovirus and non-adenovirus pneumonia in children. *J Microbiol Immunol Infect.*, **35**: 37-41.

**Flint J, Shenk T.** (1997) Viral transactivating proteins. *Annu Rev Genet.*, **31**: 177-212.

**Freimuth, P.** (1996) A human cell line selected for resistance to adenovirus infection has reduced levels of the virus receptor. *J Virol*, **70**: 4081-4085.

**Freimuth, P., Springer, K., Berard, C., Hainfeld, J., Bewley, M., and Flanagan, J.** (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V- related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12. *J Virol*, **73** : 1392-1398.

**Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, Shi YX, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP.** (2000) A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene.*, **19**: 2-12.

**Gahéry-Ségard H, Farace F, Godfrin D, Gaston J, Lengagne R, Tursz T, Boulanger P, Guillet JG.** (1998) Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *J Virol.*, **72**: 2388-2397.

**Gall J, Kass-Eisler A, Leinwand L, Falck-Pedersen E.** (1996) Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. *J Virol.*, **70**: 2116-2123.

- Gallagher, J.T.** (2001) Heparan sulphate: growth control with a restricted sequence menu. *The Journal of Clinical Investigation*, **108**: 357-361.
- Germano IM, Fable J, Gultekin SH, Silvers A.** (2003) Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol.* **65**: 279-289.
- Gey, G.O., Coffman, W.D., and Kubicek, M.T.** (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, **12**: 264-265.
- Gilbert, J.R., and Wong-Staal, F.** (2001) HIV-2 and SIV vector systems. *Som Cell Mol Gen.*, **26**: 83-98.
- Gluzman, Y.** (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**: 175-182.
- Gonzalez R, Huang W, Finnen R, Bragg C, Flint SJ.** (2006) Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is required for both regulation of mRNA export and efficient entry into the late phase of infection in normal human fibroblasts. *J Virol.*, **80**: 964-974.
- Goodrum, F. D. & Ornelles, D. A.** (1999) Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J Virol.*, **73**: 7474-7488.
- Goossens PH, Havenga MJ, Pieterman E, Lemckert AA, Breedveld FC, Bout A, Huizinga TW.** (2001) Infection efficiency of type 5 adenoviral vectors in synovial tissue can be enhanced with a type 16 fiber. *Arthritis Rheum.*, **44**: 570-577.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R.** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.*, **36**: 59-74.
- Grand RJ, Turnell AS, Mason GG, Wang W, Milner AE, Mymryk JS, Rookes SM, Rivett AJ, Gallimore PH.** (1999) Adenovirus early region 1A protein binds to mammalian SUG1-a regulatory component of the proteasome. *Oncogene.*, **18**: 449-458.
- Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P., and Helenius, A.** (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, **75**: 477-486.
- Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A.** (1996) The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J.* **15**: 1766-1777.

**Greber UF, Suomalainen M, Stidwill RP, Boucke K, Ebersold MW, Helenius A.** (1997) The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.*, **16**: 5998-6007.

**Greber UF.**, (1998) Virus assembly and disassembly: the adenovirus cysteine protease as a trigger factor. *Rev Med Virol.*, **8**: 213-222.

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

**Hackett NR, Kaminsky SM, Sondhi D, Crystal RG.** (2000) Antivector and antitransgene host responses in gene therapy. *Curr Opin Mol Ther.*, **2**: 376-382.

**Halbert, D. N., Cutt, J. R. & Shenk, T.** (1985) Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol.*, **56**: 250-257.

**Ham, R.G.** (1965) Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Natl Acad Sci.*, **53**: 288-293.

**Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P. L., Wu, H. Y., Wang, J. Y., Nakatani, Y. & Kedes, L.** (1999) Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell*, **96**: 405-413.

**Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. & White, E.** (1996) The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes & Development*, **10**: 461-477.

**Harada, J. N. & Berk, A. J.** (1999) p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol.*, **73**, 5333-5344.

**Hateboer, G., Hijmans, E. M., Nooij, J. B., Schlenker, S., Jentsch, S. & Bernards, R.** (1996) mUBC9, a novel adenovirus E1A-interacting protein that complements a yeast cell cycle defect. *J Biol Chem.*, **271**: 25906-25911.

**Havenga MJ, Lemckert AA, Grimbergen JM, Vogels R, Huisman LG, Valerio D, Bout A, Quax PH.** (2001) Improved adenovirus vectors for infection of cardiovascular tissues. *J Virol.*, **75**: 3335-3342.

**Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, van Meijer M, Germeraad WT, Grimbergen J, van Den Doel MA, Vogels R, van Deutekom J, Janson AA, de Bruijn JD, Uytdehaag F, Quax PH,**

**Logtenberg T, Mehtali M, Bout A.** (2002) Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol.*, **76**: 4612-4620.

**Hay, R. T., Freeman, A., Leith, I., Monaghan, A. & Webster, A.** (1995) Molecular interactions during adenovirus DNA replication. In *The Molecular Repertoire of Adenoviruses*, pp. 31-48. Edited by W. Doerfer & P. Bohm. Berlin: Springer.

**Heise C, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A, Hawkins L, Kirn D.** (2000) An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med.*, **6**: 1134-1139.

**Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K., and Fries, E.** (1980) On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J. Cell Biol.*, **84**: 404-420.

**Hemminki A, Belousova N, Zinn KR, Liu B, Wang M, Chaudhuri TR, Rogers BE, Buchsbaum DJ, Siegal GP, Barnes MN, Gomez-Navarro J, Curiel DT, Alvarez RD.** (2001) An adenovirus with enhanced infectivity mediates molecular chemotherapy of ovarian cancer cells and allows imaging of gene expression. *Mol Ther.*, **4**: 223-231.

**Henry, L.J., Xia, D., Wilke, M.E, Deisenhofer, J., and Gerard, R.D.** (1994) Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*. *J Virol*, **68**: 5239-5246.

**Hesse A, Kosmides D, Kontermann RE, Nettelbeck DM.** (2007) Tropism modification of adenovirus vectors by peptide ligand insertion into various positions of the adenovirus serotype 41 short-fiber knob domain. *J Virol.*, **81**: 2688-2699.

**Hong, J.S., and Engler, J.A.** (1996) Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers. *J Virol.*, **70**: 7071-7078.

**Hong SS, Gay B, Karayan L, Dabauvalle MC, Boulanger P.** (1999) Cellular uptake and nuclear delivery of recombinant adenovirus penton base. *Virology*, **262**: 163-177.

**Horridge, J. J. & Leppard, K. N.** (1998) RNA-binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J Virol.*, **72**: 9374-9379.

**Horwitz, M. S.** (1996) In *'Fields Virology'*, K. D. H. P. Fields (Ed.), p. 2149, Lippincott Raven, Philadelphia, New York.

**Hu MC, Hsu MT.** (1997) Adenovirus E1B 19K protein is required for efficient DNA replication in U937 cells. *Virology*, **227**: 295-304.

**Immonen A, Vapalahti M, Tynnelä K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, Langford G, Murray N, Ylä-Herttuala S.** (2004) AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther.*, **10**: 967-972.

**Iozzo RV.** (2001) Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest.*, **108**: 165-167.

**Jackson T, Ellard FM, Ghazaleh RA, Brookes SM, Blakemore WE, Corteyn AH, Stuart DI, Newman JW, King AM.** (1996) Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol.*, **70**: 5282-5287.

**Jaffe, A.E.** (1997) Endothelial cells and the biology of factor VIII. *New England Journal of Medicine*, **90**: 2027-2036.

**Jakubczak, J.L., Rollence, M.L., Stewart, D.A., Jafari, J.D., Von Seggern, D.J., Nemerow, G.R., Stevenson, S.C., and Hallenbeck, P.L.** (2001) Adenovirus type 5 viral particles pseudotyped with mutagenized fiber proteins show diminished infectivity of coxsackie B-adenovirus receptor-bearing cells. *J Virol*, **75**: 2972-2981.

**Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., and Hansson, G.K.** (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, **6**: 131-138.

**Jones N, Shenk T.** (1979) An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc Natl Acad Sci.*, **76**: 3665-3669.

**Jones, N.** (1995) Transcriptional modulation by the adenovirus E1A gene. *Curr Top Microbiol Immunol.*, **199**: 59-80.

**Jooss K, Ertl HC, Wilson JM.** (1998) Cytotoxic T-lymphocyte target proteins and their major histocompatibility complex class I restriction in response to adenovirus vectors delivered to mouse liver. *J Virol.*, **72**: 2945-2954.

**Kao, F.T., and Puck, T.T.** (1968) Genetics of somatic mammalian cells. VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **60**: 1275-1281.

**Kanerva A, Mikheeva GV, Krasnykh V, Coolidge CJ, Lam JT, Mahasreshti PJ, Barker SD, Straughn M, Barnes MN, Alvarez RD, Hemminki A, Curiel DT.** (2002) Targeting adenovirus to the

serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.*, **8**: 275-280.

**Kass-Eisler A, Leinwand L, Gall J, Bloom B, Falck-Pedersen E.** (1996) Circumventing the immune response to adenovirus-mediated gene therapy. *Gene Ther.*, **3**: 154-162.

**Kawakami Y, Li H, Lam JT, Krasnykh V, Curiel DT, Blackwell JL.** (2003) Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication. *Cancer Res.*, **63**: 1262-1269.

**Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Bruso P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH.** (2000) a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med.*, **6**: 879-885.

**Kimes, B.W., and Brandt, B.L.** (1967) Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Experimental Cell Research*, **98**: 349-366.

**Kirby, I., Davison, E., Beavil, A.J., Soh, C.P., Wickham, T.J., Roelvink, P.W., Kovetsdi, I., Sutton, B.J., and Santis, G.** (2000) Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J Virol*, **74**: 2804-2813.

**Knowles, B.B., Howe, C.C., and Aden, D.P.** (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, **209**: 497-499.

**Kochanek S.** (1999a) High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther.*, **10**: 2451-2459.

**Kochanek S.** (1999b) Development of high-capacity adenoviral vectors for gene therapy. *Thromb Haemost.*, **82**: 547-551.

**Kochanek S, Schiedner G, Volpers C.** (2001) High-capacity 'gutless' adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther.*, **3**: 454-463.

**Koizumi N, Mizuguchi H, Sakurai F, Yamaguchi T, Watanabe Y, Hayakawa T.** (2003) Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and alphav integrin-binding ablation. *J Virol.*, **77**: 13062-13072.

**Koizumi, N., Kawabata, K., Sakurai, F., Watanabe, Y., Hayakawa, T., and Mizuguchi, H.** (2006) Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, alphav integrin, and

heparan sulfate binding reduce in vivo tissue transduction and toxicity. *Human Gene Therapy*, **17**: 264-279.

**Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P.** (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, **290**: 767-773.

**Krasnykh, V. N., Mikheeva, G. V., Douglas, J. T., and Curiel, D. T.** (1996) Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol*, **70**: 6839-6846.

**Krasnykh V., Dmitriev I., Mikheeva G., Miller C.R., Belousova N., and Curiel D.T.** (1998) Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol*. **72**: 1844-52.

**Krasnykh V, Belousova N, Korokhov N, Mikheeva G, Curiel DT.** (2001) Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibrin. *J Virol.*, **75**: 4176-4183.

**Kritz AB, Nicol CG, Dishart KL, Nelson R, Holbeck S, Von Seggern DJ, Work LM, McVey JH, Nicklin SA, Baker AH.** (2007) Adenovirus 5 fibers mutated at the putative HSPG-binding site show restricted retargeting with targeting peptides in the HI loop. *Mol Ther.*, **15**: 741-749.

**Kurachi S, Koizumi N, Sakurai F, Kawabata K, Sakurai H, Nakagawa S, Hayakawa T, Mizuguchi H.** (2007) Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther.*, **14**: 266-274.

**Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

**Lang FF, Bruner JM, Fuller GN, Aldape K, Prados MD, Chang S, Berger MS, McDermott MW, Kunwar SM, Junck LR, Chandler W, Zwiebel JA, Kaplan RS, Yung WK.** (2003) Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. *J Clin Oncol.*, **21**: 2508-2518.

**Lee, B., Dennis, J. A., Healy, P. J., Mull, B., Pastore, L., Yu, H., Aguilar-Cordova, E., O'Brien, W., Reeds, P., and Beaudet, A. L.** (1999) Hepatocyte gene therapy in a large animal: a neonatal bovine model of citrullinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3981-3986.

- Legrand, V., Spehner, D., Schlesinger, Y., Settelen, N., Pavirani, A., and Mehtali, M.** (1999) Fiberless recombinant adenoviruses: virus maturation and infectivity in the absence of fiber. *J Virol*, **73**: 907-919.
- Leissner, P., Legrand, V., Schlesinger, Y., Hadji, D.A., van Raaij, M., Cusack, S., Pavirani, A., and Mehtali, M.** (2001) Influence of adenoviral fiber mutations on viral encapsidation, infectivity and in vivo tropism. *Gene Therapy*, **8**: 49-57.
- Leon, R.P., Hedlund, T., Meech, S.J., Li, S., Schaack, J., Hunger, S.P., Duke, R.C., and De Gregori, J.** (1998) Adenoviral-mediated gene transfer in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci.*, **95**: 13159-13164.
- Li, E., Stupack, D., Bokoch, G. M., and Nemerow, G. R.** (1998) Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol.*, **72**: 8806-8812.
- Li J, Lad S, Yang G, Luo Y, Iacobelli-Martinez M, Primus FJ, Reisfeld RA, Li E.** (2006) Adenovirus fiber shaft contains a trimerization element that supports peptide fusion for targeted gene delivery. *J Virol.*, **80**: 12324-12331.
- Lipinski, K. S., Fax, P., Wilker, B., Hennemann, H., Brockmann, D. & Esche, H.** (1999) Differences in the interactions of oncogenic adenovirus 12 early region 1A and nononcogenic adenovirus 2 early region 1A with the cellular coactivators p300 and CBP. *Virology*, **255**: 94-105.
- Liu D, Shriver Z, Qi Y, Venkataraman G, Sasisekharan R.** (2002) Dynamic regulation of tumor growth and metastasis by heparan sulfate glycosaminoglycans. *Semin Thromb Hemost.*, **28**: 67-78.
- Lonberg-Holm K, Crowell RL, Philipson L.** (1976) Unrelated animal viruses share receptors. *Nature*, **259**: 679-681.
- Look, D. C., Roswit, W. T., Frick, A. G., Gris-Alevy, Y., Dickhaus, D. M., Walter, M. J. & Holtzman, M. J.** (1998) Direct suppression of Stat1 function during adenoviral infection. *Immunity*, **9**: 871-880.
- Louis, N., Eveleigh, C., and Graham, F.L.** (1997) Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, **233**: 423-429.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.R., Farr, A.L., and Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, **193**: 265-275.
- Lyon, M., and Gallagher, J.T.** (1998) Bio-specific sequences and domains in heparan sulphate and the regulation of cell growth and adhesion. *Matrix Biology*, **17**: 485-493.

- Maizel, J.V. Jr., White, D.O., and Scharff, M.D.** (1968) The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology*, **36**: 115-125
- Mannervik, M., Fan, S., Strom, A. C., Helin, K. & Akusjarvi, G.** (1999) Adenovirus E4 open reading frame 4-induced dephosphorylation inhibits E1A activation of the E2 promoter and E2F-1-mediated transactivation independently of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Virology*, **256**: 313-321.
- Martin, K., Brie, A., Saulnier, P., Perricaudet, M., Yeh, P. and Vigne, E.** (2003) Simultaneous CAR- and alpha V integrin-binding ablation fails to reduce Ad5 liver tropism. *Mol Ther.*, **8**: 485-494.
- Martin-Fernandez, M., Longshaw, S.V., Kirby, I., Santis, G., Tobin, M.J., Clarke, D.T., and Jones, G.J.** (2004) Adenovirus type-5 entry and disassembly followed in living cells by FRET, fluorescent anisotropy, and FLIM. *Biophysical Journal*, **87**: 1316-1327.
- Mason, R.G., Sharp, D., Chuang, H.Y., and Mohammad, S.F.** (1977) The endothelium: roles in thrombosis and haemostasis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, **101**: 61-64.
- Mathews MB.** (1975) Genes for VA-RNA in adenovirus 2. *Cell* **6**: 223-229.
- Mathews MB.** (1990) Control of translation in adenovirus-infected cells. *Enzyme*, **44**: 250-264.
- Mathews MB.** (1995) Structure, function, and evolution of adenovirus virus-associated RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol.*, **199**: 173-187.
- Matt S.** (2006) **Mutagenese und *in vitro*-Analyse einer möglichen HSPG-Erkennungssequenz im adenoviralen Fiberschaft.** *Diplom-Arbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.*
- Matthews DA, Russell WC.** (1995) Adenovirus protein-protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *J Gen Virol.*, **76**: 1959-1969.
- Mautner V, Mackay N, Steinhorsdottir V.** (1989) Complementation of enteric adenovirus type 40 for lytic growth in tissue culture by E1B 55K function of adenovirus types 5 and 12. *Virology*, **171**: 619-622.
- Mayr GA, Freimuth P.** (1997) A single locus on human chromosome 21 directs the expression of a receptor for adenovirus type 2 in mouse A9 cells. *J Virol.*, **71**: 412-418.
- Mazzarelli, J. M., Mengus, G., Davidson, I. & Ricciardi, R. P.** (1997) The transactivation domain of adenovirus E1A interacts with the C terminus of human TAFII135. *J Virol.*, **71**: 7978-7983.

- McDonald, C. & Reich, N. C.** (1999) Cooperation of the transcriptional coactivators CBP and p300 with Stat6. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, **19**: 711-722.
- McGill, H.C. Jr.** (1984) George Lyman Duff memorial lecture, Persistent problems in the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, **4**: 443-451.
- Meier O, Greber UF.** (2003) Adenovirus endocytosis. *J Gene Med.*, **5**: 451-462.
- Meloni, A. R., Smith, E. J. & Nevins, J. R.** (1999) A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc Natl Acad Sci.*, **96**: 9574-9579.
- Mercier GT, Campbell JA, Chappell JD, Stehle T, Dermody TS, Barry MA.** (2004) A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein sigma1 targets cells expressing junctional adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci.*, **101**: 6188-6193.
- Michon IN, Hauer AD, von der Thüsen JH, Molenaar TJ, van Berkel TJ, Biessen EA, Kuiper J.** (2002) Targeting of peptides to restenotic vascular smooth muscle cells using phage display in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta.*, **1591**: 87-97.
- Michou AI, Santoro L, Christ M, Julliard V, Pavirani A, Mehtali M.** (1997) Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther.*, **4**: 473-482.
- Miles BD, Luftig RB, Weatherbee JA, Weihing RR, Weber J.** (1980) Quantitation of the interaction between adenovirus types 2 and 5 and microtubules inside infected cells. *Virology*, **105**: 265-269.
- Miller DG, Rutledge EA, Russell DW.** (2002) Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet.*, **30**: 147-148.
- Mitani K, Graham FL, Caskey CT, Kochanek S.** (1995) Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci.*, **92**: 3854-3858.
- Miyazawa, N., Leopold, P.L., Hackett, N.R., Ferris, B., Worgall, S., Falck-Pedersen, E., and Crystal, R.G.** (1999) Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors. *J Virol*, **73**: 6056-6065.
- Miyazawa N, Crystal RG, Leopold PL.** (2001) Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. *J Virol.*, **75**:1387-1400.

**Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Ishii-Watabe A, Uchida E, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T.** (2002) CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther.*, **9**: 769-776.

**Morral N, O'Neal W, Zhou H, Langston C, Beaudet A.** (1997) Immune responses to reporter proteins and high viral dose limit duration of expression with adenoviral vectors: comparison of E2a wild type and E2a deleted vectors. *Hum Gene Ther.*, **8**: 1275-1286.

**Morsy, M. A., Gu, M., Motzel, S., Zhao, J., Lin, J., Su, Q., Allen, H., Franlin, L., Parks, R. J., Graham, F. L., Kochanek, S., Bett, A. J., and Caskey, C. T.** (1998) An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci.*, **95**: 7866-7871.

**Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA.** (2001) Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol.*, **75**: 6969-6076.

**Nakano, M.Y., Boucke, K., Suomalainen, M., Stidwill, R.P., and Greber, U.F.** (2000 a) The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J Virol.*, **74**: 7085-7095.

**Nakano, M.Y., and Greber, U.F.** (2000 b) Quantitative microscopy of fluorescent adenovirus entry. *J Struct Biol.*, **129**: 57-68.

**Nalbantoglu, J., Pari, G., Karpati, G. & Holland, P.C.** (1999). Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1009-1019.

**Neumann, R., Chroboczek, J., and Jacrot, B.** (1988) Determination of the nucleotide sequence for the penton-base gene of human adenovirus type 5. *Gene*, **69**: 153-157.

**Nicklin SA, Von Seggern DJ, Work LM, Pek DC, Dominiczak AF, Nemerow GR, Baker AH.** (2001) Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. *Mol Ther.*, **4**: 534-542.

**Nicklin SA, Dishart KL, Buening H, Reynolds PN, Hallek M, Nemerow GR, Von Seggern DJ, Baker AH.** (2003) Transductional and transcriptional targeting of cancer cells using genetically engineered viral vectors. *Cancer Lett.*, **201**: 165-173.

**Nicol, C.G., Graham, D., Miller, W.H., White, S.J., Smith, T.A., Nicklin, S.A., and Stevenson S.C.** (2004) Effect of adenovirus serotype 5 fiber and penton modifications on in vivo tropism in rats. *Mol Ther.*, **10**: 344-354.

**Novelli A, Boulanger PA.** (1991) Deletion analysis of functional domains in baculovirus-expressed adenovirus type 2 fiber. *Virology*, **185**: 365-376.

**O'Neal, W. K., Zhou, H., Morral, N., Aguilar-Cordova, E., Pestaner, J., Langston, C., Mull, B., Wang, Y., Beaudet, A. L., and Lee, B.** (1998). Toxicological comparison of E2a-deleted and first-generation adenoviral vectors expressing alpha1-antitrypsin after systemic delivery. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1587-1598.

**Owens. G.K.** (1996) *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, chapter 3, p. 401.*

**Pagliari LC, Keyhani A, Williams D, Woods D, Liu B, Perrotte P, Slaton JW, Merritt JA, Grossman HB, Dinney CP.** (2003) Repeated intravesical instillations of an adenoviral vector in patients with locally advanced bladder cancer: a phase I study of p53 gene therapy. *J Clin Oncol.*, **21**: 2247-2253.

**Park F, Ohashi K, Kay MA.** (2000) Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood*, **96**: 1173-1176.

**Parveen Z, Krupetsky A, Engelstädter M, Cichutek K, Pomerantz RJ, Dornburg R.** (2000) Spleen necrosis virus-derived C-type retroviral vectors for gene transfer to quiescent cells. *Nat Biotechnol.*, **18**: 623-629.

**Patel M, Yanagishita M, Roderiquez G, Bou-Habib DC, Oravec T, Hascall VC, Norcross MA.** (1993) Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**: 167-174.

**Paulson, M., Pisharody, S., Pan, L., Guadagno, S., Mui, A. L. & Levy, D. E.** (1999) Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences. *J Biol Chem*, **274**: 25343-25349.

**Peng Z.** (2005) Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther.*, **16**: 1016-1027.

**Perissi, V., Dasen, J. S., Kurokawa, R., Wang, Z., Korzus, E., Rose, D. W., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G.** (1999) Factor-specific modulation of CREB-binding protein acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci.*, **96**: 3652-3657.

- Perricaudet M, le Moullec JM, Tiollais P, Pettersson U.** (1980) Structure of two adenovirus type 12 transforming polypeptides and their evolutionary implications. *Nature.*, **288**: 174-176.
- Philipson, L., Lonberg-Holm, K., and Pettersson, U.** (1968) Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J Virol*, **2**: 1064-1075.
- Pickles RJ, McCarty D, Matsui H, Hart PJ, Randell SH, Boucher RC.** (1998) Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer. *J Virol.*, **72**: 6014-6023.
- Prelich G, Stillman BW.** (1986) Functional characterization of thermolabile DNA-binding proteins that affect adenovirus DNA replication. *J Virol.*, **57**: 883-892.
- Putzer, B. M., Stiewe, T., Parssanedjad, K., Rega, S. & Esche, H.** (2000) E1A is sufficient by itself to induce apoptosis independent of p53 and other adenoviral gene products. *Cell Death and Differentiation*, **7**: 177-188.
- Rauma, T., Tuukkanen, J., Bergelson, J.M., Denning, G., and Hautala, T.** (1999) Rab5 GTPase regulates adenovirus endocytosis. *J Virol.*, **73**: 9664-9668.
- Rekosh, D.M., Russell, W.C., Bellet, A.J. & Robinson, A.J.** (1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* **11**, 283-295.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P. & Hay, R. T.** (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO Journal*, **18**: 6455-6461.
- Roelvink, P.W., Mi Lee, G., Einfeld, D.A., Kovetsdi, I. & Wickham, T.J.** (1999). Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science*, **286**: 1568-1571.
- Ross, R.** (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **362**: 801-809.
- Rostand KS, Esko JD.** (1997) Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun.*, **65**: 1-8.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gillmore, L.K., Parrot, R.H., and Ward, T.G.** (1953) Isolation of a cytogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **84**: 570-573.

**Ruschitzka, F.T., Noll, G., and Luscher, T.F.** (1997) The endothelium in coronary artery disease. *Cardiology*, **88 Suppl. 3**: 3-19.

**Russel, W.C.** (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.*, **81**: 2573-2604.

**Ryan, U.S.** (1985) *Handbooks of Physiology, The Respiratory System. Cherniack, N.S., and Widdicombe, J.G. (Eds.) American Physiological Society, chapter 10, p. 351.*

**Samuel CE.** (1991) Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology*, **183**: 1-11.

**Santis, G., Legrand, V., Hong, S.S., Davison, E., Kirby, I., Imler, J.L., Finberg, R.W., Bergelson, J.M., Mehtali, M., and Boulanger, P.** (1999) Molecular determinants of adenovirus serotype 5 fiber binding to its cellular receptor CAR. *J Gen Virol.*, **80**: 1519-1527.

**Saphire, A. C., Guan, T., Schirmer, E. C., Nemerow, G. R., and Gerace, L.** (2000). Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70. *J. Biol. Chem.* **275**: 4298-4304.

**Schaack J.** (2005) Induction and inhibition of innate inflammatory responses by adenovirus early region proteins. *Viral Immunol.*, **18**: 79-88.

**Scherer, W.F., Syverton, J.T., and Gey, G.O.** (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain Hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.*, **97**: 695-710.

**Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S.** (1998) Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet.*, **18**:180-183.

**Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F.** (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, **110**: 521-529.

**Seth P.** (1994) Mechanism of adenovirus-mediated endosome lysis: role of the intact adenovirus capsid structure. *Biochem Biophys Res Commun.*, **205**: 1318-1324.

**Shayakhmetov, D. M., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G., and Lieber, A.** (2000). Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J. Virol.*, **74**, 2567-2583.

**Shenk T.** (1996). Adenoviridae: The viruses and their replication. In "Fields Virology". (Fields BN, Knipe DM, and Howley PMEds. ) pp. 2111-2148. (Lippincott-Raven: Philadelphia, New York.)

**Shukla D, Spear PG.** (2001) Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest.*, **108**: 503-510.

**Smith, T.A.G., Idamakanti, N., Rollence, M.L., Marshall-Neff, J., Kim, J., Mulgrew, K., Nemerow, G.R., Kaleko, M., and Stevenson, S.C.** (2003 a) Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. *Human Gene Therapy*, **14**: 777-787.

**Smith, T.A.G., Idamakanti, N., Marshall-Neff, J., Rollence, M.L., Wright, P., Kaloss, M., King, L., Mech, C., Dinges, L., Iverson, W.O., Sherer, A.D., Markovits, J.E., Lyons, R.M., Kaleko, M., and Stevenson, S.C.** (2003 b) Receptor interactions involved in adenoviral-mediated gene delivery after systemic administration in non-human primates. *Human Gene Therapy*, **14**: 1595-1604.

**Stevenson, S. C., Rollence, M., White, B., Weaver, L., and McClelland, A.** (1995) Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *J Virol*, **69**: 2850-2857.

**Souberbielle BE, Russell WC.** (1995) Human T cell proliferative response to polypeptides from adenovirus type 2. *J Infect Dis.*, **172**: 1421-1422.

**Stewart, P. L., Burnett, R. M., Cyrklaff, M., and Fuller, S. D.** (1991). Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell*, **67**: 145-154.

**Stonebraker JR, Wagner D, Lefensty RW, Burns K, Gendler SJ, Bergelson JM, Boucher RC, O'Neal WK, Pickles RJ.** (2004) Glycocalyx restricts adenoviral vector access to apical receptors expressed on respiratory epithelium in vitro and in vivo: role for tethered mucins as barriers to luminal infection. *J Virol.*, **78**: 13755-13768.

**Summerford C, Samulski RJ.** (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.*, **72**: 1438-1445.

**Svensson C, Akusjärvi G.** (1984) Adenovirus 2 early region 1A stimulates expression of both viral and cellular genes. *EMBO J.*, **3**: 789-794.

**Svensson, U.** (1985). Role of vesicles during adenovirus 2 internalization into HeLa cells. *J. Virol.*, **55**: 442-449.

**Swisher SG, Roth JA, Komaki R, Gu J, Lee JJ, Hicks M, Ro JY, Hong WK, Merritt JA, Ahrar K, Atkinson NE, Correa AM, Dolormente M, Dreiling L, El-Naggar AK, Fossella F, Francisco R,**

**Glisson B, Grammer S, Herbst R, Huariga A, Kemp B, Khuri FR, Kurie JM, Liao Z, McDonnell TJ, Morice R, Morello F, Munden R, Papadimitrakopoulou V, Pisters KM, Putnam JB Jr, Sarabia AJ, Shelton T, Stevens C, Shin DM, Smythe WR, Vaporciyan AA, Walsh GL, Yin M.** (2003) Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clin Cancer Res.*, **9**: 93-101.

**Teh BS, Ayala G, Aguilar L, Mai WY, Timme TL, Vlachaki MT, Miles B, Kadmon D, Wheeler T, Caillouet J, Davis M, Carpenter LS, Lu HH, Chiu JK, Woo SY, Thompson T, Aguilar-Cordova E, Butler EB.** (2004) Phase I-II trial evaluating combined intensity-modulated radiotherapy and in situ gene therapy with or without hormonal therapy in treatment of prostate cancer-interim report on PSA response and biopsy data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, **58**: 1520-1529.

**Tollefson, A. E., Ryerse, J. S., Scaria, A., Hermiston, T. W. & Wold, W. S.** (1996) The E3-11,6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death : characterization of cells infected with adp mutants. *Virology*, **220**: 152-162.

**Tomko, R.P., Xu, R., and Philipson, L.** (1997) HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci.*, **94**: 3352-3356.

**Tomko, R. P., Johansson, C. B., Totrov, M., Abagyan, R., Frisen, J., and Philipson, L.** (2000) Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res.*, **255**: 47-55.

**Trotman LC, Achermann DP, Keller S, Straub M, Greber UF.** (2003) Non-classical export of an adenovirus structural protein. *Traffic*, **4**: 390-402.

**Valentine RC, Pereira HG.** (1965) Antigens and structure of the adenovirus. *J Mol Biol.*, **13**: 13-20.

**van Beusechem VW, van Rijswijk AL, van Es HH, Haisma HJ, Pinedo HM, Gerritsen WR.** (2000) Recombinant adenovirus vectors with knobless fibers for targeted gene transfer. *Gene Ther.*, **7**: 1940-1946.

**van den Elsen P, de Pater S, Houweling A, van der Veer J, van der Eb A.** (1982) The relationship between region E1a and E1b of human adenoviruses in cell transformation. *Gene*, **18**: 175-185.

**van den Heuvel SJ, van Laar T, Kast WM, Melief CJ, Zantema A, van der Eb AJ.** (1990) Association between the cellular p53 and the adenovirus 5 E1B-55kd proteins reduces the oncogenicity of Ad-transformed cells. *EMBO J.*, **9**: 2621-2629.

**van Raaij, M. J., Louis, N., Chroboczek, J., and Cusack, S.** (1999) Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1.5 Å resolution. *Virology*, **262**: 333-343.

**van Raaij, M. J., Chouin, E., van der Zandt, H., Bergelson, J. M., and Cusack, S.** (2000) Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure with Folding and Design*, **8**: 1147-1155.

**Varga MJ, Weibull C, Everitt E.** (1991) Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J Virol.*, **65**: 6061-6070.

**Vecil GG, Lang FF.** (2003) Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses. *J Neurooncol.*, **65**:237-246.

**Vellinga J, Rabelink MJ, Cramer SJ, van den Wollenberg DJ, Van der Meulen H, Leppard KN, Fallaux FJ, Hoeben RC.** (2004) Spacers increase the accessibility of peptide ligands linked to the carboxyl terminus of adenovirus minor capsid protein IX. *J Virol.*, **78**: 3470-3479.

**Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoeben RC.** (2005) The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J Gen Virol.*, **86**: 1581-1588.

**Vigne E, Mahfouz I, Dedieu JF, Brie A, Perricaudet M, Yeh P.** (1999) RGD inclusion in the hexon monomer provides adenovirus type 5-based vectors with a fiber knob-independent pathway for infection. *J Virol.*, **73**: 5156-5161.

**Vivès, R.R., Lortat-Jacob, H., and Fender, P.** (2006) Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors: ally or foe? *Current Gene Therapy*, **6**: 35-44.

**Vivès, R.R., Lortat-Jacob, H., Chroboczek, J., and Fender, P.** (2004) Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology*, **321**: 332-340.

**Volpers C, Kochanek S.** (2004) Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med.*, **6 Suppl 1**: 164-171.

**Von Seggern, D.J., Kehler, J., Endo, R.I., and Nemerow, G.R.** (1998) Complementation of a fibre mutant adenovirus by packaging cell lines stably expressing the adenovirus type 5 fibre protein. *The J Gen Virol.*, **79**: 1461-1468.

**Von Seggern, D. J., Chiu, C. Y., Fleck, S. K., Stewart, P. L., and Nemerow, G. R.** (1999) A helper-independent adenovirus vector with E1, E3, and fiber deleted: structure and infectivity of fiberless particles. *J Virol*, **73**: 1601-1608.

- Von Seggern, D.J., Huang, S., Fleck, S.K., Stevenson, S.C., and Nemerow, G.R.** (2000) Adenovirus vector pseudotyping in fiber-expressing cell lines: improved transduction of Epstein-Barr virus-transformed B cells. *J Virol*, **74**: 354-362.
- Wade-Martins R, Smith ER, Tyminski E, Chiocca EA, Saeki Y.** (2001) An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. *Nat Biotechnol.*, **19**: 1067-1070.
- Wadell G, Hammarskjöld ML, Winberg G, Varsanyi TM, Sundell G.** (1980) Genetic variability of adenoviruses. *Ann N Y Acad Sci.*, **354**: 16-42.
- Wadell G, Allard A, Johansson M, Svensson L, Uhnoo I.** (1987) Enteric adenoviruses. *Ciba Found Symp.*, **128**: 63-91.
- Walters RW, Grunst T, Bergelson JM, Finberg RW, Welsh MJ, Zabner J.** (1999) Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J Biol Chem.*, **274**:10219-10226.
- Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J., and Welsh, M.J.** (2002) Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intracellular adhesion allowing virus escape. *Cell*, **110**: 789-799.
- Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G.** (1998) Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol.*, **72**: 3455-3458.
- Wang Q, Finer MH.** (1996) Second-generation adenovirus vectors. *Nat Med.*, **2**: 714-716.
- Wang Y, Albert DM, Shenk T.** (1994) Adenovirus E1A expression controlled by the red pigment promoter in transgenic mice: a model for developmental abnormalities of the eye. *Cell Growth Differ.*, **5**: 1061-1068.
- Wang, X., and Bergelson, J.M.** (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J. Virol.*, **73**: 2559-2562.
- Weber J.** (1976) Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing viral proteins. *J Virol.*, **17**: 462-471.
- Webster A, Russell WC, Kemp GD.** (1989) Characterization of the adenovirus proteinase: development and use of a specific peptide assay. *J Gen Virol.*, **70**: 3215-3223.

- Webster A, Russell S, Talbot P, Russell WC, Kemp GD.** (1989) Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity. *J Gen Virol.*, **70**: 3225-3234.
- Weiden, M. D. & Ginsberg, H. S.** (1994) Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc Natl Acad Sci.*, **91**: 153-157.
- Weigel, S. & Dobbelstein, M.** (2000) The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. *J Virol.*, **74**: 764-772.
- Weitzman MD, Ornelles DA.** (2005) Inactivating intracellular antiviral responses during adenovirus infection. *Oncogene*, **24**: 7686-7696.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A., and Nemerow, G.R.** (1993) Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, **73**: 309-319.
- Wickham, T. J., Filardo, E. J., Cheresch, D. A., and Nemerow, G. R.** (1994) Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol.*, **127**: 257-264.
- Wickham, T. J., Roelvink, P. W., Brough, D. E., and Kovesdi, I.** (1996) Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat Biotech.*, **14**: 1570-1573.
- Wickham, T.J., Tzeng, E., Shears, L.L, Roelvink, P.W., Li, Y., Lee, G.M., Brough, D.E., Lizonova, A., and Kovesdi I.** (1997) Increased *in vitro* and *in vivo* gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol*, **71**: 8221-8229.
- Williams, A. F. and Barclay, A. N.** (1988) The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annual Reviews Immunology*, **6**: 381-405.
- Wold WS, Gooding LR.** (1989) Adenovirus region E3 proteins that prevent cytolysis by cytotoxic T cells and tumor necrosis factor. *Mol Biol Med.*, **6**: 433-452.
- Wold, W. S. and Gooding, L. R.** (1991). Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology*, **184**: 1-8.
- Wold WS, Tollefson AE, Hermiston TW.** (1995) E3 transcription unit of adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol.*, **199**: 237-274.

- Wold WS, Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Lichtenstein DL, Tollefson AE.** (1999) Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr Opin Immunol.*, **11**: 380-386.
- Wold, W. M. & Chinnadurai, G.** (2000) Adenovirus proteins that regulate apoptosis. In *DNA Virus Replication*, pp. 200-232. Edited by A. J. Cann. Oxford: Oxford University Press.
- Work, L.M., Nicklin, S.A., Brain, N.R.J., Dishart, K.L., Von Seggern, D.J., Hallek, M., Büning, H., and Baker, A.H.** (2004) Development of efficient viral vectors selective for vascular smooth muscle cells. *Mol Ther.*, **9**: 198-208.
- Wu, E., Fernandez, J., Fleck, S.K., Von Seggern, D.J., Huang, S., and Nemerow, G.R.** (2001) A 50-kDa membrane protein mediates sialic acid-independent binding and infection of conjunctival cells by adenovirus type 37. *Virology*, **279**: 78-89.
- Wu H, Seki T, Dmitriev I, Uil T, Kashentseva E, Han T, Curiel DT.** (2002) Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum Gene Ther.*, **13**: 1647-1653.
- Xia, D., Henry, L.J., Gerard, R.D., and Deisenhofer, J.** (1994) Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure*, **2**: 1259-1270.
- Xia H, Anderson B, Mao Q, Davidson BL.** (2000) Recombinant human adenovirus: targeting to the human transferrin receptor improves gene transfer to brain microcapillary endothelium. *J Virol.*, **74**: 11359-11366.
- Yu DC, Sakamoto GT, Henderson DR.** (1999) Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer Res.*, **59**: 1498-1504.
- Yu DC, Chen Y, Dilley J, Li Y, Embry M, Zhang H, Nguyen N, Amin P, Oh J, Henderson DR.** (2001) Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res.*, **61**: 517-525.
- Zabner J, Freimuth P, Puga A, Fabrega A, Welsh MJ.** (1997) Lack of high affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection. *J Clin Invest.*, **100**: 1144-1149.
- Zantema, A. & van der Eb, A.** (2000) Control of transcription by adenovirus-E1A proteins. In *DNA Virus Replication*, pp. 173-199. Edited by A. J. Cann. Oxford: Oxford University Press.

## 7. Anhang I

### Virale Systeme in der Gentherapie neben Adenoviren:

#### Onkoretroviren:

Onkoretroviren auf der Basis von Moloney Maus Leukämieviren (MLV) sind die ersten Vektoren die im Rahmen der Gentherapie eingesetzt wurden. Retroviren sind RNA-Viren mit einer Packungskapazität für Transgene von bis zu 8 kb. Sie sind nur in der Lage, sich in Teilung befindliche Zellen erfolgreich zu infizieren, da sie ihr genomisches Material nicht durch die Kernmembran bzw. Kernporen transportieren können. Durch Einführung eines Kernlokalisationsignales in das Matrixprotein des C-Typ Retrovirus Spleen Nekrosis Virus (SNV), war dieses in der Lage nicht proliferierende Zellen erfolgreich zu transduzieren (Parveen *et al.*, 2000). Onkoretroviren besitzen nur ein geringes inflammatorisches Potential und integrieren ihr in DNA überschriebenes genetisches Material in das Genom der infizierten Wirtszelle. Die Integration findet vornehmlich in transkriptionell aktiven Bereichen statt, wodurch ein gewisses onkogenes Potential gegeben ist. Ungeachtet dessen eignen sich Vektoren auf dieser Basis für Anwendungen, die einen persistierenden Gentransfer in mitotische Zellen verlangen. Der Tropismus dieser Vektoren wurde durch Retargeting erweitert. Hierzu wurde das MLV Envelope Glycoprotein mit dem G-Protein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) pseudogetyped, wodurch sich der Tropismus dieser Vektoren erheblich erweitert hat. Ein weiterer positiver Effekt dieser Modifikation ist zum einen die Erhöhung der Stabilität der viralen Partikel und zum anderen die Möglichkeit die Vektoren in hohen Titern aufzukonzentrieren.

#### Lentiviren:

Die meisten lentiviralen Vektoren wurden auf der Basis von HIV hergestellt. Sie besitzen eine Packungskapazität von 8 kb, ein geringes inflammatorisches Potential und integrieren ihr in DNA umgeschriebenes genomisches Material stabil in das Genom der Wirtszelle (Gilbert und Wong-Staal, 2001). Genau wie bei den

onkoretroviralen Vektoren sind viele lentivirale Vektoren mit VSV-G pseudogetyped. Im Unterschied zu onkoretroviralen Vektoren sind Lentiviren per se in der Lage, ruhende Zellen erfolgreich zu infizieren. In diesem Zusammenhang konnte allerdings gezeigt werden zeigen, dass nicht alle ruhenden Zellen, wie beispielsweise Leberzellen, effizient von lentiviralen Vektoren transduziert werden (Park *et al.* 2000). Mittels lentiviraler Vektoren konnte erstmals am Modell des Primaten die erfolgreiche Behandlung der Parkinson Krankheit durch gentherapeutischen Transfer von GDNF demonstriert werden (Kordower *et al.*, 2000). Nachteilig für den Einsatz lentiviraler Vektoren auf der Basis von HIV-1 ist deren Eigenschaft, genauso wie Onkoretroviren, ihr Genom bevorzugt in aktiv transkribierte Gene zu integrieren, wodurch sich das potentielle Risiko der Tumorentstehung erhöht (Schröder *et al.*, 2002).

### **Herpesviren:**

Herpesvirale Vektoren auf der Basis von HSV-1 besitzen unter den viralen Vektoren mit bis über 100 kb die größte Packungskapazität. Replikationsdefiziente HSV-1 Vektoren können bis zu 40 kb Fremd-DNA aufnehmen und Amplikon-Vektoren, die das HSV-1 Packungssignal und den HSV-1 „Origin of Replication“ enthalten, können über 100 kb DNA aufnehmen. So konnte mittels herpesviraler Amplikons *in vitro* humane Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase mit einer Größe von 115 kb erfolgreich exprimiert werden (Wade-Martins *et al.*, 2001). HSV-1 besitzt einen ausgesprochenen Neurotropismus, daher finden diese Vektoren Anwendung bei neuropathologischen Erkrankungen. HSV-1 integriert seine DNA nicht in das Genom der Wirtszelle, sondern liegt in episomaler Form vor. In Neuronen können HSV-1 Vektoren dauerhaft persistieren und ihr Transgen exprimieren, während in anderen Zelltypen nur eine transiente Transgenexpression stattfindet (Burton *et al.*, 2001).

HSV-1 kodiert eine Reihe von Proteinen, die im Rahmen der Virusreplikation in postmitotischen Zellen eine Rolle spielen. Diese Proteine besitzen eine Homologie zu zellulären Enzymen wie Thymidinkinase und Ribonukleotidreduktase. Diese Enzyme liegen in der G1/S-Phase des Zellzyklus vor und werden ebenfalls in Krebszellen dauerhaft exprimiert. Dagegen werden sie in ruhenden Zellen nicht exprimiert. HSV-1 mit Mutationen in den entsprechenden viralen Genen sollten sich daher effizient in

Tumorzellen replizieren. Dieser Effekt konnte mittels „replikationsdefizienten“ HSV-1 Vektoren in der Tumorthherapie gezeigt werden (Chase *et al.*, 1998).

## **AAV:**

Diese Einzelstrang-DNA Viren besitzen mit weniger als 5 kb von allen viralen Vektoren die geringste Packungskapazität. Der als gentherapeutischer Vektor am meisten verwendete Subtyp ist AAV-2. Durch Pseudotyping kann die AAV-2 Vektor-DNA mit Kapsiden anderer Subtypen verpackt werden, wodurch sich der Tropismus dieser Vektoren erheblich erweitert (Grimm und Kay, 2003). Eine weitere positive Eigenschaft dieser Vektoren besteht darin, dass sie weder inflammatorisch noch pathogen sind.

Die genetische Information dieser Viren wird zu weniger als 10 % in das Genom der Wirtszelle integriert und der Großteil der Genexpression erfolgt von peristierenden Episomen, wie am Beispiel von Hepatozyten gezeigt konnten (Nakai *et al.* 2001). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Integration der Vektor-DNA von AAV gewöhnlich mit der Reorganisation in Verbindung mit Deletionen und Translokationen chromosomaler DNA assoziiert ist (Miller *et al.* 2002). Daher ist die Verwendung von AAV als integrierender Vektor nicht optimal. Ein weiterer Nachteil ergibt sich aufgrund der Tatsache, dass diese Vektoren nur eine maximale Kapazität von 2,4 kb für ein Transgen bieten und deshalb der Einsatz dieser Viren durch die Größe des therapeutischen Genes limitiert ist. Allerdings konnte dieser Umstand dadurch umgangen werden, indem das Transgen auf zwei Vektoren aufgeteilt und ein Gemisch beider AAV-Vektoren appliziert wurde (*in vivo*-Konkatemerisierung) (Duan *et al.* 2000).

## 7. Anhang II

### Adenovirale Vektoren:

#### Vektoren der ersten und zweiten Generation:

Bei adenoviralen Vektoren der ersten Generation ist das E1-Gen deletiert. Darüber hinaus kann in diesen Vektoren das E3-Gen teilweise oder ganz deletiert sein (Bett *et al.*, 1994). Die Expression des E1-Gens ist abhängig von zellulären Aktivatoren. Die E1-Genprodukte dienen zum einen als Aktivator für die Expression der anderen frühen Gene E2 bis E4 und zum anderen als Modulatoren der zellulären Genexpression und Proliferation (Akusjarvi 1993; Flint und Schenk 1997). Durch die Entfernung des E1-Genes sind diese Vektoren replikationsdefizient und in ihrem onkogenen Potential retardiert. Das E3-Gen kodiert für verschiedene Proteine die inhibitorisch auf apoptotische Prozesse wirken (Wold *et al.*, 1995 und 1999). Die replikationsdefizienten Viren werden in Helferzellen wie 293 oder 911 bzw. PER.C6 propagiert, die stabil mit dem E1-Gen transfiziert sind (Graham *et al.*, 1977; Fallaux *et al.*, 1996 und 1998). Die Deletion des E1-Genes führt allerdings nicht zu einer vollständigen Suppression der Expression nachgeschalteter Gene (Jones *et al.*, 1979; Schaack 2005). Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass diese „Basalexpression“ zu einer zellulären Immunreaktion führt, in deren Verlauf die transfizierte Zelle eliminiert wird. Entsprechend ist die Expression des Transgens bei Vektoren der ersten Generation in einem immunkompetenten Organismus zeitlich sehr limitiert und nach zwei bis drei Wochen nicht mehr nachweisbar (Wang *et al.*, 1994).

Bei Vektoren der zweiten Generation sind neben E1/3 die frühen Gene E2A, E2B und E4 deletiert. Hierdurch erhöht sich zum einen die Packungskapazität und zum anderen ist die Immunogenität durch eine Reduktion der „Basalexpression“ im Vergleich zu Vektoren der ersten Generation weiter herabgesetzt (Amalfitano *et al.*, 1998).

### **Gutless (helferabhängige)-Vektoren:**

Diese Vektoren enthalten vom ursprünglichen Ad-Genom nur noch die *cis*-aktiven Bereiche, die Inverted Terminal Repeats und das Packungssignal  $\psi$ , die für die Initiation der DNA-Replikation und die Verpackung der Vektor-DNA in die Kapside notwendig sind. Hieraus ergibt sich eine Steigerung der Packungskapazität auf bis zu 37 kb (Mitani *et al.*, 1995; Kochanek, 1999a, 1999b; Kochanek *et al.*, 2001). Die Propagierung dieser Vektoren ist abhängig von E1-exprimierenden Helferzellen. Diese werden mit den Gutless-Vektoren und gleichzeitig mit Helferviren transduziert. Die Helferviren stellen bis auf E1 alle andenoviralen Genfunktionen, einschließlich der Strukturgene *in trans* zur Verfügung (Volpers und Kochanek, 2004). Im Vergleich zu Vektoren der ersten und zweiten Generation ist die Immunogenität von Gutless-Vektoren weiter reduziert (Morrall *et al.*, 1997; Morsy *et al.*, 1998). Hierdurch erhöht sich die Zeitdauer der Transgenexpression im transfizierten Gewebe. So konnte gezeigt werden, dass Gutless-Vektoren noch ein Jahr nach Applikation in der Mausleber ihr Transgen exprimieren. Daher eignen sich Vektoren dieses Typs insbesondere für Anwendungen, bei der eine möglichst lange Transgenexpression erwünscht ist (Schiedner *et al.*, 1998).

### **Onkolytische Ad-Vektoren:**

Ein idealer onkolytischer Vektor sollte sich speziell in Tumorzellen vermehren, weitere Tumorzellen infizieren und so den Tumor eliminieren. Bei einer unspezifischen Aufnahme in gesundes Gewebe sollten diese Vektoren nicht in der Lage sein zu replizieren. Viele Tumorzellen besitzen Mutationen in den für die Kontrolle des Zellzyklus wichtigen Genen p53 und/oder pRb. ONYX-015 ist ein konditional replizierender Vektor, der eine Mutation im Gen für das 55 kDa E1B-Protein trägt. Dieses Protein bindet und inaktiviert p53, wodurch letztendlich der Zellzyklus aktiviert wird. ONYX-015 sollte sich daher in p53-defizienten Tumorzellen effizient vermehren und die Tumorzelle lysieren, während in p53-positiven Zellen keine produktive Vermehrung stattfinden sollte. Die Fähigkeit von ONYX-015 im Rahmen der Tumorthherapie die Tumormasse signifikant zu reduzieren, wurde in Verbindung mit den Chemotherapeutika Cisplatin und 5-Fluoruracil gezeigt (Khuri *et*

*al.*, 2000). Eine entsprechende Therapie unter Verwendung von ONYX-015 ohne den kombinierten Einfluss von Chemotherapeutika war bislang nicht erfolgreich. Neben ONYX-015 wurden Vektoren mit einer zusätzlichen Deletion im Bereich der Rb-Bindedomäne CR2 des E1A-Gen hergestellt. Diese Vektoren sollten dann nur noch speziell in pRB-negativen Tumorzellen replizieren (Heise *et al.*, 2000; Fueyo *et al.*, 2000).

## **Transkriptionelles Targeting**

Ein ganz anderer Ansatz um speziell Tumorzellen mittels Ad-Vektoren zu eliminierenden basiert auf dem sogenannten transkriptionellen Targeting. Hierbei wird die Expression von E1A und E1B unter die Kontrolle eines für Tumore spezifische Promotoren und Enhancer gestellt wird. Die Funktionalität dieses Prinzips konnte im Zusammenhang mit Prostatakrebs mit Vektoren, die mit PSA-Promotoren oder Probasin-Promotoren ausgestattet waren, gezeigt werden (Chen *et al.*, 2001). Der replikationsdefiziente Ad-Vektor Gendicine trägt im deletierten E1-Bereich das Gen für p53 unter der Kontrolle des Rous Sarkoma Virus Promotors. Dieser Vektor wird in China erfolgreich bei der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen eingesetzt (Peng *et al.*, 2005). Auf der Basis von p53 werden zur Zeit weitere klinische Studien zur Behandlung von Gehirntumoren, Glioma, Lungenkrebs, Blasenkrebs und Eierstockkrebs mit und ohne gleichzeitige Chemo- oder Radiotherapie durchgeführt (Vecil und Lang, 2003; Lang *et al.*, 2003; Swisher *et al.*, 2003; Pagliaro *et al.*, 2003). Andere E1-deletierte Vektoren exprimieren das Prodrug-aktivierende Suizid-Gen HSV-Thymidinkinase. Entsprechende Studien bei der Behandlung von Gliomen und Prostatakrebs zeigen vielversprechende Ergebnisse (Germano *et al.*, 2003; Immonen *et al.*, 2004; Teh *et al.*, 2004).

## 7. Anhang III

Eigenschaften der frühen Genprodukte:					
Protein	MW/AS	IP	Funktion	Interaktionen	Literatur
E1A 12S + E1A 13S	26 kDa 243 AS 40 kDa 289 AS	Sug1	Untereinheit des Proteasomen-Komplexes zur Proteolyse von p53	Durch die Interaktion mit Sug1 kann p53 nicht degradiert werden und wird hierdurch stabilisiert.	Grand <i>et al.</i> , 1999
		Rb	Tumorsuppressorproteine	Bindung an RB105, p107, p130: Mitoseinduktion, Immortalisierung	Brehm <i>et al.</i> , 1998 Zanema & van der Eb, 2000
		TBP + TAF's	Initiation der Transkription	Bindung an das TATA-Bindende-Protein (TBP) und TBP assoziierten Proteinen (TAF's), hierdurch Beeinflussung der Regulation der Transkription	Mazzarelli <i>et al.</i> , 1997;
		CtBP	Ko-Repressor der Transkription	Über Bindung des C-terminalen Motives PLDLS an das Protein CtBP kann dieses nicht mehr mit Rb interagieren.	Meloni <i>et al.</i> , 1999
		STAT-1	Notwendig zur Induktion einer Interferon-Antwort	Durch Bindung an p300/CBP-Proteine wird die Aktivierung des Transaktivators STAT-1 inhibiert. Außerdem wird die durch Kaspase vermittelte Induktion der Apoptose inhibiert.	Look <i>et al.</i> , 1998; McDonald & Reich 1999; Paulson <i>et al.</i> , 1999; Putzer <i>et al.</i> , 2000
		p300	Familie von Transaktivatoren, die Schlüsselprozesse der Transkription und des Zellzyklus regulieren.	Durch Bindung an p300/CBP-Proteine werden deren transaktivierenden Eigenschaften beeinflusst, wodurch es zur Induktion des Zellzyklus kommt.	Arany <i>et al.</i> 1995; Jones 1995; Dorsman <i>et al.</i> 1997; Lipinski <i>et al.</i> 1999
		pCAF	Durch Acetyltransferase-Aktivität Steuerung der Nukleosomenstruktur	Durch Bindung an pCAF wird die Nukleosomenstruktur moduliert, was sich auf die Transkription auswirkt.	Paulson <i>et al.</i> , 1999; Putzer <i>et al.</i> , 2000; Hamamori <i>et al.</i> , 1999; Perissi <i>et al.</i> , 1999
		UBC9	Das Protein UBC9 Bestandteil des enzymatischen SUMO-Stoffwechselweges.	Durch die Interaktion mit UBC9 wird die Modifikation und Stabilität von SUMO beeinflusst, was sich auf die Stabilität von p53 auswirkt.	Desterro <i>et al.</i> , 1999; Hateboer <i>et al.</i> , 1996; Rodriguez <i>et al.</i> , 1999
		Sur2	Sur2 ist ein Multi-Proteinkomplex	Durch die Interaktion mit Sur2 wird die Transkription viraler Gene aktiviert.	Boyer <i>et al.</i> , 1999
		E1B 19 K	20 kDa	Bcl-2	Blockade der p53-abhängigen Apoptose
Rolle bei der DNA-Replikation				Hu und Hsu, 1997	
E1B 55K	55 kDa	p53	Transaktivator der letztendlich die Arretierung der Zelle in G1-Phase bewirkt und Apoptose induzieren kann	Durch direkte Bindung an p53 wird die Ausbildung funktioneller Tetramere inhibiert.	van den Heuvel <i>et al.</i> , 1990; Braithwaite <i>et al.</i> , 1991; Chumakov und Koeffler, 1993.
		Regulation der Transkription und des RNA-Transportes zusammen mit E4/34 kDa			Harada und Berk, 1999; Horridge und Leppard, 1998.; Gonzalez <i>et al.</i> , 2006
E2A	72 kDa	Bindet an einzelsträngige DNA und Rolle bei Replikation			Prelich und Stillman, 1986
E2B	80 kDa	Vorläuferprotein (pTP) des terminalen Proteins (TP, 55 kDa), Primer der Replikation			Hay <i>et al.</i> , 1995
	140 kDa	DNA-Polymerase			
E3-gp 19k	19 kDa	Verringerung von MHC-I auf der Zelloberfläche			Bennett <i>et al.</i> , 1999
E3-14.7K	14,7 kDa	Reduktion der Sensitivität gegenüber TNF-vermittelter Apoptose			Wold & Chinnadurai, 2000
E3-10.4K + E3-14.5K	10,4 kDa 14,5 kDa	Inhibition der TNF-vermittelten Apoptose durch Inaktivierung bzw. Internalisierung der TNF-Rezeptoren und der Degeneration von Fas			Wold & Chinnadurai, 2000
E3-11.6K	11,6 kDa	"Adenovirus-Death-Protein" (ADP) bewirkt die Zellyse und Freisetzung der viralen Partikel			Tollefson <i>et al.</i> , 1996
E3-6.7K + E3-12.5K	6,7 kDa 12,5 kDa	Funktion beider Proteine bislang unbekannt			Bett <i>et al.</i> , 1995
E4-ORF1	125 AS	Induktion von Mammatumoren bei Ad9-infizierten Nagern			Weigel und Dobbstein, 2000; Boyer <i>et al.</i> , 1999a; Goodrum und Ornelles, 1999; Weiden und Ginsberg, 1994; Halbert <i>et al.</i> , 1985; Mannervik <i>et al.</i> , 1999
E4-ORF2	17 kDa/136 AS	Zytoplasmatisches Protein mit unbekannter Funktion			
E4-ORF3	11 kDa	Regulation des mRNA-Transport zusammen mit E4-ORF6 und E1B/55 kDa			
E4-ORF4	14 kDa	Inhibition von E1A; Aktivierung von E2F; Bindung an DNA Proteinkinasen (PK)			
E4-ORF6	34 kDa	Regulation des mRNA-Transport zusammen mit E4-ORF6 und E1B/55 kDa; Bindung an DNA PK			
E4-ORF6/7	17 kDa	Modulation der E2F-Aktivität			

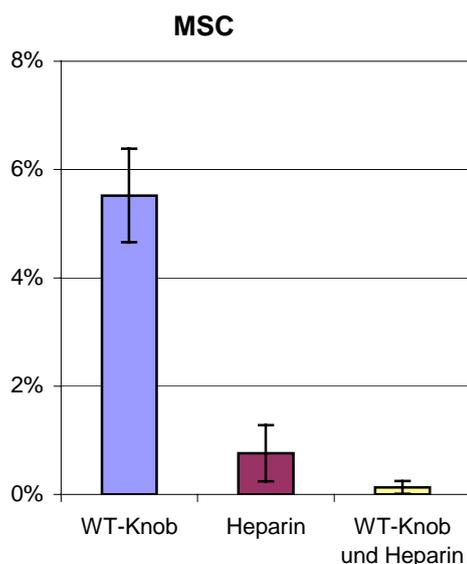
**Abb. 7.1:** Eigenschaften und Funktionen der adenoviralen frühen Gene E1-E4 in tabellarischer Form. IP= Interaktionspartner.(in Anlehnung an Russell, 2000; modifiziert und erweitert)

## 7. Anhang IV

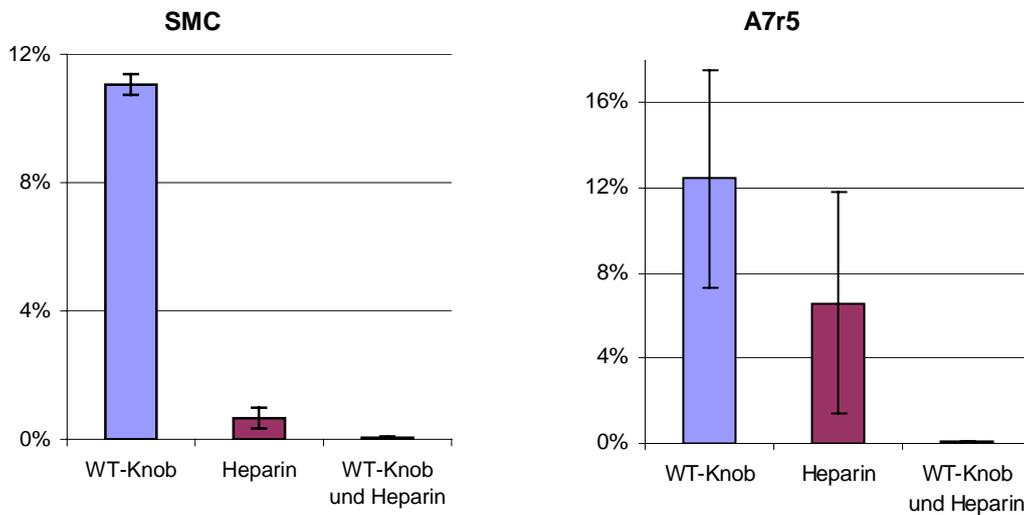
### Ergebnisse der Ad5.Luc-Kompetitionsexperimente mit Heparin und Knob *in vitro*

Die im Abschnitt 4.1.4.1 in der Abb. 4.5 zusammengefassten Ergebnisse aus den Kompetitionsexperimenten sind hier für jede Zelllinie einzeln gezeigt. In jeweils 4 parallelen Ansätzen wurden die Zellen in Abwesenheit von Kompetitoren, in Anwesenheit von Knobprotein bzw. Heparin sowie in Anwesenheit beider Kompetitoren mit Ad5.Luc infiziert und die Reporterexpression quantifiziert. Die Reporterexpression aus Infektionen ohne Kompetitoren wurde mit 100 % gleichgesetzt und die Reporterexpression aus den Infektionen mit Kompetitoren hierauf bezogen. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Zur besseren Darstellung ist in den einzelnen Graphiken die Skalenhöhe dem jeweiligen Messbereich angepasst.

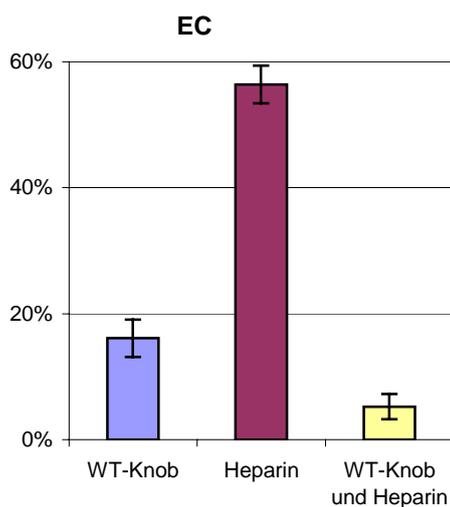
#### Mesenchymale Stammzellen



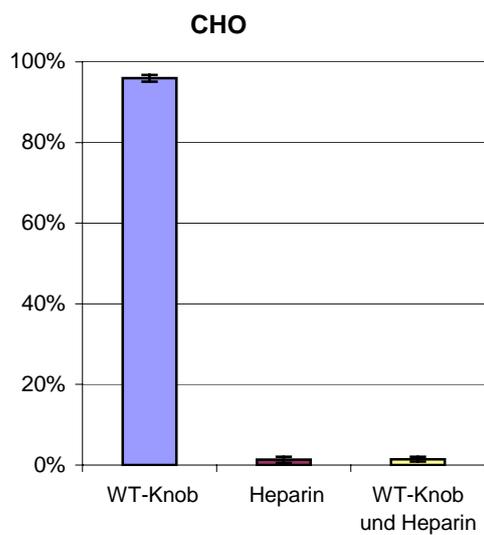
- Von allen untersuchten Zelltypen am schlechtesten infizierbar.
- Beide Rezeptoren vermitteln die Infektion ausgesprochen synergistisch.
- HSPG spielen eine größere Rolle als CAR.
- *in vitro* sind keine weiteren effizienten primären Rezeptoren verfügbar.

Glatte Muskelzellen:

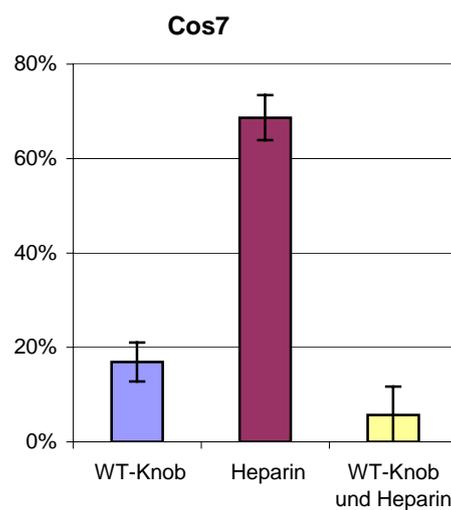
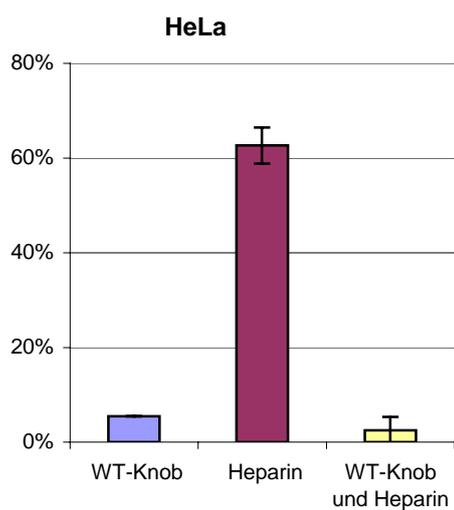
- Die Infektion glatter Muskelzellen wird von Ad5 durch Knobprotein und Heparin gattungsübergreifend in vergleichbarer Weise kompetiert, daher kann von einem ähnlichen Expressionsmuster der primären Rezeptoren bei diesen Zellen ausgegangen werden
- Beide Rezeptoren vermitteln die Infektion ausgesprochen synergistisch.
- HSPG spielen eine größere Rolle als CAR, insbesondere bei humanen Primärzellen.
- *in vitro* sind keine weiteren effizienten primären Rezeptoren verfügbar.

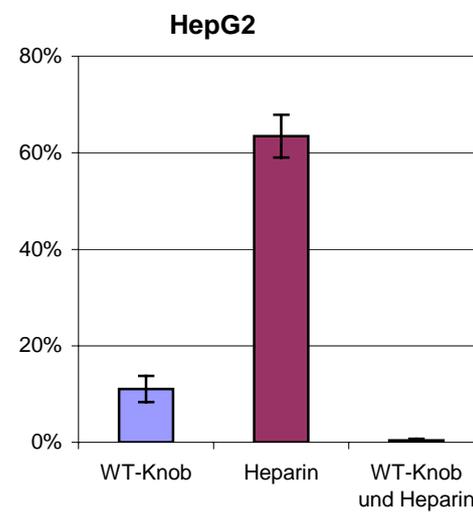
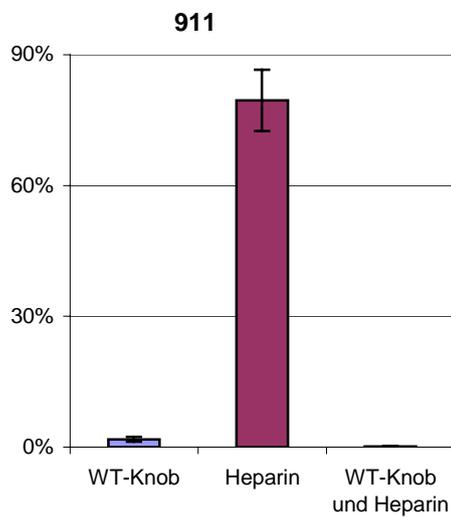
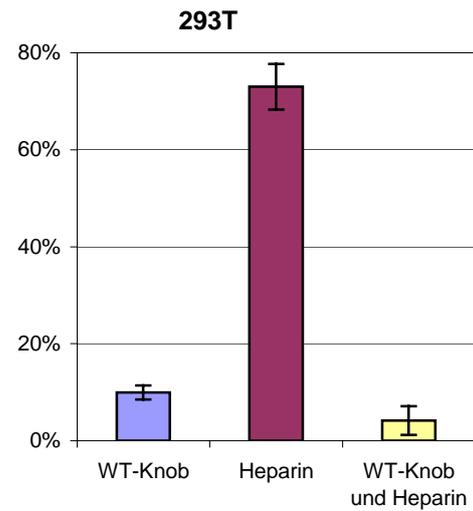
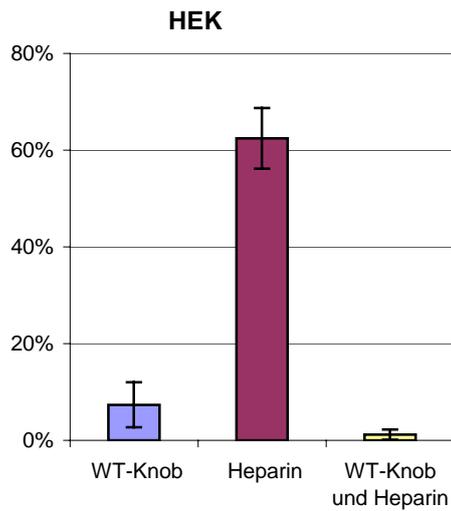
Primäre Endothelzellen:

- Für die Infektion von Endothelzellen sind weniger Partikel pro Zelle notwendig als für die Infektion glatter Muskelzellen.
- Endothelzellen sind als moderat CAR-exprimierend beschrieben.
- Die Anzahl an CAR ist ausreichend, den Ausfall der HSPG-Interaktion besser zu kompensieren als in Stammzellen und glatten Muskelzellen.
- Die Infektion von Endothelzellen wird maßgeblich von CAR vermittelt.
- *in vitro* sind keine weiteren effizienten primären Rezeptoren verfügbar.

CAR-defiziente Dauerzellen: CHO

- Die Infektion CAR-negativer CHO-Zellen erfolgt ausschließlich durch die HSPG-Interaktion.

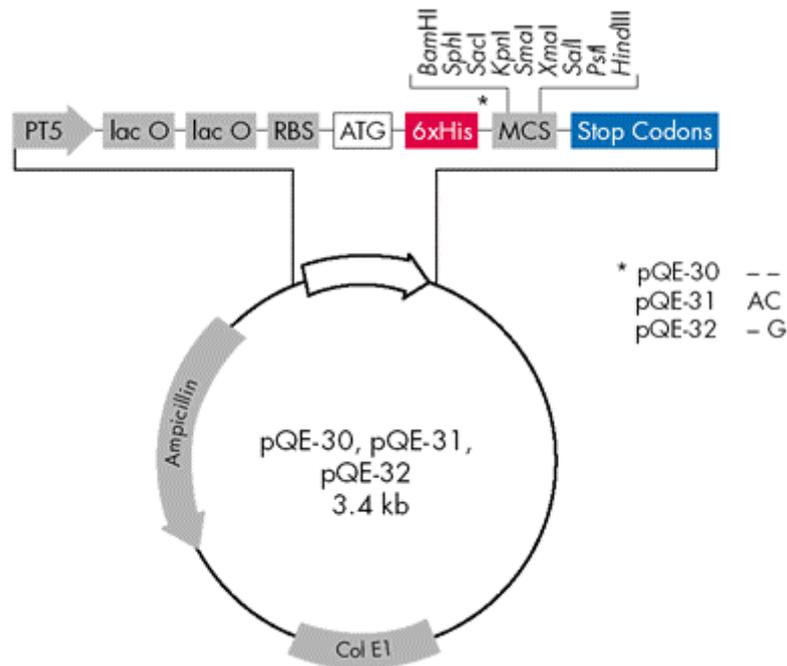
CAR-positive Dauerzellen:



- Der Einfluss der HSPGs auf die Infizierbarkeit CAR-positiver Dauerzellen (und CAR-positiver primärer Endothelzellen) ist nur sehr moderat. Heparin kann die Reporter-gen-Expression nur um 20 – 40 % reduzieren.
- Die Präsenz von CAR bestimmt im wesentlichen die Infizierbarkeit dieser Zellen.
- *in vitro* sind keine weiteren effizienten primären Rezeptoren verfügbar.

## 7. Anhang V

### Der Vektor pQE30-Ad5 Knob



**Abb. 7.2:** Vektorkarte des prokaryotischen Expressionsvektors pQE-30 (Qiagen). Die DNA-Sequenz von Knob ist über BamHI und HindIII in den pQE-30 Vektor kloniert.

Nukleotidsequenz/Aminosäuresequenz der 22. Wiederholung des Schafts und der Knobdomäne; die Aminosäuren die im Detargeting modifiziert wurden sind rot hinterlegt.

```

BamHI GGA TCC ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta
          G  A  I  T  I  G  N  K  N  D  D  K  L

act ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat
  T  L  W  T  T  P  D  P  S  D  N  C  R  L  N

gca gag aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc
  A  E  K  D  A  K  L  T  L  V  L  T  K  C  G

agt caa ata ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt
  S  Q  I  L  A  T  V  S  V  L  A  V  K  G  S

ttg gct cca ata tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata
  L  A  P  I  S  G  T  V  Q  S  A  H  L  I  I
  
```

aga ttt gac gaa aat gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac  
R F D E D G V L L N N S F L D

cca gaa tat tgg aac ttt aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca  
P E **Y** W N F R N G D **L** T E G T

gcc tat aca aac gct gtt gga ttt atg cct aac cta tca gct tat  
A Y T N A V G F M P N L S A Y

cca aaa tct cac ggt aaa act gcc aaa agt aac att gtc agt caa  
P K S H G K T A K S N I V S Q

gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa cct gta aca cta acc att  
V Y L N G D K T K P V T L T I

aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac aca act cca agt gca  
T L N G T Q E T G D T T P S A

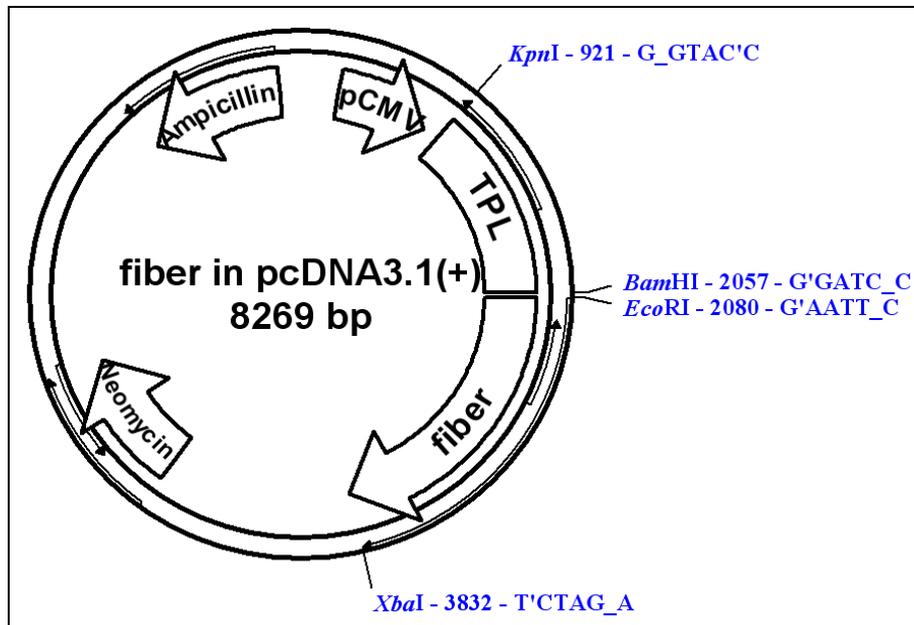
tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc cac aac tac att  
Y S M S F S W D W S G H N Y I

aat gaa ata ttt gcc aca tcc tct tac act ttt tca tac att gcc  
N E I F A T S S Y T F S Y I A

caa gaa **tAA GCTT**  
Q E \*

## 7. Anhang VI

### Der Vektor pcDNA3.1(+) mit einklonierter TPL- und Fibersequenz



**Abb. 7.3:** Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1(+) mit einklonierter TPL- und Fibersequenz. Die komplette Ad5 Fibersequenz ist über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XbaI in den Vektor einkloniert. Zusätzlich ist über KpnI und BamHI eine dreiteilige adenovirale Führungssequenz (TPL) einkloniert. Unten ist die DNA-Sequenz des einklonierten Fragments angegeben. (Nach Sonja Matt, Diplomarbeit 2006)

Nukleotidsequenz der TPL und des Fibergens (komplett):

```

KpnI
GGTA CCACTCTCTT CCGCATCGCT GTCTGCGAGG

951 GCCAGCTGTT GGGGTGAGTA CTCCCTCTGA AAAGCGGGCA TGA CTTCTGC
1001 GCTAAGATTG TCAGTTTCCA AAAACGAGGA GGATTTGATA TTCACCTGGC
1051 CCGCGGTGAT GCCTTTGAGG GTGGCCGCAT CCATCTGGTC AGAAAAGACA
1101 ATCTTTTTTGT TGTCAAGCTT GGTGGCAAAC GACCCGTAGA GGGCGTTGGA
1151 CAGCAACTTG GCGATGGAGC GCAGGGTTTG GTTTTTGTCTG CGATCGGCGC
1201 GCTCCTTGGC CGCGATGTTT AGCTGCACGT ATTCGCGCGC AACGCACCGC
1251 CATTGCGGAA AGACGGTGGT GCGCTCGTCTG GGCACCAGGT GCACGCGCCA
1301 ACCGCGGTTG TGCAGGGTGA CAAGGTCAAC GCTGGTGGCT ACCTCTCCGC
1351 GTAGGCGCTC GTTGGTCCAG CAGAGGCGGC CGCCCTTGCG CGAGCAGAAT
1401 GCGGTTAGG GGTCTAGCTG CGTCTCGTCC GGGGGTCTG CGTCCACGGT

```

1451 AAAGACCCCG GGCAGCAGGC GCGCGTCGAA GTAGTCTATC TTGCATCCTT  
1501 GCAAGTCTAG CGCCTGCTGC CATGCGCGGG CGGCAAGCGC GCGCTCGTAT  
1551 GGGTTGAGTG GGGGACCCCA TGGCATGGGG TGGGTGAGCG CGGAGGCGTA  
1601 CATGCCGCAA ATGTCGTAAA CGTAGAGGGG CTCTCTGAGT ATTCCAAGAT  
1651 ATGTAGGGTA GCATCTTCCA CCGCGGATGC TGGCGCGCAC GTAATCGTAT  
1701 AGTTCGTGCG AGGGAGCGAG GAGGTCGGGA CCGAGGTTGC TACGGGCGGG  
1751 CTGCTCTGCT CGGAAGACTA TCTGCCTGAA GATGGCATGT GAGTTGGATG  
1801 ATATGGTTGG ACGCTGGAAG ACGTTGAAGC TGGCGTCTGT GAGACCTACC  
1851 GCGTCACGCA CGAAGGAGGC GTAGGAGTCG CGCAGCTTGT TGACCAGCTC  
1901 GGCGGTGACC TGCACGTCTA GGGCGCAGTA GTCCAGGGTT TCCTTGATGA  
1951 TGCATACTT ATCCTGTCCC TTTTTTTTCC ACAGCTCGCG GTTGAGGACA  
2001 AACTCTTCGC GGTCTTTTCCA GTACTCTTGG ATCGGAAACC CGTCGGCCTC  
2051 CGAACGGGAT *Bam*HI CCACTAGTCC AGTGTGGTGG *Eco*RI AATTCATGAA GCGCGCAAGA  
2101 CCGTCTGAAG ATACCTTCAA CCCC GTGTAT CCATATGACA CGGAAACCGG  
2151 TCCTCCAACT GTGCCTTTTC TTA CTCTCC CTTTGTATCC CCCAATGGGT  
2201 TTCAAGAGAG TCCCCCTGGG GTACTCTCTT TGCGCCTATC CGAACCTCTA  
2251 GTTACCTCCA ATGGCATGCT TGCGCTCAAA ATGGGCAACG GCCTCTCTCT  
2301 GGACGAGGCC GGCAACCTTA CCTCCCAAAA TGTAACCACT GTGAGCCCAC  
2351 CTCTCAAAAA AACCAAGTCA AACATAAACC TGGAAATATC TGCACCCCTC  
2401 ACAGTTACCT CAGAAGCCCT AACTGTGGCT GCCGCCGCAC CTCTAATGGT  
2451 CGCGGGCAAC AACTCACCA TGCAATCACA GGCCCCGCTA ACCGTGCACG  
2501 ACTCCAAACT TAGCATTGCC ACCCAAGGAC CCCTCACAGT GTCAGAAGGA  
2551 AAGCTAGCCC TGCAAACATC AGGCCCCCTC ACCACCACCG ATAGCAGTAC  
2601 CCTTACTATC ACTGCCTCAC CCCCTCTAAC TACTGCCACT GGTAGCTTGG  
2651 GCATTGACTT GAAAGAGCCC ATTTATACAC AAAATGGAAA ACTAGGACTA  
2701 AAGTACGGGG CTCCTTTGCA TGTAACAGAC GACCTAAACA CTTTGACCGT  
2751 AGCAACTGGT CCAGGTGTGA CTATTAATAA TACTTCCTTG CAAACTAAAG  
2801 TTA CTGAGC CTTGGGTTTT GATTCACAAG GCAATATGCA ACTTAATGTA  
2851 GCAGGAGGAC TAAGGATTGA TTCTCAAAAC AGACGCCTTA TACTTGATGT  
2901 TAGTTATCCG TTTGATGCTC AAAACCAACT AAATCTAAGA CTAGGACAGG  
2951 GCCCTCTTTT TATAAACTCA GCCCACAAC TGGATATTAA CTACAACAAA  
3001 GGCCTTTACT TGTTTACAGC TTCAAACAAT TCCAAAAAGC TTGAGGTTAA

---

3051 CCTAAGCACT GCCAAGGGGT TGATGTTTGA CGCTACAGCC ATAGCCATTA  
3101 ATGCAGGAGA TGGGCTTGAA TTTGGTTCAC CTAATGCACC AAACACAAAT  
3151 CCCCTCAAAA CAAAAATTGG CCATGGCCTA GAATTTGATT CAAACAAGGC  
3201 TATGGTTCCT AAAC TAGGAA CTGGCCTTAG TTTTGACAGC ACAGGTGCCA  
3251 TTACAGTAGG AAACAAAAAT AATGATAAGC TAACTTTGTG GACCACACCA  
3301 GCTCCATCTC CTAAC TGTAG ACTAAATGCA GAGAAAGATG CTAAACTCAC  
3351 TTTGGTCTTA ACAAATGTG GCAGTCAAAT ACTTGCTACA GTTTCAGTTT  
3401 TGGCTGTTAA AGGCAGTTTG GCTCCAATAT CTGGAACAGT TCAAAGTGCT  
3451 CATCTTATTA TAAGATTTGA CGAAAATGGA GTGCTACTAA ACAATTCCTT  
3501 CCTGGACCCA GAATATTGGA ACTTTAGAAA TGGAGATCTT ACTGAAGGCA  
3551 CAGCCTATAC AAACGCTGTT GGATTTATGC CTAACCTATC AGCTTATCCA  
3601 AAATCTCACG GTAAA ACTGC CAAAAGTAAC ATTGTCAGTC AAGTTTACTT  
3651 AAACGGAGAC AAAACTAAAC CTGTAACACT AACCAT TACA CTAAACGGTA  
3701 CACAGGAAAC AGGAGACACA ACTCCAAGTG CATACTCTAT GTCATTTTCA  
3751 TGGGACTGGT CTGGCCACAA CTACATTAAT GAAATATTTG CCACATCCTC  
3801 TTACACTTTT TCATACATTG CCCAAGAATA *XbaI*  
*ATCTAGA*

## 7. Anhang VII

### Ergebnis der Sequenzanalyse zur Identifikation des SCMV-Promotors und des GFP-Reportergens aus pCSGFP3. (Zur Verfügung gestellt von AG Holstein)

**Alignment:** Simian cytomegalovirus major immediate early transcription unit  
(Length=11860) 942nts

ACCESSION U38308 L06819 M16019 U18245

#### SCMV/GFP1

```

Query 389 AGCCAATTCAATATGGCGTATATGGACTCATGCCAATTCAATATGGTGGATCTGGACCTG 448
          |||
SCMV 3879 AGCCAATTCAATATGGCGTATATGGACTCATGCCAATTCAATATGGTGGATCTGGACCTG 3938

Query 449 TGCCA 453
          |||
SCMV 3939 TGCCA 3943
  
```

#### SCMV/GFP2

```

Query 4 TATGGACTCATGCCAATTCAATATGGTGGATCTGGACCTGTGNCAATTCAATATGGCGTA 63
          |||
SCMV 3899 TATGGACTCATGCCAATTCAATATGGTGGATCTGGACCTGTGCCAATTCAATATGGCGTA 3958

Query 64 TATGGACTCGTGCCAATTCAATATGGTGGATCTGGACCCCAGCCAATTCAATATGGCGGA 123
          |||
SCMV 3959 TATGGACTCGTGCCAATTCAATATGGTGGATCTGGACCCCAGCCAATTCAATATGGCGGA 4018

Query 124 CTTGGCACCATGCCAATTCAATATGGCGGACCTGGCACTGTGCCAACTGGGGAGGGGTCT 183
          |||
SCMV 4019 CTTGGCACCATGCCAATTCAATATGGCGGACCTGGCACTGTGCCAACTGGGGAGGGGTCT 4078

Query 184 ACTTGGCACGGTGCCAAGTTTGAGGAGGGGTCTTGGCCCTGTGCCAAGTCCGCCATATTG 243
          |||
SCMV 4079 ACTTGGCACGGTGCCAAGTTTGAGGAGGGGTCTTGGCCCTGTGCCAAGTCCGCCATATTG 4138

Query 244 AATTGGCATGGTGCCAATAATGGCGGCCATATTGGCTATATGCCAGGATCAATATATAGG 303
          |||
SCMV 4139 AATTGGCATGGTGCCAATAATGGCGGCCATATTGGCTATATGCCAGGATCAATATATAGG 4198

Query 304 CAATATCCAATATGGCCCTATGCCAATATGGCTATTGGCCAGGTTCAATACTATGTATTG 363
          |||
SCMV 4199 CAATATCCAATATGGCCCTATGCCAATATGGCTATTGGCCAGGTTCAATACTATGTATTG 4258

Query 364 GCCCTATGCCATATAGTATTCCATATATGGGTTTTCTATTGACGTAGATAGCCCCCTCCC 423
          |||
SCMV 4259 GCCCTATGCCATATAGTATTCCATATATGGGTTTTCTATTGACGTAGATAGCCCCCTCCC 4318

Query 424 AATGGGCGGTCCCATATACCATATATGGGGCTTCTAATACCGCCCATAGCCACTCCCC 483
          |||
SCMV 4319 AATGGGCGGTCCCATATACCATATATGGGGCTTCTAATACCGCCCATAGCCACTCCCCC 4378
  
```



**Alignment:** Synthetic construct modified green fluorescent protein GFP5 (mgfp5)  
 Length=743  
 ACCESSION U87973

**SCMV/GFP4**

```

Query 246 ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGT 305
          |||
Sbjct 21  ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGT 80

Query 306 GATGTTAATGGGTACAAATTTTCTGTTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGA 365
          |||
Sbjct 81  GATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGA 140

Query 366 AACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCC-ACACTT 424
          |||
Sbjct 141 AACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTT 200

Query 425 GTCACTACTCTCACTTATGGTGTTCATGCTTTTTCAAGATATCCAGATCATATGAAGCGG 484
          |||
Sbjct 201 GTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTTCAAGATATCCAGATCATATGAAGCGG 260

Query 485 CACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGG 515
          |||
Sbjct 261 CACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGG 291

```

**SCMV/GFP5**

```

Query 96  TCTTCTTCAAGGACGACGGGAACCTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACA 155
          |||
Sbjct 313 TCTTCTTCAAGGACGACGGGAACCTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACA 372

Query 156 CCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCG 215
          |||
Sbjct 373 CCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCG 432

Query 216 GCCACAAGTTGGAATACAACCTACAACCTCCCACAACGTATAACATCATGGCCGACAAGCAA 275
          |||
Sbjct 433 GCCACAAGTTGGAATACAACCTACAACCTCCCACAACGTATAACATCATGGCCGACAAGCAA 492

Query 276 AGAACGGCATCAAAGCCAACCTTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGGTGCAAC 335
          |||
Sbjct 493 AGAACGGCATCAAAGCCAACCTTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGGTGCAAC 552

Query 336 TCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGACCCTGTCTTTTACCAGACA 395
          |||
Sbjct 553 TCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGACCCTGTCTTTTACCAGACA 612

Query 396 ACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACA 455
          |||
Sbjct 613 ACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACA 672

Query 456 TGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACGGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATG 506
          |||
Sbjct 673 TGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATG 723

```