

**Aus dem Genzentrum  
der Ludwig- Maximilians- Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Patrick Cramer**

**Optimierung Adeno-assoziiierter Viren als Vektoren für die Gentherapie  
solider Tumoren**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von

Sandra Lutz

aus

Augsburg

Jahr

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Hallek  
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Dellian  
Priv. Doz. Dr. U. Strobl  
Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Ulrich Hacker  
Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt  
Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	4
1.1. Gentherapie als neuer Ansatz zur Therapie solider Tumoren	4
1.2. Adeno-assoziierte Viren (AAV)	5
1.3. Rekombinante AAV (rAAV)	6
1.4. Vor- und Nachteile von rAAV als Gentherapievektor	8
1.5. Selbstkomplementäre rekombinante AAV (scAAV)	10
1.6. Einfluss der Ubiquitinilierung auf den AAV-vermittelten Gentransfer	13
1.7. Ziele der Arbeit	14
<b>2. Material</b>	
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial	15
2.1.1. Antibiotika	15
2.1.2. Chemikalien	15
2.1.3. Enzyme	16
2.1.4. Molekulargewichtsmarker für DNS	16
2.1.5. Verbrauchsmaterial	16
2.2. Verwendete Lösungen und Puffer	17
2.3. Zellkulturmedien	20
2.4. Bakterien	20
2.5. Plasmide	20
2.6. Zelllinien	22
2.7. Geräte	23
2.8. Mikroskope	24
<b>3. Methoden</b>	
3.1. Kultivierung von Mikroorganismen (Bakterien)	25
3.1.1 Plattenkultur	25
3.1.2 Flüssigkultur	25
3.2. Präparation und Analyse von Nukleinsäuren	25
3.2.1. Endotoxinfreie Isolation über Anionenaustauschersäulen	25
3.2.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNS im Agarosegel	26
3.2.3. Restriktionsspaltung von DNS mit Endonukleasen	26
3.3. Kultivierung von Zellen und Zellzahlbestimmung	27
3.4. Adenovirusfreie Verpackung von AAV und Iodixanol-Aufreinigung	27

3.4.1	Transfektion	27
3.4.2	Aufschluss der 293-Zellen	27
3.4.3.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	28
3.4.4.	Lagerung von AAV	28
3.5:	Charakterisierung der AAV-Stöcke	28
3.5.1	Bestimmung des genomischen Virustiters	28
3.5.1.1.	Bestimmung des Virustiters mittels der Dot-Blot-Methode	28
3.5.1.2.	Bestimmung des Virustiters durch quantitative PCR	31
3.5.2.	Bestimmung des infektiösen Titers mittels Durchflusszytometrie	32
3.5.3.	Bestimmung des Kapsidtiters mittels ELISA	33
3.5.4.	Charakterisierung des selbstkomplementären Anteils der verpackten DNS	33
3.5.4.1.	DNS-Präparation aus AAV	33
3.5.4.2.	Alkalisches Agarosegel	33
3.5.4.3.	Southernblot	34
3.6.	Infektionen verschiedener Tumorzelllinien <i>in vitro</i> und Quantifizierung der GFP-Expression mittels Durchflusszytometrie	35
3.7.	Spheroid- Modell	36
3.7.1.	Anzucht von Spheroïden in hängenden Tropfen	36
3.7.2.	Konfokale Laser-Mikroskopie	36
3.8.	Subkutaner Tumormodell in der SCID-Maus	37
3.8.1.	Versuchsaufbau	37
3.8.2.	Nachweis der Virus-DNS im Tumorgewebe	38
3.8.3.	Nachweis der GFP-Expression in Tumorgewebe	38
3.8.3.1.	Fluoreszenzmikroskopie an Gefrierschnitten	38
3.8.3.2.	Durchflusszytometrie	38
<b>4. Ergebnisse</b>		
4.1.	Verpackung von doppelsträngigen AAV	39
4.2.	Gentransfer-Effizienz von doppelsträngigen AAV in Tumorzellen <i>in vitro</i>	40
4.3.	Generierung von selbstkomplementären AAV (scAAV)	43
4.4.	Möglichkeiten zur Verbesserung der Transgen-Expression beim AAV-vermittelten Gentransfer	44
4.4.1.	Erhöhung der Effizienz von AAV durch Verwendung von Selbstkomplementären Vektoren	44
4.4.2.	Erhöhung der Effizienz des AAV-vermittelten Gentransfers durch Zugabe von MG132	47

4.4.2.1.	Zelllinien, bei denen auch unter Verwendung von scAAV durch MG132 eine Erhöhung des Anteils Transgen exprimierender Zellen erfolgt	48
4.4.2.2.	Zellen, bei denen durch Verwendung von scAAV und dsAAV eine Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen erreicht werden kann, während MG132 keinen Effekt zeigt	52
4.5.	Quantitativer Vergleich der Transgen-Expression in HeLa-Tumoren nach Infektion mit einzelsträngigem rekombinalem Adeno-assoziierten-Virus (ssAAV) und selbstkomplementärem rekombinalem Adeno-assoziierten Virus (scAAV) <i>in vivo</i>	54
4.5.1.	Charakterisierung der Tumorwachstumskinetik	54
4.5.2.	Nachweis der GFP-Expression in den Tumoren	55
4.5.3.	Tumorstruktur	60
4.6.	Transgen-Expression in Spheroiden nach Infektion mit AAV	61
4.6.1.	Generierung eines Spheroidmodells	61
4.6.2.	Lokalisierung der Transgen-Expression in HeLa-Spheroiden	61
4.6.3.	Vergleich der Transgen-Expression in HeLa- und SK-N-MC-Spheroiden	62
<b>5. Diskussion</b>		
5.1.	Virale Vektoren für die Gentherapie	65
5.2.	Gentherapie von Tumoren	66
5.3.	Gentransfer durch AAV in verschiedene Tumorzelllinien <i>in vitro</i>	68
5.4.	AAV als Gentherapievektor für Tumoren <i>in vivo</i>	74
5.5.	Spheroide als Modell für den Gentransfer von AAV in dreidimensionale Zellverbänden	76
5.6.	Perspektiven für die Gentherapie von malignen Erkrankungen durch AAV	77
<b>6. Zusammenfassung</b>		80
<b>7. Danksagung</b>		82
<b>8. Literaturverzeichnis</b>		83
<b>9. Erklärung</b>		89

# 1. Einleitung

## 1.1. Gentherapie als neuer Ansatz zur Therapie solider Tumoren

Maligne Tumore sind nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen. Zu den häufigsten soliden Tumoren zählen die Bronchialkarzinome, die kolorektalen Karzinome und das Mammakarzinom. Viele dieser Tumorerkrankungen verlaufen insbesondere im metastasierten Krankheitsstadium letal. Trotz der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zeigte sich in einer französischen Studie, dass sich das Langzeitüberleben und das krankheitsfreie Überleben in Verlaufsuntersuchungen von 1982 bis 1989 und von 2000 bis 2004 bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Mammakarzinomen nicht signifikant verbessert haben. In dieser Langzeitstudie wird postuliert, dass die Einführung neuer effektiver Therapieoptionen wie zum Beispiel der verschiedenen anti-hormonellen Ansätze gerade die Zunahme der Malignität der Tumore ausgleichen konnten (Abrial, 2005). Es besteht also Bedarf, weitere Therapieansätze für solide Tumore zu etablieren und diese zu optimieren. Ein Erfolg versprechendes technisches Werkzeug zur Umsetzung solcher neuer Ansätze stellt die Gentherapie dar.

Die Gentherapie tritt heute vor allem als Option bei Erkrankungen, die mit angeborenen oder erworbenen Mutationen einhergehen, immer wieder in das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses. Man versucht hierbei durch das Einbringen von Genen die Proteinsynthese der Zelle so zu beeinflussen, dass eine Fehlfunktion der Zelle unterbunden wird oder ein fehlendes Protein zur Verfügung gestellt werden kann. Hierbei handelt es sich um experimentelle Ansätze bei Krankheiten, die bisher schlecht oder gar nicht behandelbar waren wie zum Beispiel erbliche Stoffwechselerkrankungen wie die Mukoviszidose oder angeborene Störungen des Immunsystems.

Auch für die Therapie von soliden Tumoren könnte die Gentherapie eine Option darstellen. Bei Tumorerkrankungen werden vor allem zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Zum einen können Tumorzellen durch Gentransfer von Suizidgenen oder von immunmodulatorischen Faktoren so verändert werden, dass sich daraus ein antitumoraler Effekt ergibt. Zum anderen kann durch die systemische Überexpression löslicher Faktoren wie zum Beispiel antiangiogener Faktoren eine Hemmung des Tumorwachstums vermittelt werden. In vitro und in Tiermodellen konnten bereits erste Erfolge erzielt werden, in klinischen Studien zeigten sich hingegen noch größere Limitationen der verwendeten Vektorsysteme. Daher ist die Auswahl und weitere Optimierung der Vektorsysteme für die Gentherapie solider Tumore von entscheidender Bedeutung.

Auch Adeno-assoziierte Viren könnten aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften für diesen neuen Therapieansatz als Vektorsystem in Frage kommen.

## **1.2. Adeno-assoziierte Viren (AAV)**

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind kleine einzelsträngige humane DNS-Viren. Sie gehören zur Familie der Parvoviridae. Entdeckt wurde AAV als Kontamination einer Adenovirus-Präparation (Atchison, 1965). Normalerweise benötigt AAV Adenoviren als Helferviren zur Replikation (Berns, 1990). Auf Grund dieser Eigenschaft wird AAV auch zu den Dependoviren gezählt. Die Helferfunktion kann mit geringerer Effizienz auch durch andere Viren wie das humane Cytomegalievirus, Herpes simplex Viren, humane Herpesviren Typ 6 und Papillomaviren übernommen werden. Auch durch chemische Substanzen wie Hydroxyurea oder UV Bestrahlung kann eine der Helferfunktion ähnliche Wirkung erzielt werden (Yalkinoglu, 1988; Yakobson, 1989).

Das 4,7 kb große einzelsträngige DNS-Genom wird von einem unbehüllten icosaedrischen Kapsid von 22 nm Durchmesser umgeben (Srivastra, 1983). Dieses besteht aus drei Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3, die alle durch alternatives Spleißen von einem Strukturgen (Cap) codiert werden (Goncalves, 2005). Das Genom codiert außerdem für vier verschiedene regulatorische Proteine (Rep) und wird beidseits flankiert von invertierten terminalen Repetitionen (ITR), die sich durch komplementäre Basen zur charakteristischen T-förmigen Haarnadelform falten. Die Rep78 und Rep68 Proteine sind an der AAV-DNS-Replikation beteiligt. Sie interagieren sowohl mit dem Rep bindenden Element als auch mit der terminalen Schnittstellen (terminal resolution site), die in den ITRs lokalisiert sind. Außerdem regulieren sie die AAV-Genexpression (Pereira, 1997). Die Rep52 und Rep40 Proteine sind an der Umformung der Replikationsintermediate zu plus- und minus-polarisierten Einzelsträngen und deren Verpackung beteiligt (Chejanovsky, 1989). Auch an dem Transport der in den Nucleoli gebildeten Cap Proteine in das Kernplasma, wo die AAV-Viren verpackt werden, sind Rep Proteine beteiligt (Wistuba, 1997).

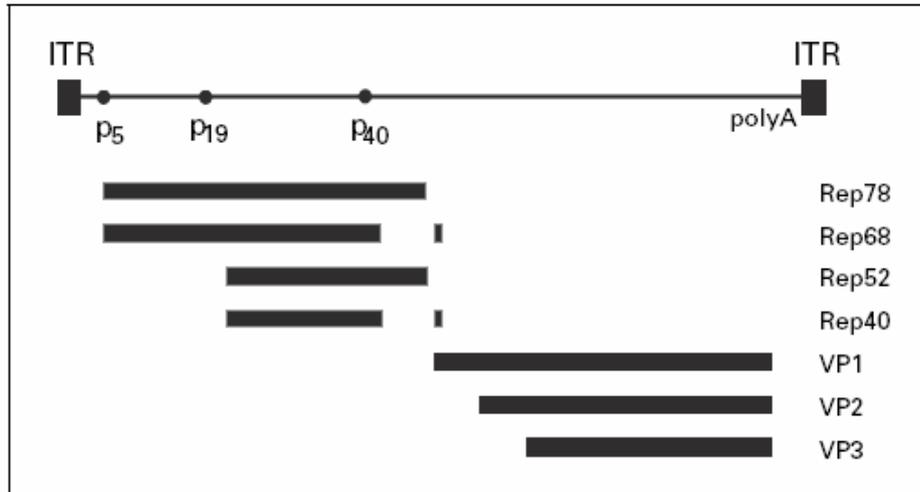


Abbildung 1

Schematische Darstellung des AAV Genoms. Das Wildtyp AAV Genoms besteht aus 4680 Nukleotiden. Die viralen Promotoren (p5, p19 und p40), die ITR Strukturen und die polyA-Sequenz sind oben dargestellt. Rep 78 und seine Splicing Variante Rep 68 stehen unter Kontrolle des p5 Promotors und sind notwendig für die virale Replikation, Transkription und ortsspezifische Integration. Rep 52 und seine Splicing Variante Rep 40 werden durch den p19 Promotor transkribiert. Sie werden für die Verpackung des einzelsträngigen Genoms benötigt. Die viralen Kapsid Proteine VP1, VP2 und VP3 werden durch den p40 Promotor kontrolliert. Die drei Kapsid Proteine unterscheiden sich durch alternatives Splicing in ihren N-Termini und unterschiedlichen Initiationscodons, enthalten aber alle die VP3 Region (Büning, 2004).

Der Hauptrezeptor für AAV Serotyp 2 (AAV-2) ist Heparansulphat-Proteoglykan, das nicht nur ubiquitär auf humanen Zellen, sondern auch auf Zellen von Primaten, Hunden, Mäusen und Vögeln vorkommt (Summerford, 1998). Als Co-Rezeptoren dienen  $\alpha_v\beta_5$  Integrine, Fibroblasten Wachstumsfaktor 1 und der Hepatozyten Wachstumsfaktor c-Met (Summerford, 1999; Qing, 1999; Kashiwakura, 2005).

### 1.3. Rekombinantes AAV (rAAV)

Für die Replikation und Verpackung von AAV-Vektoren werden nur die beiden invertierten terminalen Repetitionen (ITR) benötigt, wenn Rep und Cap durch ein Helferplasmid zur Verfügung gestellt werden (Samulski, 1999). Dies ermöglicht es, dass 96 % des AAV-Genoms entfernt und durch ein Transgen ersetzt werden kann. Auf diese Weise werden rekombinante AAV generiert.

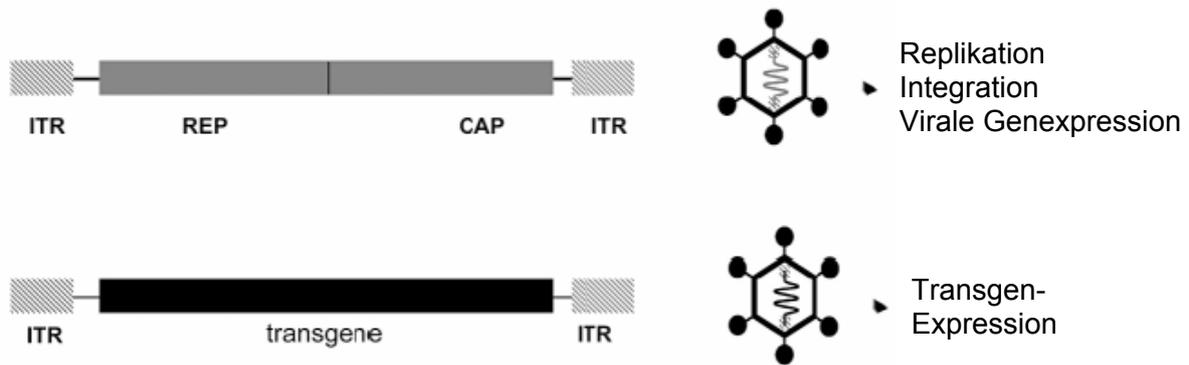


Abbildung 2:

Schematische Darstellung von Wildtyp und rekombinanten AAV. Für die Herstellung von rAAV wurden die beiden offenen Leserahmen (REP und CAP) des Wildtyp-AAV-Genoms durch ein Transgen ersetzt. Dadurch gehen die viralen Funktionen (Integration, Replikation und neue Virusproduktion) bei rAAV verloren. Im Rahmen der Verpackung wird REP und CAP auf einem zweiten Plasmid in trans zur Verfügung gestellt (Büning, 2004).

Im bestehenden AAV-Replikationsmodell wird postuliert, dass eine 3`Hydroxylgruppe innerhalb der ITRs die virale Replikation initiiert, indem sie selbst die Primerfunktion übernimmt (Berns, 1990). Dies führt zur Formation linearer doppelsträngiger DNS-Moleküle (Doppelmonomere, DMs) mit einem ringförmig geschlossenen Ende. Diese Strukturen werden durch ortsspezifischen Abbruch des parentalen Strangs gegenüber des ursprünglichen 3`Endes aufgelöst. Die neu generierten freien 3`Hydroxylgruppen fungieren als Substrate der DNS-Polymerasen, die das ITR entwinden und kopieren. Schließlich können sich die linearen palindromischen Doppelsträngenden zur Haarnadelform renaturieren, wobei die 3`Hydroxylgruppen so positioniert werden, dass die Verschiebung des Einzelstranges beginnen kann. Daraus können dann einzelsträngige AAV-Genome oder neue DMs entstehen. Wenn der parentale Strang nicht wie gewöhnlich abbricht, entstehen Replikationsintermediate (doppelsträngige Dimere, DDs), die durch die Symmetrieachse, in der die ITR Sequenzen liegen, zu DMs aufgelöst werden können (siehe Abbildung 3).

Ursprünglich wurde für die Produktion von rAAV eine Adenovirus Koinfektion benötigt. Dies machte aufwendige Aufreinigerungsverfahren notwendig, um die dazu verwendeten pathologischen Adenoviren und deren Proteine, die Immunreaktionen auslösen können, wieder aus der rAAV Präparation zu entfernen. Inzwischen ist es möglich stattdessen Adeno-Helferplasmide zu verwenden, die alle notwendigen Helfergene enthalten. Dadurch konnte die Gefahr einer Verunreinigung durch adenovirale Proteine minimiert werden. Da die komplizierte Aufreinigung entfällt, können zwischen 40-bis 60-fach höhere Titer erreicht werden (Xiao, 1998).

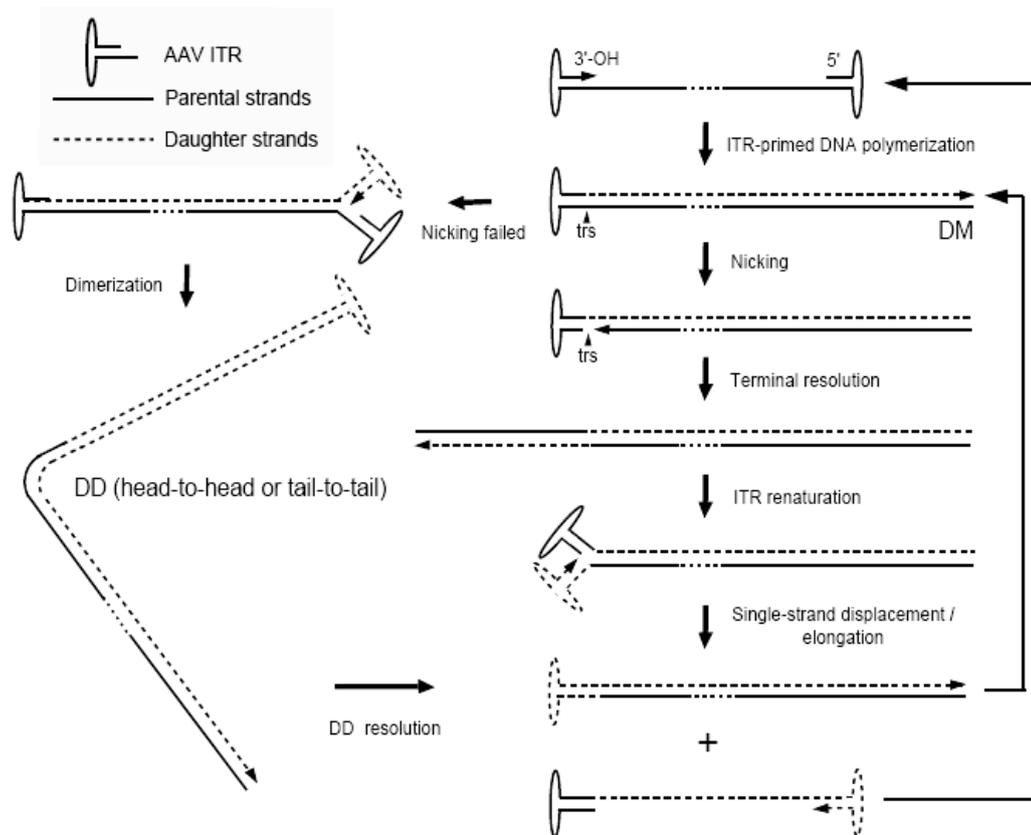


Abbildung 3: Modell der Replikation von AAV

Die Replikation von AAV wird durch den 3'-Haarnadel Primer initiiert. Durch die DNS Polymerisation entstehen lineare doppelsträngige Moleküle mit einem kovalent geschlossenen Ende. Gegenüber dem ursprünglichen 3'-Ende an der terminal resolution site (TRS) bricht nun der parentale Strang ab. Das so neu entstandene 3'-Ende mit seinen Hydroxylgruppen bildet ein Substrat für die DNS Polymerase, durch die das inverted terminal repeat (ITR) aufgefaltet und kopiert wird. Schließlich können die palindromischen Enden sich wieder in die Haarnadelstruktur falten. Das doppelsträngige Molekül trennt sich anschließend in die zwei Virusgenome auf, die dann verpackt werden können.

Wenn Fehler beim Abbrechen der Stränge passieren, entstehen doppelsträngige Moleküle, wie sie links dargestellt sind (Goncalves, 2005).

#### 1.4. Vor- und Nachteile von rAAV als Gentherapievektor

AAV bietet als Gentherapievektor eine Reihe von Vorteilen.

Mehrer Faktoren machen ihn zu einem sehr sicheren Vektor: Es konnte bisher keine Pathogenität beim Menschen festgestellt werden. Obwohl etwa 80 % der Bevölkerung seropositiv für AAV Serotyp 2 (AAV-2) sind, wurden bislang keine Erkrankungen, die auf AAV zurückzuführen wären, gefunden (Goncalves, 2005).

Im Gegensatz zu den meisten anderen viralen Vektoren wirkt rAAV nicht zytotoxisch und ist nur geringfügig immunogen (Chirmule, 1999).

Ein weiterer Sicherheitsfaktor ist, dass AAV im Allgemeinen ein Helfervirus benötigt, um sich zu replizieren, so dass sich die Vervielfältigung des Virus weitgehend kontrollieren lässt. Da in den Vektoren die gesamte Virus eigene DNS, mit Ausnahme der ITRs, durch das

therapeutische Gen ersetzt werden kann, wird das Risiko, dass rAAV sich ungehindert repliziert und durch seine Virusproteine Schaden anrichten könnte, deutlich reduziert (Carter, 2000).

Das Wildtyp- Virus besitzt die Fähigkeit zur ortsspezifischen Integration in das Chromosom 19. Hierfür wird das Rep Gen verantwortlich gemacht, so dass diese Fähigkeit bei den meisten rAAV nicht mehr besteht. Neuere detaillierte Genomanalysen ergaben jedoch, dass eine 33bp lange Sequenz, die Elemente enthält, die mit dem Rep bindenden Element und der terminal resolution site in Verbindung stehen, für eine ortsspezifische Integration ausreicht (Linden, 1996; Young, 2001). Um eine zielgerichtete DNS-Integration in hohem Ausmaß zu gewährleisten, ist eine weitere Sequenz nötig, die sich mit dem hoch regulierten p5 Promotor überschneidet und wie die ITR Sequenz ein RBS (Rep binding site) beinhaltet (Philpott, 2002).

AAV lässt sich effizient als Gentherapievektor einsetzen.

Das stabile Viruspartikel ermöglicht eine Aufreinigung zu hohen Titern (Tal, 2000).

Durch AAV lassen sich sowohl in Teilung befindliche als auch ruhende Zellen infizieren (Carter, 2000).

Man kann AAV sehr vielfältig einsetzen, da es ein breites Wirtsspektrum besitzt.

AAV weist einen natürlichen Tropismus für Hepatozyten auf. Da bei einer Reihe von gentherapeutischen Anwendungen neben der Effizienz auch die Spezifität des Gentransfers eine zentrale Rolle spielt, wurde versucht, die breite Spezifität von AAV gezielt zu verändern (Rabinowitz, 2000).

Für Gendefekte, die eine langfristige Korrektur benötigen, ist es von Interesse, dass AAV stabil in die Wirtszell-DNS integriert werden kann. AAV tritt nur bei Koinfektion mit Adenoviren oder einem anderen Helfervirus in den lytische Zellzyklus ein. Erfolgt keine Koinfektion wird AAV stabil in das Wirtsgenom eingebaut. Eine langfristige Genexpression konnte im Gehirn, in der Leber, im Muskel, in der Retina und im Gefäßsystem tierexperimentell nachgewiesen werden (Samulski, 1999; Xiao, 1996; Kaplitt, 1994).

Auch für die Therapie solider Tumore ist AAV ein interessanter Vektor. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass ein Gentransfer sowohl in verschiedene humane solide Tumorzelllinien als auch in frisch aus soliden Tumoren, wie Ovarialkarzinomen oder Melanomen, isolierte Zellen möglich ist. In diesen Untersuchungen ergab sich ein Tropismus von AAV-Vektoren für solide epitheliale Tumore (Maas, 1998). *In vivo* können solide Tumorzelllinien (Hepatozelluläres Karzinom) von AAV unter bestimmten Bedingungen infiziert werden (Peng, 2000). Auch in einem Cervixkarzinommodell konnte ein therapeutischer Effekt durch AAV-vermittelten Gentransfer erzielt werden (Kunke, 2000). In einem Mausmodell zur Untersuchung von Glioblastomen konnte gezeigt werden, dass AAV-Vektoren besser in Tumore eindringen können als adenovirale Vektoren (Enger, 2002).

### **1.5. Selbstkomplementäre rekombinante AAV (scAAV)**

Mögliche Probleme bei der Anwendung von AAV bestehen darin, dass *in vivo* die Gentransfer-Effizienz nicht ausreichend ist oder die Zeitspanne bis zum Beginn der Transgen-Expression mit bis zu drei Wochen für bestimmte Anwendungen zu lange ist, da rAAV auf Replikationsfaktoren der Wirtszelle angewiesen ist. Der wesentliche limitierende Faktor ist hierbei die Doppelstrangsynthese (Ferrari, 1996).

Die Genexpression lässt sich durch genotoxische Substanzen, UV-Bestrahlung oder Adenovirus Koinfektion deutlich steigern. Diese höhere Transgen-Expression korrelierte mit der Synthese des komplementären DNS-Strangs (Alexander, 1994; Fisher, 1996).

Es wurde aber auch diskutiert, dass die Wiederherstellung der Doppelhelix aus Einzelsträngen, die von verschiedenen infizierenden AAV-Vektoren stammen, einen wichtigen Schritt zur rAAV Transduktion darstellt (Nakai, 2000).

Um diesen Schritt zu umgehen, können zwei rAAV DNS-Sequenzen mit einer Länge, die weniger als der Hälfte der Größe des Wildtyp-Genoms entspricht, in ein Kapsid verpackt werden (McCarty, 2001). Die so produzierten Viren werden im Folgenden als doppelsträngige AAV bezeichnet. Bei deren Verpackung werden jedoch nur in einem Teil der Vektoren wirklich zwei kürzere Genome in ein Kapsid verpackt, so dass heterogene Viruspräparationen entstehen, da die Viren entweder ein oder zwei 2,7kb lange DNS-Stücke beinhalten können. Die Viren, die zwei DNS-Sequenzen enthalten, können diese wiederum entweder als zwei Einzelstränge oder als einen Doppelstrang beinhalten.

Um diese Heterogenität zu beseitigen, kann ein Vektor-Konstrukt kloniert werden, das es ermöglicht, nur doppelsträngige Genome zu generieren. Beide DNS-Stränge werden hierbei als inverted repeat in einem Einzelstrang aneinander gehängt (siehe Abbildung 4). Durch Faltung entstehen daraus selbstkomplementäre DNS-Schleifen und somit selbstkomplementäre AAV-Vektoren (siehe Abbildung 5).

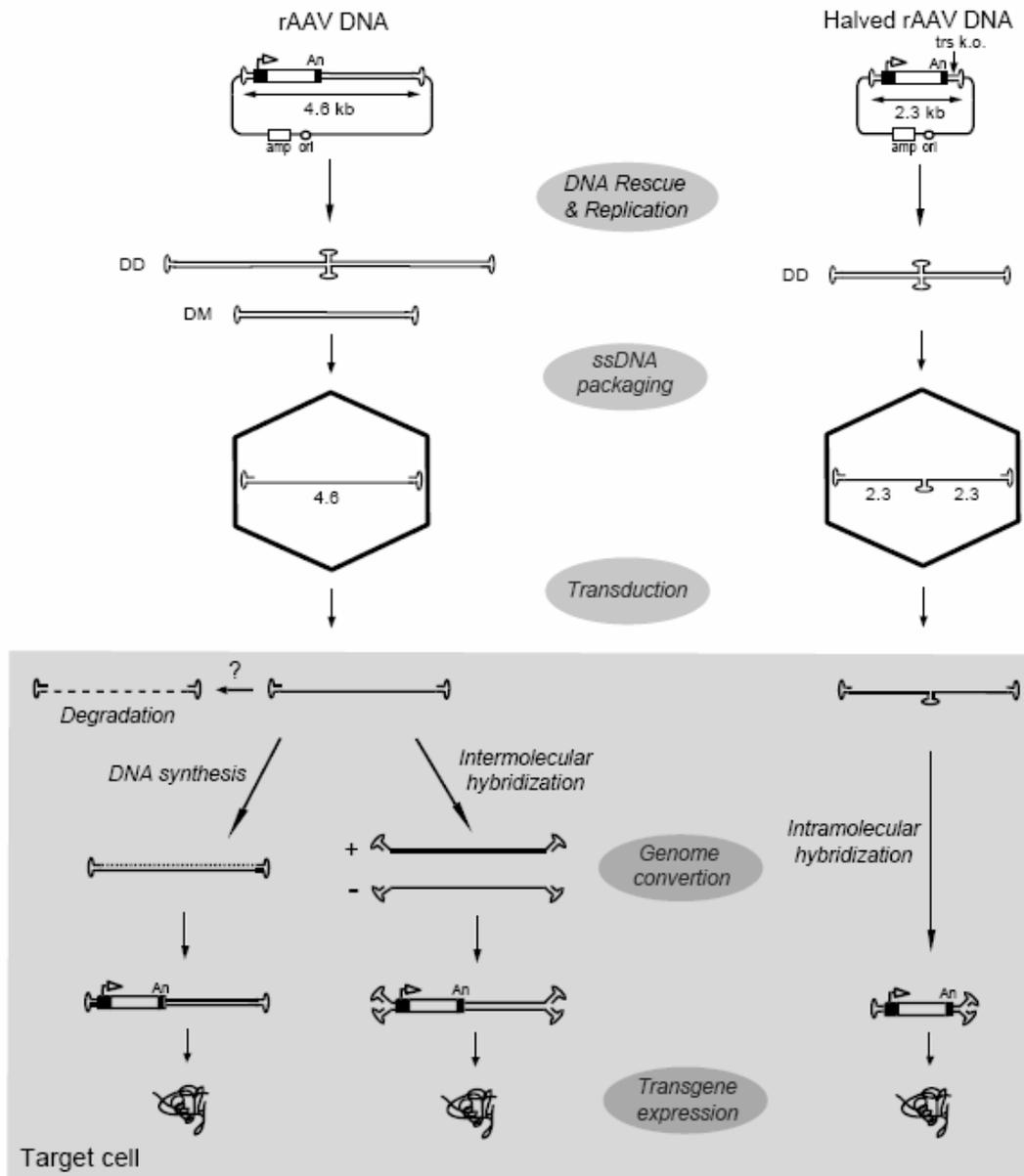
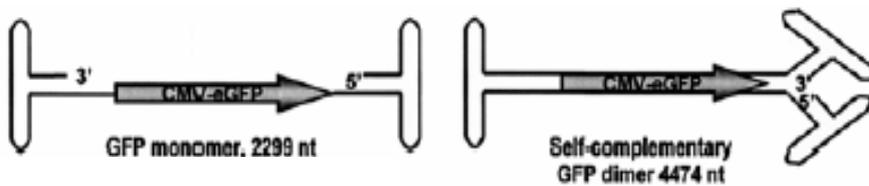


Abbildung 4: Vergleichende Darstellung der Entstehung von rAAV und selbstkomplementären AAV und deren Transduktion

Links: Replikation, Verpackung und Transduktion eines einzelsträngigen rAAV nach dem gängigen Replikationsmodell. Doppelsträngige DNS entsteht nach Infektion einer Zelle durch DNS- Synthese der Wirtszelle oder durch Hybridisierung zweier Virusgenome entgegengesetzter Polarität.

Rechts: Bei der Verpackung von selbstkomplementärem rAAV werden DNS- Sequenzen halber Länge als Dimer repliziert. Auf Grund einer Deletion in der terminal resolution site (trs) eines inverted terminal repeats (ITR) ist dieses selbstkomplementäre Molekül stabil und kann nicht in zwei kürzere einzelsträngige Moleküle geschnitten werden. Das ITR mit der Mutation liegt in der Symmetrieachse, die äußeren ITRs entsprechen dem Wildtyp. Ein doppelsträngiges Molekül entsteht nach der Transduktion einer Zelle durch Umfaltung unabhängig von der Wirtszell- DNS- Synthese (Goncalves, 2005).



Terminal resolution site -> REP kann schneiden

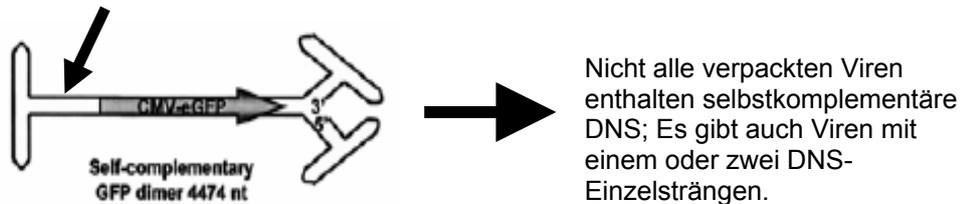


Abbildung 5: Darstellung des Modells eines selbstkomplementären rAAV-Dimers. Wenn keine Mutation in der terminal resolution site besteht, wie es bei dem dsAAV-Konstrukt der Fall ist, kann ein Teil der Dimere in zwei 2,3kb lange einzelsträngige AAV-Genome geschnitten werden (McCarty, 2001).

In Infektionsversuchen waren selbstkomplementäre AAV (scAAV) einzelsträngigen rAAV (ssAAV) in Bezug auf die Gentransfereffizienz deutlich überlegen. Bei Anwendung von scAAV begann die Transgen-Expression *in vivo* nicht nur schneller (innerhalb einer Woche) als bei ssAAV, sondern sie war auch deutlich stärker (McCarty, 2001) (siehe Abbildung 6).

Bei scAAV zeigte sich ein Verhältnis von 5.9:1 (genomische Partikel zu infektiösen Partikeln) auf HeLa-Zellen. Dies war kaum niedriger als das Verhältnis, das bei AdV Koinfektion bei Verwendung von ssAAV erreicht wird. (6:1). Die Transduktionseffizienz durch scAAV erwies sich als zwischen 5- bis 140-fach höher als durch herkömmlichen ssAAV.

In Abwesenheit von DNS-Synthese in der Zielzelle, die durch Hydroxyurea blockiert war, wurde bei Verwendung von ssAAV die Transgen-Expression inhibiert, bei Verwendung von scAAV war sie hingegen erhalten. Dies deutet darauf hin, dass bei Verwendung von scAAV die Doppelstrangsynthese keinen limitierenden Faktor mehr darstellt.

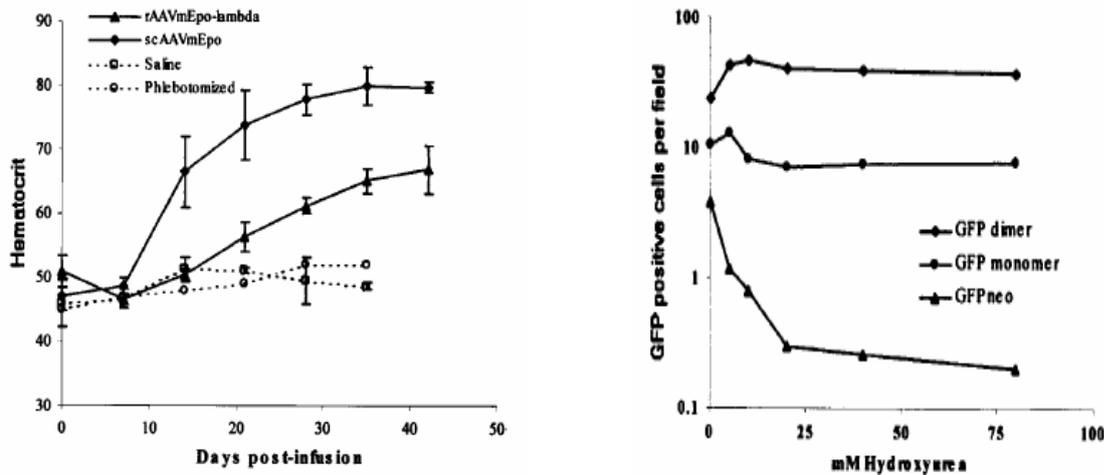


Abbildung 6

Links: Balb-c Mäuse wurden entweder ssAAV oder scAAV mit dem Transgen Erythropoetin in die Schwanzvene injiziert. Eine Maus erhielt als Negativkontrolle nur NaCl-Lösung 0,9%. Zum Nachweis der Expression des Transgens wurde der Hämatokrit bestimmt.

Rechts: In HeLa Zellen wurde durch Hydroxyurea die DNS Synthese inhibiert. Nach 24 h wurden sie mit scAAV (GFP dimer), ssAAV (GFPneo) oder einem nur 2,3kb großen ssAAV (GFPmonomer) jeweils mit dem Transgen GFP infiziert.

Die HU Behandlung wurde fortgeführt, bis die GFP Expression nach 24h gemessen wurde (McCarty, 2001).

## 1.6. Einfluss der Ubiquitinierung auf den AAV-vermittelten Gentransfer

Proteasomen sind Proteinpartikel, die in Erythrozyten und vielen eukaryotischen Zellen vorkommen. Ubiquitin markierte Proteine können von 26S Proteasomen lysiert werden. Die 20S Untereinheit des 26S Proteasoms, die aus vier zylindrischen Ringen besteht, enthält als wichtigsten Bestandteil die multikatalytische Proteinase, die Peptidbindungen nach basischen, hydrophoben und sauren Aminosäuren spalten kann. Es werden vor allem falsch gefaltete oder beschädigte Proteine erkannt und nach Ubiquitinierung abgebaut. Proteine mit sehr hohen Umsatzraten wie das Tumorsuppressorprotein p53 oder der Transkriptionsfaktor cMyc werden auf diese Weise abgebaut (Löffler, 1998).

Auch AAV kann auf seinem Weg durch die Zelle vom frühen endosomalen Kompartiment zum Zellkern durch Proteasomen abgebaut werden. Dies führt dazu, dass ein großer Teil der eingesetzten Viren nicht in den Zellkern gelangen und folglich keine Expression der gewünschten Gene erzielt werden kann. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit MG 132, einem Proteasomen-Inhibitor, zu einer 20- bis 25-fach höheren Transduktionseffizienz in HeLa-Zellen führen kann. In HepG2-Zellen wurde sogar eine 60-fache Steigerung erreicht (Douar et al. 2000).

Proteasomen-Inhibitoren haben in letzter Zeit neue therapeutische Möglichkeiten für verschiedene Krankheiten eröffnet. Insbesondere die Induktion von Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien ist von großem Interesse. Tumorzellen scheinen viel

sensitiver darauf zu reagieren als gesunde Zellen. Therapeutische Effekte wurden bei chronisch lymphatischer Leukämie, Prostatakarzinomen, Pankreaskarzinomen, Mammakarzinomen und Kolonkarzinomen in präklinischen Modellen erzielt. Beim Multiplen Myelom haben Proteasomen-Inhibitoren bereits ihren Weg in die Klinik gefunden (Adams, 2002).

### **1.7. Ziele der Arbeit**

Ziel der Arbeit war die systematische Verbesserung des AAV-vermittelten Gentransfers in Tumorzellen unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen.

Vor dem Hintergrund, dass die Doppelstrangsynthese einen entscheidenden, limitierenden Schritt auf dem Weg zur Transgen-Expression darstellt, sollten ausgehend von der Verwendung rekombinanter, einzelsträngiger AAV-Vektoren (rAAV) neue AAV-Vektoren, die primär eine doppelsträngige DNS zur Verfügung stellen (dsAAV und scAAV) systematisch im Hinblick auf den *in vitro*-Gentransfer in unterschiedliche Tumorzelllinien getestet werden.

Da publizierte Daten zum Gentransfer in Bronchialepithelien den Befund erbracht hatten, dass ein Abbau von AAV in Proteasomen eine weitere Hürde für einen effizienten AAV-vermittelten Gentransfer darstellen kann, sollte weiterhin der Einfluss eines Proteasomen-Inhibitors (MG132) auf die Transduktionseffizienz beim Tumorzell-Gentransfer untersucht werden.

Nachdem der *in-vitro*-Gentransfer unter Verwendung von dsAAV und scAAV sowie unter Verwendung des Proteasomen-Inhibitors MG132 zu einer deutlichen Verbesserung der Effizienz des *in-vitro*-Gentransfers in Tumorzellen geführt hatte, bestand ein weiteres Ziel der Arbeit in der Analyse der Übertragbarkeit der *in-vitro*-Ergebnisse auf die *in vivo* Situation. Es zeigte sich, dass der AAV-vermittelte *in-vivo*-Gentransfer trotz Verwendung des modifizierten Vektors (scAAV) durch eine im Vergleich zu den *in vitro*-Experimenten deutlich geringere Effizienz gekennzeichnet war.

Im letzten Arbeitsschritt wurde daher das Ziel verfolgt, die Ursachen für die Unterschiede zwischen den *in-vitro*- und *in-vivo*-Ergebnisse anhand eines Spheroidmodells näher zu charakterisieren.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

#### 2.1.1. Antibiotika

Produkt	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Corp., Karlsruhe

#### 2.1.1. Chemikalien

Produkt	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aqua bidest.	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Benzonase	Merck, Darmstadt
dNTPs	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Invitrogen Corp., Karlsruhe
Formaldehydlösung (mind. 37 %)	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Iodixanol (OptiPrep™)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	J. T. Baker, Deventer (NL)
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
MG132	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Riedel-de Haën, Seelze
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS	Invitrogen Corp., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Invitrogen Corp., Karlsruhe
Tween® 20	Merck, Darmstadt

### 2.1.2. Enzyme

Produkt	Hersteller
Proteinase K	Merck AG, Darmstadt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach

### 2.1.3. Molekulargewichtsmarker für DNS

Produkt	Hersteller
DNS-Molekulargewichtsmarker II, Digoxigenin markiert	Roche, Penzberg
1 kb DNS-Leiter	New England Biolabs, Schwalbach

### 2.1.4. Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Biomax Light Film	Kodak, Stuttgart
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
DNEasy®Tissue Kit	Qiagen, Hilden
EndoFree Plasmid® Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Kanülen	Peske, Aindling
Light cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit	Roche, Penzberg

Mikrotomklingen	Feather, Osaka, Japan
Objektträger, Polysine	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Pechiney, Paris (F)
Pipetten	Corning, Wiesbaden
O.C.T. Einbettmedium für gefrorenes Gewebe	Sakura, Zoeterwoude (NL)
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen (CH)
Zellkulturplatten (96-, 48-, 24-, 12-, 6-Well)	TPP, Trasadingen (CH)
Zellkulturschalen	Nunc GmbH, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen (CH)

## 2.2. Verwendete Lösungen und Puffer

Puffer	Menge		Reagens
Alkalischer Auftragspuffer	300	mN	NaOH
	6	mM	EDTA
	18 %		Pancoll (1,077g/ml)
	etwas		Xylene cyanol
alkalischer Laufpuffer	50	mN	NaOH
	1	mM	EDTA
BBS-Transfektionspuffer	50	mM	BES, pH 6,95
	280	mM	NaCl
	0,75	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,75	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Blocking-Puffer	90	%	Maleinsäurepuffer
	10	%	Blocking-Reagenz
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	250	mM	CaCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O
Detektionspuffer	100	mM	Tris/HCl, pH 9,5
	100	mM	NaCl

DNS-Auftragspuffer	50	mM	EDTA, pH 8,0
	10	%	Ficoll
	10	%	Glycerin
	0,01	%	BPB
15 % Iodixanol	5	ml	10x PBS
	50	µl	MgCl <sub>2</sub> , 1 molar
	50	µl	KCl, 2,5 molar
	10	ml	NaCl, 5 molar
	12,5	ml	Optiprep
	75	µl	Phenolrot, 0,5 Prozent
	ad 50	ml	Sigma Wasser
25 % Iodixanol	5	ml	10x PBS
	50	µl	MgCl <sub>2</sub> , 1 molar
	50	µl	KCl, 2,5 molar
	12,5	ml	Optiprep
	75	µl	Phenolrot, 0,5 Prozent
	ad 50	ml	Sigma Wasser
	40 % Iodixanol	5	ml
50		µl	MgCl <sub>2</sub> , 1 molar
50		µl	KCl, 2,5 molar
12,5		ml	Optiprep
ad 50		ml	Sigma Wasser
60 % Iodixanol		50	µl
	50	µl	KCl, 2,5 molar
	12,5	ml	Optiprep
	ad 50	ml	Sigma Wasser
HBS-Transfektionspuffer	50	mM	HEPES
	280	mM	NaCl
	1,5	mM	NaP
LB-Medium	1	%	Bacto-Trypton
	0,5	%	Hefe Extract
	0,5	%	NaCl
	1	mM	NaOH
Lysispuffer	150	mM	NaCl
	50	mM	Tris/HCl, pH 8,5

Maleinsäurepuffer	100 150	mM mM	Maleinsäure, pH 7,5 NaCl
Neutralisierungspuffer	1 1,5	M M	Tris-HCl pH 7,5 NaCl
P1-Puffer (Resuspensionspuffer)	50 10 100	mM mM µg/ ml	Tris/HCl, pH 8,8 EDTA RnaseA
P2-Puffer (Lysepuffer)	200 1	mM %	NaOH SDS
P3-Puffer (Neutralisationspuffer)	3	M	KAc, pH 5,0
PBS M/K	50 0,5 0,5 ad 0,5	ml ml ml l	10x PBS MgCl <sub>2</sub> , 1 molar KCl, 2,5 molar Sigma Wasser
PK-Puffer:	75 25	mM mM	Tris, pH8,0 EDTA
QBT-Puffer (Äquilibrierungspuffer)	750 50 15 0,15	mM mM % %	NaCl MOPS, pH 7,0 Isopropanol Triton® X-100
QC-Puffer (Waschpuffer)	1 50 15	M mM %	NaCl MOPS, pH 7,0 Isopropanol
QF-Puffer (Elutionspuffer)	1,25 50 15	M mM %	NaCl Tris/HCl, pH 8,5 Isopropanol
SDS-Hybridisierungslösung	125 250 1 45 7	mM mM mM % %	Na <sub>x</sub> H <sub>y</sub> (PO <sub>4</sub> ), pH 7,2 NaCl EDTA Formamid SDS

20 x SSC-Puffer	3 300	M mM	NaCl Natriumcitrat, pH 7,0
2x SSC-Waschlösung:			2x SSC mit 0.1 % SDS
0.1x SSC-Waschlösung:			0.1x SSC mit 0.1 % SDS
20x SSC-Puffer:	3 300	M mM	NaCl Natriumcitrat, pH 7.0
TE-Puffer (Resuspensionspuffer)	10 1	mM mM	Tris/HCl, pH7,5 EDTA
Waschpuffer	97,3 0,3	% %	Maleinsäurepuffer Tween® 20

### 2.3. Zellkulturmedien

Produkt	Hersteller
D-MEM mit Glutamax	Invitrogen Corp., Karlsruhe
RPMI 1640 mit Glutamax	Invitrogen Corp., Karlsruhe

### 2.4. Bakterien

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
E. coli TopTen	$F^-$ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr\ hsdRMS\ mcrBC)$ , $\Phi80lacZ\Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara, leu)7697$ , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , ( <i>Str</i> <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen Corp., Karlsruhe

### 2.5. Plasmide

Name	Beschreibung
pXX6-80	Ad-Helferplasmid: Expressionsplasmid von adenoviralen Helferproteinen: VA, E2A, E4. Das Plasmid wurde freundlicherweise von R. J. Samulski (Universität North Carolina) zur Verfügung gestellt.
pRC 99	Helferplasmid: Expressionsplasmid von Rep und Cap von AAV-2

pGFP	Transgenplasmid:, Expressionsplasmid des CMV- Promotors und von GFP, 4,7kb flankiert von 2 intakten ITRs (siehe Abbildung 7)
pdsAGFPFG	Transgenplasmid:, Expressionsplasmid des CMV- Promotors und von GFP, nur 2,3 kb flankiert von 2intakten ITRs (siehe Abbildung 7)
pscAGFPFG	Transgenplasmid:, Expressionsplasmid des CMV- Promotors und von GFP, nur 2,3kb flankiert von einem intakten ITR und einem defekten ITR (siehe Abbildung 7)

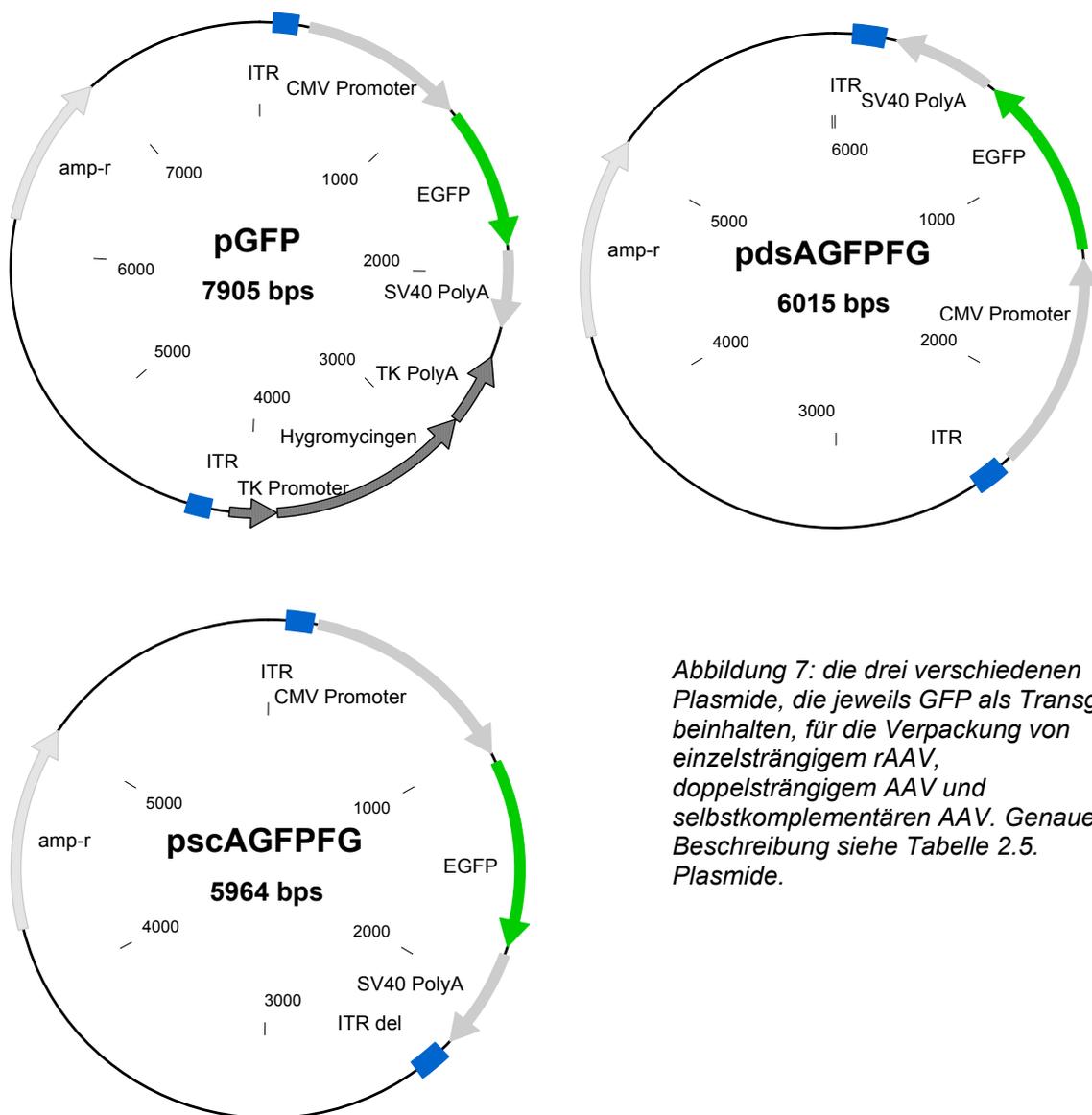


Abbildung 7: die drei verschiedenen Plasmide, die jeweils GFP als Transgen beinhalten, für die Verpackung von einzelsträngigem rAAV, doppelsträngigem AAV und selbstkomplementären AAV. Genauere Beschreibung siehe Tabelle 2.5. Plasmide.

## 2.6. Zelllinien

Die Zellen wurden in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten und ihre morphologischen Eigenschaften regelmäßig kontrolliert.

Alle Medien wurden mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin-Streptavidin versetzt.

	Beschreibung	Medium
293	Humane embryonale Nierenzelllinie; durch die adenoviralen Gene E1A und E1B immortalisiert. Zur Produktion von Adeno-Assoziierten Viren	DMEM
HeLa	Humane epitheloide Zervixkarzinom-Zelllinie	DMEM
CO115	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie	DMEM
DLD-1	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie	RPMI
HT29	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie	RPMI
LOVO	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie	RPMI
HBL 100	Humane Mammakarzinom-Zelllinie	RPMI
HS 578 t	Humane Mammakarzinom-Zelllinie, duktal	RPMI, 4 % Insulin
MEC-1	Humane chronische lymphatische B-Zell-Leukämie-Zelllinie	Iscove`s MDM
MCF-7	Humane Mammakarzinom-Zelllinie	RPMI
MM 436	Humane Mammakarzinom-Zelllinie	RPMI
T47d	Humane Mammakarzinom-Zelllinie, duktal	RPMI
MV3	Humane Melanom- Zelllinie	DMEM
SK-N-MC	Humane Neuroblastom-Zelllinie	RPMI
Raji	Humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie	RPMI
Saos-2	Humane Osteosarkom-Zelllinie	RPMI

## 2.7. Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Hybaid-AGS, Heidelberg
Autoklav	MMM, Planegg
Brutschränke	Heraeus, München
DotBlot Apparatur	Invitrogen Corp., Karlsruhe
Durchfluss-Zytometer	Beckmann Coulter, Krefeld
Eagle-Eye	Stratagene, Heidelberg
ELISA Reader	Molecular Devices
Film-Entwicklermaschine Optimax	Protec, Oberstenfeld
Heraeus Zentrifugen	Kendro, Langenselbold
Vacutome HM 500 OM	Microm, Volketswil
Light Cyclers	Roche, Penzberg
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
peristaltische Pumpe (Pump P1)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Meter	Knick, Berlin
Pipettensatz: 2µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf;
Rollhybridisierer	Hybaid-AGS, Heidelberg
Schüttelinkubator	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Spektralphotometer DU 640	Beckmann, München
Sterilbank	Kendro, Langenselbold
Tischzentrifuge	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Ultrazentrifuge	Beckmann, München
UV-Spektrometer Uvikon 941	Kontron Instruments, Eching
Visicam CCD-Kamera	Visitron Systems, Puchheim
Vortexer	Bender & Hobein, Heidelberg
Wasserbad	GFL, Burgwedel

## 2.8. Mikroskope

Mikroskop	Typenbezeichnung	Hersteller
Immunfluoreszenzmikroskop (1)	Axiovert 100	Carl Zeiss, Oberkochen
Immunfluoreszenzmikroskop (2)	Axioskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Konfokales Mikroskop (1)	TCS NT	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Lichtmikroskop	DM IRB	Leica Mikrosysteme, Bensheim

## **3. Methoden**

### **3.1. Kultivierung von Mikroorganismen (Bakterien)**

#### **3.1.1 Plattenkultur**

Mit einer sterilen Impföse wurden Bakterien aus einer Flüssigkultur auf sterile LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C invertiert im Brutschrank inkubiert.

Zur Herstellung der Platten wurde das Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55 °C in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten bei 4 °C invertiert gelagert.

Zur Selektion der Bakterien auf Plasmide wurde dem Medium zusätzlich das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

#### **3.1.2. Flüssigkultur**

Von Plattenkulturen entnommene Einzelkolonien wurden in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 220 rpm und 37 °C inkubiert.

### **3.2. Präparation und Analyse von Nukleinsäuren**

#### **3.2.1 Endotoxinfreie Isolation über Anionenaustauschersäulen**

Für sehr saubere Plasmidpräparationen (Klonierungen, Sequenzierung, Virenverpackung) wurden Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen eingesetzt. Es wurden Präparationen im "Midi"-, "Maxi"- und "Mega"-Maßstab nach den Standardprotokollen und Systemkits Qiagen 100, 500 und 2500 durchgeführt.

Ausgegangen wurde dabei jeweils von einer Bakterien-Übernachtskultur aus 25 ml bis 10 Litern LB-Medium (supplementiert mit Ampicillin: 50 µg/ml). Zur Aufzucht wurden zunächst 5 ml des Mediums mit einer Einzelkolonie von einer Platte oder aus einer Stammkultur beimpft, und dieses nach 12 h bei 37 °C im Schüttler (200 rpm) in entsprechender Menge in das Kulturmedium überführt.

Zur Plasmidisolation wurden die Bakterien abzentrifugiert (3000 rpm, 45 min, 4 °C) und in P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von P2-Puffer wurde die Lösung vorsichtig mehrmals invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von P3-Puffer wurde abermals vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällte chromosomale DNS und Proteinanteile konnten anschließend über Zentrifugation abgetrennt werden (9000 rpm, 40 min, 4 °C). Danach wurde 15 ml Endotoxin Removal Puffer hinzugefügt und bei 4°C für 30 min inkubiert. Während der Zentrifugation wurden die Anionenaustauschersäulen mit QBT-Puffer äquilibriert. Der klare plasmidhaltige Überstand wurde auf die Säulen gegossen.

Die Säulen wurden anschließend mit QC-Puffer mehrmals gewaschen und die DNS schließlich mit QN- oder QF-Puffer eluiert. Die eluierte DNS wurde durch Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol präzipitiert, pelletiert (4000 rpm, 60 min, 4 °C), nach dem Abgießen des Überstandes mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (4000 rpm, 30 min, 4 °C) und nach Absaugen des Überstandes in der Sterilwerkbank in 150 bis 500 µl endotoxinfreiem TE-Puffer aufgenommen.

Die Plasmid-DNS für die Virusherstellung wurde ab diesem Zeitpunkt ausschließlich in der Sterilwerkbank in der Zellkultur handgehabt.

### **3.2.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNS im Agarosegel**

Die Agarose wurde in Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 0,5 µg/ ml versetzt. Das 0,8%ige bis 1,5%ige Agarosegel wurde in eine vorbereitete Form gegossen und nach dem Erstarren in eine entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNS-Proben wurden mit 0,2 Volumen Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TBE-Puffer mit 30 bis 120 V durchgeführt. Die DNS wurde anschließend durch UV-Absorption des interkalierten Ethidiumbromids bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht. Parallel aufgetragene Größenmarker erlaubten eine Abschätzung der Länge der DNS-Fragmente.

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer (DNS-Spektralphotometer DU 640, Firma Beckmann) bestimmt und computerunterstützt ausgewertet. Ein OD<sub>260</sub> Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von ca. 50 µg/ml dsDNS (Maniatis et al., 1989).

Alternativ wurde die Konzentration in einem Agarosegel, durch Vergleich der Bandenintensität mit einem Längenstandard mit bekannter Konzentration für die einzelnen Banden, bestimmt.

### **3.2.3. Restriktionsspaltung von DNS mit Endonukleasen**

Die Spaltung von DNS mit Restriktionsendonucleasen wurde für die Herstellung von Sonden und zur Kontrolle von Plasmiden eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden dabei zwischen 0.2 und 20 µg DNS mit 1 bis 10 U Enzym/µg eingesetzt. Die Spaltung erfolgte über ein bis zwölf Stunden bei vorgegebener Temperatur (meist 37 °C) in 10 bis 100 µl Gesamtvolumen. Standardbedingungen wie erforderlicher 1x Restriktionspuffer, Temperatur und Restriktionsaktivität wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Kontrolle der

Spaltung bzw. die präparative Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

### **3.3. Kultivierung von Zellen und Zellzahlbestimmung**

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um überwiegend adhärente, d.h. auf Oberflächen wachsende Zelllinien. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt. Das Medium wurde je nach Zelllinie variiert (siehe Zelllinien).

Die Zellen wurden je nach Teilungsrate 2-3x/Woche umgesetzt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1%Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden in Verdünnungen von 1:5 bis 1:20 in frisches Medium aufgenommen.

Bei Experimenten in denen eine definierte Zellzahl eingesetzt werden musste, wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Dazu wurde 10µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Der durchschnittliche Wert der Zellzahl pro Großquadrat (16 Kleinquadrate) mit 10<sup>4</sup> multipliziert, entspricht der Zellzahl pro ml.

### **3.4. Adenovirusfreie Verpackung von AAV und Iodixanol-Aufreinigung**

#### **3.4.1. Transfektion**

Die Virusverpackung wurde in 293-Zellen durchgeführt. Dazu wurden 7,5x10<sup>6</sup> Zellen in Zellkulturschalen von 150 mm Durchmesser ausgesät. Am folgenden Tag wurde 2 Stunden vor der Transfektion das alte Medium durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe der CaCl<sub>2</sub> Präzipitationsmethode mit insgesamt 37,5 µg Plasmid-DNS transfiziert. Es wurde ein molares Verhältnis von 1:1:1 zwischen Adenoplasmid (pXX6-80) (R. J. Samulski, Universität North Carolina), dem jeweiligen Transgenplasmid und Helferplasmid (pRC 99). Zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurden pro transfizierter Platte 22.5 µg Adeno-Helferplasmid, 7.5 µg Transgenplasmid und 7.5 µg Helferplasmid in 1 ml 250 mM CaCl<sub>2</sub> pipettiert, gemischt, 1 ml HBS hinzugefügt und abermals gemischt. Bevor der Ansatz auf die Zellen gegeben wurde, wurde er 2 min bei RT inkubiert. Nach 24 Std. Inkubation im Brutschrank bei 37° C, 5 %CO<sub>2</sub> wurde das Medium durch DMEM 2 %FCS ersetzt, und erneut 24 Std. inkubiert.

### **3.4.2. Aufschluss der 293- Zellen**

Die Zellen wurden durch Abkratzen geerntet und bei 3000 x g pelletiert. Die Zellen wurden in 7,5 ml Lysispuffer aufgenommen und 3x im flüssigen Stickstoff eingefroren und im 37°C Wasserbad wieder aufgetaut und anschließend über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Die Präparation wurde am nächsten Tag bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit Benzonase (50U/ml) versetzt um freie RNS und DNS abzubauen. Nach 30 min bei 37°C wurde die Präparation für 20 min bei 3700 x g abzentrifugiert.

### **3.4.3. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung**

Für besonders saubere Viruspräparationen wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Dazu wurde das Volumen des Überstandes nach der Benzonasebehandlung bestimmt und mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung auf eine Endkonzentration von 35 % eingestellt, 20 min auf Eis inkubiert, und 20 min bei 8000 rpm im SS34-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, und eine zweite Fällung mit einer Endkonzentration von 55 % Ammoniumsulfat durchgeführt. Diese wurde bei 12000 rpm im SS34-Rotor zentrifugiert. Das Pellet, welches nun das Virus enthielt, wurde in 7,5 ml PBS/MK aufgenommen und in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Hierin wurde ein Iodixanolgradient aufgebaut indem die Viruslösung zunächst mit 15 % Iodixanol (7 ml) dann mit 25 % (5 ml), mit 40 % (5ml) und anschließend mit 60 % (6 ml) unterschichtet wurde, und zum Schluss mit PBS/MK überschichtet wurde. Der Gradient wurde für 1Std. in der Ultrazentrifuge mit 63000 rpm bei 18°C zentrifugiert. Die 40 % Phase, welche das Virus enthält, wurde abgenommen.

### **3.4.4. Lagerung von AAV**

AAV-Virusstöcke wurden bei -80 °C gelagert und vor ihrer Verwendung auf Eis aufgetaut.

## **3.5. Charakterisierung der AAV-Stöcke**

### **3.5.1. Bestimmung des genomischen Virustiters**

#### **3.5.1.1. Bestimmung des Virustiters mittels der Dot-Blot-Methode**

Der genomische Virustiter wurde über Dot-Blot und anschließende Fluoreszenzdetektion mit Digoxigenin-markierten Sonden bestimmt.

Markierung von DNS-Sonden wurde mit dem DIG-DNA-Labeling und Detektion-Kit nach dem Standard Protokoll der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Für Hybridisierung und Detektion wurde nach einem leicht abgewandelten Protokoll gearbeitet (High-SDS).

### **Herstellung Digoxigenin- markierter DNS-Sonden**

Die zu markierende dsDNS (100 ng - 3 µg) wurde 10 min bei 95 °C im Wasserbad denaturiert und anschließend im NaCl/Eisbad schockgekühlt.

Die Markierung wurde nach der so genannten "random primer labeling" Methode in 20 µl mit folgendem Ansatz durchgeführt:

linearisierte ssDNS	300	Ng
10x Hexanucleotid Mixtur	2	µl
10x DIG dNTP Labeling Mixtur	2	µl
Klenow-Polymerase (2 U/µl)	1	µl
H <sub>2</sub> O	ad 20	µl

Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und 20 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0.5 M EDTA abgestoppt. Abschließend wurde die markierte DNS durch Zusatz von 0,1 Volumen 4 M LiCl und 3 Volumen eiskaltem Ethanol (100 %) für eine Stunde bei -80°C präzipitiert und anschließend bei 4 °C 30 min pelletiert (14000 rpm). Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen, die DNS für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **Proteinase K-Verdau**

Zur Probenvorbereitung für den Dot Blot wurden 2-10µl der Virusproben mit Proteinase K verdaut.

Viruslösung	2-10	µl
PK-Puffer	95	µl
PBS	ad 180,5	µl

Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend wurden 9,5 µl Proteinase K (20mg/ml) zugesetzt und für mindestens 2Std. bei 50°C inkubiert.

### **Dot blot**

Der genomische Virustiter wurde über Dot-Blot bestimmt. Dabei lässt man eine Digoxigenin markierte Sonde an das AAV-Genom hybridisieren, welche wiederum von einem mit einer

alkalischen Phosphatase gekoppeltem Antikörper detektiert wird. Die alkalische Phosphatase katalysiert bei Zugabe eines bestimmten Substrats (CSPD) eine Lumineszenzreaktion.

Über den Intensitätsvergleich der Lichtreaktion mit einem Standard bekannter Partikelkonzentration, kann auf die genomische Partikel pro ml zurückgerechnet werden.

Zur Herstellung der Verdünnungsreihen des Virus-Lysats wurden in einer 96-Well Rundbodenplatte in die erste Reihe pro well 10 µl 10 M NaOH vorgelegt, bis auf zwei Wells für die Kontrollen in welche 198µl 0,5 M NaOH vorgelegt wurde. In die restlichen Reihen wurden jeweils 100 µl 0.5 M NaOH vorgelegt. Zu den 10 µl 10 M NaOH wurden jeweils die 190µl des Proteinase K-Verdau hinzugegeben, dadurch wird die 10µl 10M NaOH auf eine Endkonzentration von 0,5 M NaOH verdünnt. Zu den 198 µl 0,5 M NaOH wurde als Referenz  $16 \cdot 10^8$  doppelsträngige Moleküle (2 µl) des Plasmids pUC AV2 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das Klonierungsplasmid pUC18. Auch hier wurden  $16 \cdot 10^8$  doppelsträngige Moleküle (2 µl) eingesetzt.

Anschließend wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette eine serielle 1:1 Verdünnung erstellt. Dazu wurden die Reihen mit der Multikanalpipette gemischt und anschließend wurde aus jedem Well 100 µl in die nachfolgende Reihe überführt. Die 100 µl abgenommene Lösung des letzten Wells wurde verworfen. Danach wurde auf jedes Well nochmals 100 µl 0,5 M NaOH pipettiert und somit auf ein Endvolumen von 200 µl gebracht. Die Platte wurde locker mit Parafilm überzogen und 60 min bei 37 °C inkubiert.

Zum Blotten wurde die positiv geladene Nylonmembran (Firma Roche, Mannheim) kurz in H<sub>2</sub>O angefeuchtet und 2 min in 0,5 M NaOH inkubiert.

Die Proben der 96-Well-Platte wurden durch Wasserstrahlvakuum auf die Membran geblottet. Zum Crosslinking wurde die Membran anschließend 2 Std. bei 80°C oder 15 min bei 120°C inkubiert und bis zur Hybridisierung zwischen Whatman-Papier bei RT gelagert.

### ***Hybridisierung mit Digoxigenin markierten DNS-Sonden***

Die Nylonmembran des Dot-Blots wurde in ein Hybridisierungsrohr gegeben und im Rollinkubator 15 min bei 42° C in 50 ml SDS-Hybridisierungslösung prähybridisiert. Vor dem Ende der Prähybridisierung wurde die DIG-markierte DNS-Sonde 10 min bei 95 °C denaturiert und im NaCl/Eisbad schockgekühlt. Die Sonde wurde in 15 ml frische SDS-Hybridisierungslösung pipettiert (Endkonzentration 15 ng/ml). Die Prähybridisierungslösung wurde gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Membran über Nacht im Rollinkubator bei 42 °C hybridisiert.

### ***Detektion durch Chemilumineszenz***

Alle weiteren Schritte bis zur Detektion wurden ebenfalls im Rollinkubator bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt.

Die Membran wurde zweimal je 5 min in 2x SSC-Waschlösung bei RT, 2 mal 15 min in 0.1x SSC-Waschlösung bei 65 °C und einmal 1 min in Waschpuffer bei RT äquibriert.

Zur Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran nach der Hybridisierung 30 min in Blockierungspuffer im Rollinkubator bei RT inkubiert und anschließend wiederum 30 min in 15 ml Blockierungspuffer mit Anti-DIG-AP Antikörper (Verhältnis 1:10000).

Die Membran wurde hierauf zweimal 15 min bei RT in Waschpuffer gewaschen und 1 min in Detektionspuffer äquibriert. Währenddessen wurde das Chemilumineszenzsubstrat CSPD<sup>®</sup> in Detektionspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt (500 µl Gesamtvolumen pro Membran). Die Membran wurde mit der vorbereiteten Lösung überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Nach dem Einschweißen in Folie erfolgte eine Inkubation bei 37 °C im Brutschrank über 20 min. Die Membran wurde hierauf in einer Filmkassette auf Röntgenfilm (Kodak Biomax) zwischen 0,5 und 15 min exponiert und der Film zuletzt in einem Standardprozess entwickelt.

### **3.5.1.2. Bestimmung des Virustiters durch quantitative PCR**

#### ***DNS Präparation aus den Viren***

Es wurde weitgehend nach dem DNeasy Protokoll für kultivierte Tierzellen, das dem DNeasy Kit (Qiagen, Hilden) beiliegt, vorgegangen.

2µl Virussuspension wurden zunächst mit 200 µl PBS verdünnt. Es wurden 20 µl ProteinaseK und 200 µl Puffer AL dazu pipettiert und nach gründlichem Mischen für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol hinzugefügt, die Mischung auf eine in einem 2ml-Gefäß steckende DNeasy-Säule pipettiert und für 1min bei 6000x g (8000 rpm) zentrifugiert, um die DNS an die Säule zu binden. Dann wurde die Säule zum Waschen mit 500 µl Puffer AW1 für 1min bei 6000x g (8000 rpm) und mit 500 µl Puffer AW2 für 3min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die DNS wurde mit 200µl Puffer AE (10mM Tris; 5mM EDTA) eluiert.

Zunächst wurden die Sterilwerkbank und alle benötigten Gegenstände 20min unter UV-Licht sterilisiert.

Anschließend wurde der Mastermix für die entsprechende Probenanzahl vorbereitet. Alle Proben wurden dreifach bestimmt.

Mastermix pro 2 µl Probe:            1, 6 µl Magnesiumchlorid  
   0, 1 µl Oligo 1 (EGFP 1 forward, Metabion)  
   0, 1 µl Oligo2 (EGFP 1 reverse, Metabion)  
   2, 0 µl LC-Mix  
   14, 2 µl Wasser

Es wurde jeweils 18 µl Mastermix und 2 µl Proben DNS in die Kapillaren pipettiert. Für die Negativkontrolle wurde die Probe durch Wasser ersetzt, als Positivkontrolle diente ein GFP-Plasmid- Standard der Konzentration 10000Plasmide/ µl.

Die Kapillaren wurden verschlossen, in der LC Karussell Zentrifuge bei 3000rpm für 15s zentrifugiert und mit dem Karussell in den Light Cyler (Roche) gegeben. Über das dazugehörige Computerprogramm wurde das Gerät eingeschaltet und die Proben benannt. Die DNS-Proben werden nun in Zyklen durch abwechselndes Aufschmelzen der Doppelstränge und erneute Doppelstrangsynthese amplifiziert. In die doppelsträngige DNS wird ein Fluoreszenzfarbstoff eingelagert, so dass ihre Konzentration bestimmt werden kann

### ***Auswertung***

Zur Auswertung wurde zunächst die Schmelzkurve herangezogen:

Sie gibt die Dissoziation der doppelsträngigen DNS, entsprechend der detektierten Fluoreszenz, in Abhängigkeit von der Temperatur an. Sehr reine Proben dissoziieren einheitlich bei einer bestimmten Temperatur, so dass man einen starken Abfall der Kurve sehen kann. Noch deutlicher wird dies, wenn man die erste Ableitung der Schmelzkurve, also deren Steigung, betrachtet. Dort zeigt sich dann ein schmaler Peak.

Außerdem lassen sich auch die Schmelzkurven der einzelnen Proben vergleichen, um festzustellen, ob es sich um einheitliches Material handelt.

Die Amplifikationskurve gibt die detektierte Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklenanzahl an. Durch den Zeitpunkt, zu dem die Fluoreszenz einer Probe die Nachweisgrenze überschreitet und exponentiell ansteigt, lässt sich mit Hilfe einer Standardkurve (angefertigt von Markus Aicher, Genzentrum, München) und der Positivkontrolle, deren Konzentration bekannt ist, auf die gesuchte Ausgangskonzentration der DNS in der Probe schließen.

### **3.5.2. Bestimmung des infektiösen Titers mittels Durchflusszytometrie**

Zur Ermittlung des infektiösen Virustiters wurden HeLa-Zellen auf Plastik Kulturschalen (12Well-Platten) ausgesät und nach einem Tag in unterschiedlichen Verdünnungen mit rAAV-Viruspräparationen infiziert. Zur Bereitstellung der für die AAV-Replikation notwendigen Helferfunktionen wurden die Zellen 4 h vor Infektion für 2 h mit einer <sup>137</sup>Cs-Quelle (GSF, Hämatologikum, München) mit einer Dosis von 50-100 Gy bestrahlt. Nach 2 Tagen wurde dann die Anzahl der HeLa-Zellen, die als Transgen (green fluorescent protein (GFP)) exprimieren, durch Durchflusszytometrie bestimmt. Anhand der Anzahl infizierter

Zellen und über die entsprechende Verdünnungsreihe konnte auf die Zahl infektiöser Partikel im Virusstock zurückgerechnet werden.

### **3.5.3. Bestimmung des Kapsidtiters mittels ELISA**

Es wurden je 100 µl aus zuvor angefertigten Verdünnungen der Virusproben und des Kapsidstandards (Progen) im Probenpuffer (Progen) auf eine mit A20 gecoatete Multititerplatte (Progen) pipettiert. Die Platte wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde 3x mit je 200 µl Waschpuffer (Progen) gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit je 100 µl eines Anti-AAV Biotin Konjugats (Progen) für eine Stunde bei 37°C. Es wurde erneut wie oben gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl eines Streptavidin-Peroxidase Konjugats (Progen) pro Well zugesetzt und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Es wurde wie oben gewaschen. Die Platte wurde mit je 100 µl Substrat (TMB von Progen) versetzt und 10 - 15min im Dunklen inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe der Stop-Lösung (Progen) gestoppt. Die Farbreaktion wurde gemessen und ausgewertet. Genaue Zusammensetzung der Lösungen wurde von Progen nicht angegeben.

### **3.5.4. Charakterisierung des selbstkomplementären Anteils der verpackten DNS**

#### **3.5.4.1. DNS-Präparation aus AAV**

Es wurde weitgehend nach dem DNeasy Protokoll für kultivierte Tierzellen, das dem Dneasy Kit (Qiagen) beiliegt, vorgegangen.

200µl Virussuspension wurden zunächst mit 200 µl PBS verdünnt. Es wurden 20 µl ProteinaseK und 200 µl Puffer AL dazu pipettiert und nach gründlichem Mischen für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol hinzugefügt, die Mischung auf eine in einem 2ml-Gefäß steckende DNeasy-Säule pipettiert und für 1min bei 6000x g (8000 rpm) zentrifugiert, um die DNS an die Säule zu binden. Dann wurde die Säule zum Waschen mit 500 µl Puffer AW1 für 1min bei 6000x g (8000 rpm) und mit 500 µl Puffer AW2 für 3min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die DNS wurde mit 200µl Puffer AE (10mM Tris; 5mM EDTA) eluiert.

#### **3.5.4.2. Alkalisches Agarosegel**

1g Agarose wurde in 100ml Wasser aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde die Lösung mit 2,5ml 2N NaOH (auf eine Konzentration von 50mM) und 200µl 0,5M EDTA (auf eine Konzentration von 1mM) versetzt. Das alkalische Agarosegel wurde in eine vorbereitete Form gegossen und nach dem Erstarren in eine entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNS-Proben (100µl)

wurden mit NaOH auf eine Konzentration von 50mM und mit EDTA auf eine Konzentration von 1mM versetzt. Anschließend wurden ihnen 0,2 Volumen alkalischer Auftragspuffer beigemischt. Als Positivkontrolle wurden 15µl DNS-Molekül-Gewichts-Standard II (HIND III verdauter Lamda-Phage), Digoxigenin markiert (Roche) verwendet. Wegen der pH-Empfindlichkeit der Digoxigenin-Markierung wurde die Positivkontrolle weder mit NaOH und EDTA noch mit alkalischem Laufpuffer versetzt. Stattdessen wurde neutraler Auftragspuffer verwendet. Die Elektrophorese wurde in alkalischen Laufpuffer mit 40 bis 50 V durchgeführt. Da durch das alkalische Milieu der Farbstoff nicht sichtbar blieb, konnte nicht abgeschätzt werden, wie weit die DNS gelaufen war, so dass nach mehreren Versuchen die Dauer auf 5h standardisiert wurde. Anschließend wurde das Gel 2h in Neutralisierungspuffer geschwenkt.

Als Kontrolle wurde ein neutrales 1 % Agarosegel gegossen. Die Agarose wurde in Tris-Borat- EDTA (TBE) Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgekocht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde die Lösung in eine vorbereitete Form gegossen und nach dem Erstarren in eine entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNS-Proben wurden mit 0,2 Volumen Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TBE-Puffer mit 80 - 100V für 2,5 h durchgeführt.

#### **3.5.4.3. Southernblot**

Dazu wurde das Gel 15min in 0,25M HCl geschwenkt, kurz mit Wasser gespült und erneut 20 min in 0,5M NaOH; 1,5M NaCl denaturiert.

Es wurde eine Wanne mit 20x SSC gefüllt und ein Plastikgitter darüber gelegt. Ein mit 20x SSC befeuchtetes Whatman-Papier wurde an 2 Seiten in das 20x SSC der Wanne hängend auf das Gitter gelegt. Das Gel wurde mit den offenen Taschen nach unten darauf gelegt. Eine befeuchtete positiv geladenen Nylonmembran, in der Größe des Gels, wurde (ohne Luftblasen dazwischen) unmittelbar auf das Gel gelegt. Darüber wurden (wiederum genau auf die Größe des Gels zugeschnitten) 5 befeuchtete Whatman-Papiere und zahlreiche trockene Papiertücher gestapelt und mit einer Wanne, in der sich eine Flasche befand beschwert.

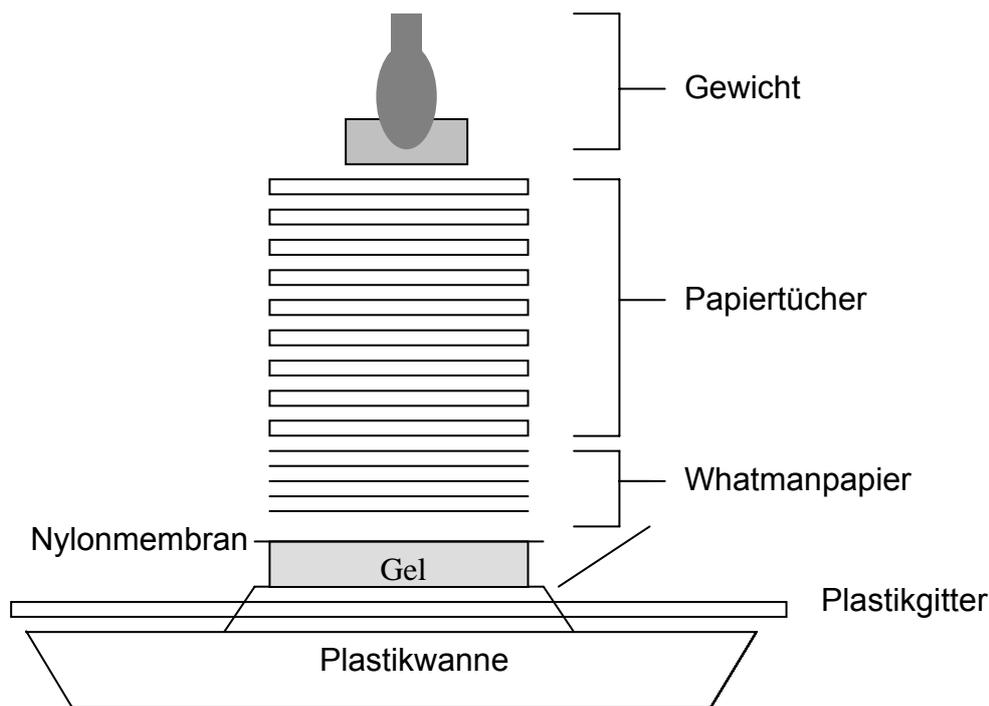


Abbildung 8: Aufbau des Southern blots

Durch Kapillarkräfte wurde das 20x SSC als Transferpuffer durch das Gel gesogen bei wurden die DNS-Moleküle mit gesogen und blieben an der positiv geladenen Membran hängen. Nach einer halben Stunde wurden die ersten feuchten Papiertücher entfernt, um die Saugkraft zu erhöhen. Nach 14 - 16 h wurde die Membran von dem Gel abgezogen, zwischen Whatman-Papier gelagert und zum Crosslinking 2 h bei 80°C oder 15 min bei 120°C inkubiert. Anschließend wurde die DNS wie beim Dot blot beschrieben (siehe oben) mit Digoxigenin markierten DNS-Sonden hybridisiert und nach mehreren Waschschritten durch Chemilumineszenz detektiert.

### 3.6. Infektionen verschiedener Tumorzelllinien *in vitro* und Quantifizierung der GFP-Expression mittels Durchflusszytometrie

Für die Transduktion wurden die Zelllinien auf 12- bzw. 24- well- Platten ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Infektion zu ca. 50 % konfluent waren. Alle Versuche wurden im Triplikat durchgeführt. Ebenso gab es jeweils 3 Negativkontrollen, bei den Versuchen, bei denen es relevant war, auch mit und ohne MG132. Bei der Auswertung der Experimente wurde die Standardabweichung berechnet. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

Für die ersten Versuche (Vergleich ssAAV und dsAAV) wurde der infektiöse Titer der Viren verwendet. Eingesetzt wurden zwischen 0,5 und 100 infektiöse Partikel pro Zelle. Es wurde zunächst das jeweilige Medium entfernt und durch 200 µl frisches ersetzt. Anschließend

wurde das Virus dazu pipettiert. Nach 2 - 3 h Inkubation bei 37°C wurden weitere 800µl Medium dazugegeben.

In den späteren Versuchen (Vergleich ssAAV, dsAAV, scAAV, jeweils mit und ohne MG132) wurde der genomische Titer verwendet. Es wurden 500 - 10000 genomische Partikel pro Zelle verwendet.

Der Proteasomen-Inhibitor MG132 wurde zunächst 1:10 in RPMI-Medium vorverdünnt. Das jeweilige Medium, die benötigte Virusmenge und MG132 in einer Konzentration von 10µM wurden jeweils für drei Proben gemischt. Das Medium der Zellen wurde dann durch dieses Gemisch ersetzt. Nach 3 - 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde es dann wieder entfernt und durch das jeweils benötigte Zellmedium ersetzt.

Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C für 2 Tage wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die adhären Zellen mit Trypsin von der Platte gelöst und in Zellmedium bei 2700 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Medium resuspendiert und in Durchflusszytometrieröhrchen überführt.

Durch Durchflusszytometrie konnte nun die GFP-Expression quantifiziert werden, in dem die Fluoreszenz der Zellen im FITC-Kanal mit den Negativkontrollen verglichen wurde.

### **3.7. Spheroid-Modell**

#### **3.7.1. Generierung von Spheroide in hängenden Tropfen**

Zur Herstellung von Spheroide wurden 250-2500 HeLa-Zellen in 20µl DMEM auf 60well Mikrotiterplatten oder direkt auf Deckgläser ausgesät. Anschließend wurden die Platten umgedreht, so dass die Zellsuspension, durch die Oberflächenspannung gehalten, als Tropfen herabhing. Um die Spheroide vor dem Austrocknen zu schützen, wurden die Platten bzw. Deckgläser zusammen mit einem kleinen mit PBS gefüllten Schälchen in einer Zellkulturschale im Brutschrank ( 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt) aufbewahrt. Die Zellen bildeten einen Klumpen, der nach einer Woche nicht mehr merklich größer wurde. Folglich wurden an Tag 7 die Spheroide mit rAAV infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die GFP-Expression unter dem konfokalen Mikroskop untersucht. Dazu wurden die Spheroide, so fern sie nicht direkt auf Deckgläsern gezüchtet wurden, mit Hilfe einer 20µl Pipette mit abgeschnittener Spitze auf Deckgläser transferiert.

#### **3.7.2. Konfokale Laser-Mikroskopie**

Bei der konfokalen Mikroskopie wird der Laserstrahl durch das Objektiv auf einen Punkt der Probe zu fokussiert, dessen Lichtabstrahlung detektiert werden soll (der fokale Punkt). Zu einem bestimmten Zeitpunkt wird somit ein bestimmter Punkt der Probe angeregt. Die Abbildung der gesamten Probe wird durch Rasterung der Probe erzeugt, also durch räumliches Verschieben des Lasers von Punkt zu Punkt. Das von der Probe reflektierte Licht

und die emittierte Fluoreszenz passieren das gleiche Objektiv durch welches das Anregungslicht kommt. Die Optik des Mikroskops und des Raster-Moduls fokussieren das von dem fokalen Punkt emittierte Fluoreszenzlicht in einen zweiten Punkt, den konfokalen Punkt. Die Lochblende (Pinhole) welche im konfokalen Punkt justiert ist, blendet alles Licht, welches ober- oder unterhalb der Fokalebene kommt, aus, nur das Licht aus der Fokalebene gelangt zum Detektor. Dies ermöglicht eine schichtweise Untersuchung der Spheroide zur Lokalisierung der GFP-Expression.

Als Lichtquelle diente in unserem Fall ein Argon-Krypton Laser mit den Anregungswellenlängen: 488nm, 568nm und 647 nm

Es wurden Plan Apo Öl-Immersionsojektive mit einem Vergrößerungsfaktor von 20x oder 40x und einer numerischen Apertur (NA) von 1,32 verwendet.

### **3.8 Subkutanes Tumormodell in der SCID-Maus**

#### **3.8.1 Versuchsaufbau**

##### ***Mäuse***

Es handelte sich um 12 - 16 Wochen alte SCID (severe combined immuno deficiency)-Mäuse (Taconic M+B, Ry, Dänemark).

##### ***Vorbereitung der HeLa-Zellen***

Die HeLa-Zellen wurden mit PBS gespült, mit Trypsin aus den Flaschen gelöst und in DMEM/10 % FCS 8 min bei 4°C mit 280x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in 30 ml kaltem HBSS resuspendiert, 6 min bei 4°C mit 280 x g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Dies wurde dreimal wiederholt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Die Zellkonzentration wurde auf 1000000/ 100 µl mit HBSS verdünnt.

##### ***Injektion der HeLa-Zellen***

Den SCID Mäusen wurden durch Michael Hagemann (GSF, München) beidseits subcutan jeweils 1000000 HeLa-Zellen in einem Volumen von 100µl HBSS injiziert.

##### ***Infektion in vivo***

Nach acht Tagen wurden jeweils 40µl ssAAV(GFP) oder scAAV(GFP) intratumoral injiziert (Michael Hagemann, GSF, München). Die Negativkontrollen unter den Tumoren bekamen keine Injektion.

##### ***Töten der Mäuse und Präparation der Tumoren***

Es wurden Mäuse an Tag 2, 4, 7, 14 und 21 getötet.

Die SCID Mäuse wurden mit Kohlendioxid getötet. Die Tumoren wurden mit Pinzette und Schere herauspräpariert.

Ein Teil der Tumore wurden für Gefrierschnitte sofort in Alufolie verpackt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden sie bei -80°C gelagert.

Der andere Teil der Tumore für die Durchflusszytometrie wurden bei Raumtemperatur in PBS gegeben und durch ein Sieb gestrichen, um die Zellen zu vereinzeln.

### **3.8.2. Nachweis der Virus-DNS im Tumorgewebe**

Der Tumor wurde mit einer Feinwaage gewogen, anschließend mit einem Skalpell sehr fein zerkleinert. Es wurde 0,01 g zerkleinertes Tumorgewebe eingesetzt, d.h. in 180 µl Puffer ATL (Qiagen) resuspendiert mit 20 µl Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Puffer AL dazu gegeben und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Weiter wurde die Probe mit 200 µl 100 % Ethanol versetzt, auf eine Minisäule pipettiert und zentrifugiert (8000 rpm, 1 min). Danach erfolgten zwei Waschschriffe mit Puffer AW1 und AW2, bevor die DNS in 200 µl Puffer EB eluiert wurde.

Die DNS-Konzentration wurde an Hand der optischen Dichtemessung bestimmt, damit in die quantitative PCR 10 ng DNS eingesetzt werden konnten (quantitative PCR siehe oben).

### **3.8.3. Nachweis der GFP-Expression in Tumorgewebe**

#### **3.8.3.1. Fluoreszenzmikroskopie an Gefrierschnitten**

Die Schnitte wurden am Vacutome, Microm angefertigt. Die Schnittgeschwindigkeit betrug 3-4, das Vakuum 6-8, die Objekttemperatur - 18°C, die Umgebungstemperatur im Gerät - 21°C. Die Schnittdicke betrug 14 – 16 µm. Die Schnitte wurden auf Polysine Objektträger aufgenommen, 1-2 Stunden luftgetrocknet und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Vor dem Mikroskopieren wurden die Schnitte 30 min bei 4°C mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und sofort angesehen, um den Hintergrund gering zu halten.

#### **3.8.3.2. Durchflusszytometrie**

Die vereinzelteten Tumorzellen wurden (wie oben beschrieben) in PBS aufgenommen. Anschließend wurde der Anteil der GFP-exprimierender Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Verpackung von doppelsträngigen AAV

Die Doppelstrangsynthese aus der einzelsträngigen Virus-DNS in der Zielzelle stellt einen limitierenden Schritt auf dem Weg zur AAV-vermittelten Transgen-Expression dar. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von AAV-Vektoren, die primär eine doppelsträngige DNS enthalten, die Transduktionseffizienz deutlich gesteigert werden kann. Das Wildtyp AAV-Genom ist 4,7 kb groß. Bei der Verpackung von rekombinanten AAV liegt das Optimum ebenfalls bei 4,7kb. Zur Herstellung von primär doppelsträngigem AAV wurde zunächst ein neues AAV-Konstrukt verwendet, bei dem von 2 ITRs flankierte DNS Stücke mit nur 2,3 kb Länge als Plasmid bei der Vektorverpackung eingesetzt wurden.

Es wurde erwartet, dass entweder einmal 4,7kb oder zweimal 2,3kb von ITRs flankierte DNS in ein Viruskapsid verpackt werden könnte.

Dabei bestand die Möglichkeit, dass zwei DNS Stücke gleicher oder entgegengesetzter Polarität in ein Kapsid verpackt wurden. In einigen Viren erwarteten wir nur ein DNS Stück von 2,3 kb Länge. Die wünschenswerte Option war, dass Replikationsintermediate, die nach Doppelstrangsynthese während des lytischen Replikationszyklus nicht gespleißt wurden, als 4,7 kb lange doppelsträngige Schleifen verpackt wurden.

Es wurde zunächst untersucht, wie hoch der Anteil der wirklich selbstkomplementären DNS war. Unter denaturierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass etwa 90 % der DNS-Stücke eine Länge von 2,3 kb besitzen. Nur etwa 10 % bilden wirklich 4,7kb lange selbstkomplementäre DNS.

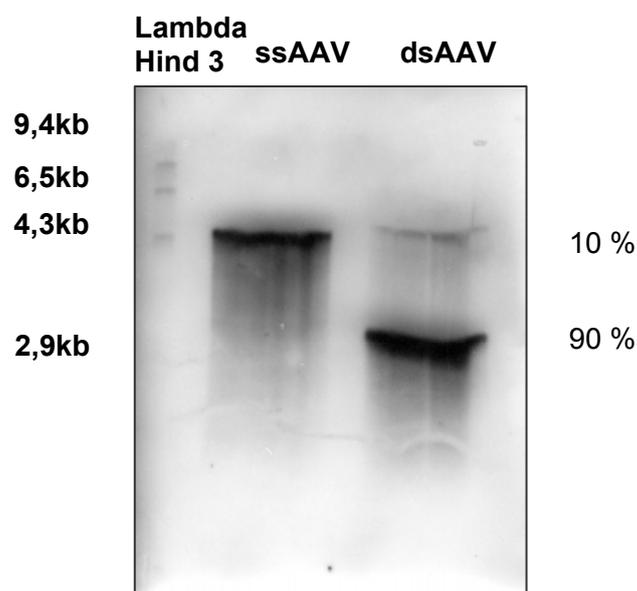


Abbildung 9: Alkalisches Agarosegel zur Auftrennung von ssAAV und dsAAV unter denaturierenden Bedingungen. Aufgetragen wurden der Größenmarker Lambda Hind 3 sowie ssAAV und dsAAV. ssAAV enthält ein 4,7 kb großes rekombinantes Genom, bei der Verpackung von dsAAV werden 2,3 kb große DNS Stücke verwendet, die in 10 % der Vektoren als ein 4,7 kb langes selbstkomplementäres Genom verpackt wurden.

## 4.2. Gentransfer-Effizienz von doppelsträngigen AAV in Tumorzellen *in vitro*

Im nächsten Schritt untersuchten wir die quantitativen Unterschiede in der Transgen-Expression in soliden Tumorzelllinien nach Infektion mit einzelsträngigen rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (ssAAV) und doppelsträngigen rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (dsAAV) *in vitro*.

Dafür wählten wir eine Zervixkarzinom-, eine Osteosarkom- und vier Kolonkarzinom-Zelllinien. Je nachdem wie leicht sich eine Zelllinie infizieren ließ, wurden verschiedene Anzahlen infektiöser Partikel pro Zelle (MOI: Multiplicity of infection) eingesetzt.

Die Virusmengen wurden an Hand des infektiösen Titers abgeglichen. Da die HeLa-Zellen zur Bestimmung des infektiösen Titers bestrahlt wurden, war die Doppelstrangsynthese kein limitierender Faktor mehr und die Anzahlen der Viren waren vergleichbar. In einem Vorversuch wurde dies bestätigt, indem bestrahlte und unbestrahlte HeLa-Zellen jeweils mit ssAAV und dsAAV (MOI 1 und 5) infiziert wurden. Zwei Tage nach der Infektion wurde durch Durchflusszytometrie die Anzahl GFP-exprimierender Zellen ermittelt. Auf Grund der gleichen Anzahl infektiöser Partikel gab es auf bestrahlten HeLa-Zellen keinen wesentlichen Unterschied in der Anzahl GFP-exprimierender Zellen. Die GFP-Expression der mit ssAAV infizierten unbestrahlten HeLa-Zellen war hingegen deutlich geringer als die der mit dsAAV infizierten, die gegenüber den bestrahlten Zellen kaum abfiel.

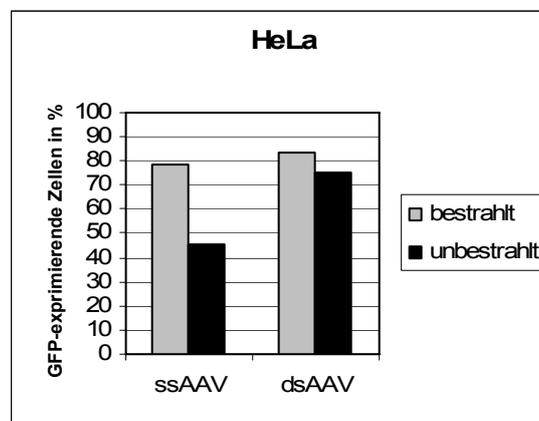


Abbildung 10: Vergleich der Anteile GFP exprimierender Zellen [y-Achse] 2 Tage nach Infektion bestrahlter (grauer Balken) und unbestrahlter (schwarzer Balken) HeLa Zellen mit ssAAV und dsAAV [x-Achse] jeweils MOI 5

Der infektiöse Titer wurde dem genomischen Titer vorgezogen, da zu diesem Zeitpunkt nicht klar war, bei welchem Anteil der dsAAV Verpackung tatsächlich zwei GFP-Genome in ein Kapsid gelangen.

Die mit Hilfe eines ELISAs festgestellten Kapsidtiters bestätigte das Verhältnis der infektiösen Titer.

Im Folgenden wurden ssAAV und dsAAV auf den verschiedenen Zelllinien solider Tumore verglichen.

2 Tage nach Infektion der Zervixkarzinom Zelllinie *HeLa* konnte bei der MOI 0,5 mit ssAAV ein Anteil GFP-exprimierender Zellen von  $22,7 \pm 4,1\%$  detektiert werden, hingegen mit dsAAV  $54,3 \pm 2,3 \%$ , bei der MOI 1 waren es  $30,6 \pm 4,2 \%$  mit ssAAV und  $73,4 \pm 0,86 \%$  mit dsAAV, bei der MOI2  $48,5 \pm 7,9 \%$  mit ssAAV und  $88,5 \pm 1,0 \%$  mit dsAAV sowie bei der MOI5  $77,8 \pm 1,6 \%$  mit ssAAV und  $96,7 \pm 0,92 \%$  mit dsAAV. Gerade bei den niedrigeren MOIs ließ sich der Anteil GFP-exprimierender Zellen also mehr als verdoppeln.

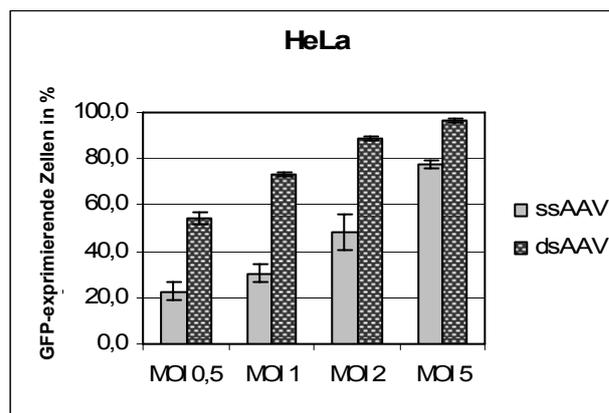


Abbildung 11: Anteil GFP-exprimierender Zellen [y-Achse] 2 Tage nach Infektion mit ssAAV (grauer Balken) oder dsAAV (schattierter Balken) bei unterschiedliche MOIs [x-Achse]

2 Tage nach Infektion der Kolonkarzinom Zelllinie *CO115* wurde bei Verwendung von ssAAV mit einer MOI 10 ein Anteil GFP-exprimierender Zellen von  $30,2 \pm 1,7 \%$  gegenüber  $69,0 \pm 4,2 \%$  bei Verwendung von dsAAV gemessen, mit einer MOI 20 ergab sich für ssAAV ein Wert von  $35,8 \pm 1,9 \%$  sowie für dsAAV  $78,3 \pm 3,9 \%$  und mit einer MOI 30 für ssAAV  $41,6 \pm 3,3 \%$  und für dsAAV  $80,7 \pm 4,0 \%$ . Auch bei diesen Zellen steigerte sich die Transduktionsrate auf etwa das Doppelte. (vgl. Abbildung 12)

Die Bestimmung des Anteils GFP-exprimierender Zellen ergab nach Infektion der Kolonkarzinom Zelllinie *LS180* mit einer MOI 10 für ssAAV  $7,6 \pm 1,1 \%$ , für dsAAV  $30,2 \pm 4,5 \%$ , mit einer MOI 20 für ssAAV  $9,6 \pm 0,92 \%$ , für dsAAV  $33,0 \pm 3,7 \%$  sowie mit einer MOI 40 für ssAAV  $11,3 \pm 2,2 \%$  und für dsAAV  $38,6 \pm 4,8 \%$ . Die Anzahl GFP-exprimierender Zellen wurde durch Verwendung von dsAAV auf mehr als das dreifache gesteigert. (vgl. Abbildung 12)

Die Untersuchung der Kolonkarzinom-Zelllinie *DLD-1* zeigte bei Infektion mit einer MOI 5  $23,7 \pm 2,8 \%$  GFP-exprimierende Zellen für ssAAV, für dsAAV  $68,6 \pm 2,0 \%$ , mit einer MOI 10

31,3± 4,4 % für ssAAV gegenüber 78,3± 4,9 % für dsAAV und mit einer MOI20 43,2± 4,2 % für ssAAV und 89,4± 3,1 % für dsAAV. Es kam wieder zu einer Steigerung auf das zwei bis dreifache durch dsAAV. (vgl. Abbildung 12)

In der Kolonkarzinom-Zelllinie *HT29* führte die Infektion bei einer MOI 10 mit ssAAV als Vektor zu 2,0± 0,82 % GFP-exprimierenden Zellen gegenüber 5,4± 1,0 % mit dsAAV, bei einer MOI50 zu 3,8± 0,61 % für ssAAV, 9,0± 0,58 % für dsAAV und bei einer MOI100 zu 3,8± 0,09 % für ssAAV und 10,6± 0,31 % für dsAAV. Die Transduktionsrate verdoppelte sich auch bei dieser Zelllinie durch Verwendung des doppelsträngigen Virus.

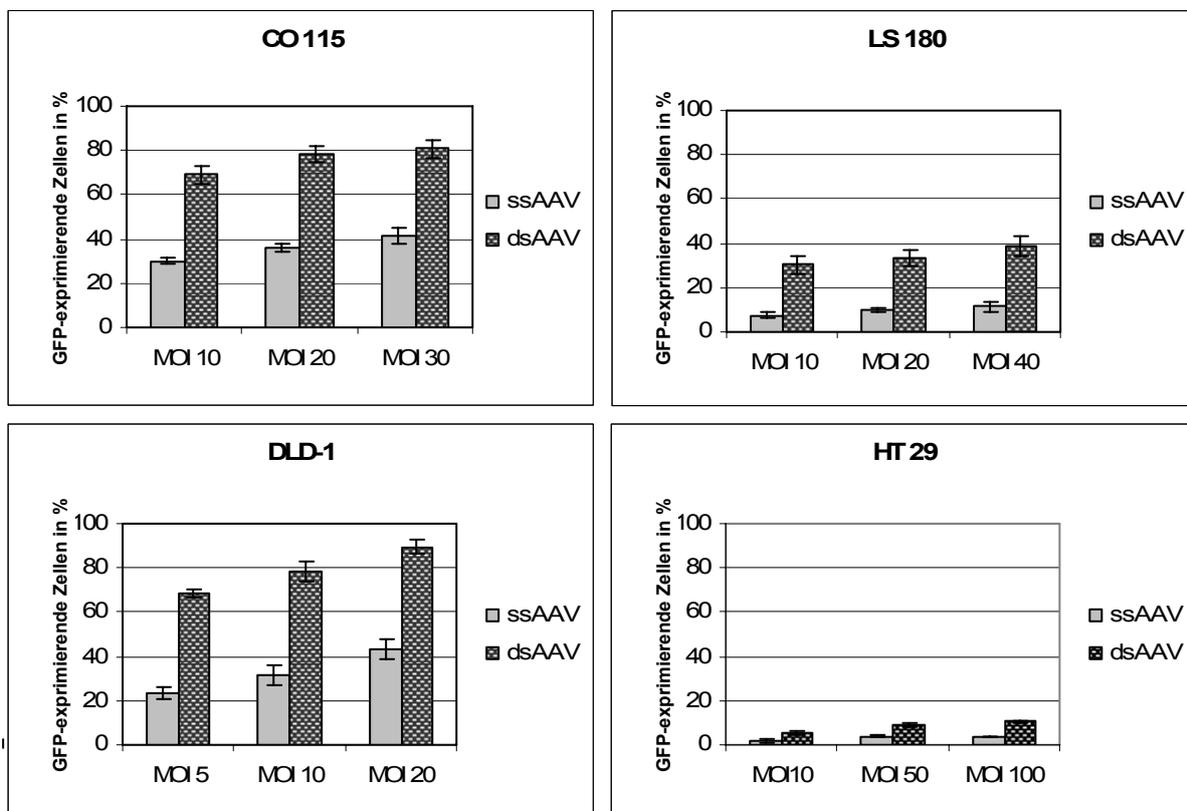


Abbildung 12: Anteil GFP-exprimierender Zellen [y-Achse] verschiedener Kolonkarzinom-Zelllinien 2Tage nach Infektion mit ssAAV (grauer Balken) oder dsAAV(schattierter Balken) in verschiedenen MOIs [x-Achse]

In der Sarkom-Zelllinie *Saos-2* konnte durch Infektion mit ssAAV mit der MOI10 eine GFP-Expression in 7,2± 0,43 % der Zellen erreicht werden, mit dsAAV in 27,1± 2,2 %, nach Erhöhung der MOI auf 30 mit ssAAV in 10,8± 0,85 % und mit dsAAV in 51,0± 2,8 % der Zellen. In dieser Zelllinie konnte durch dsAAV sogar eine Erhöhung des Anteils GFP-exprimierender Zellen auf das 4- 5 fache erzielt werden.

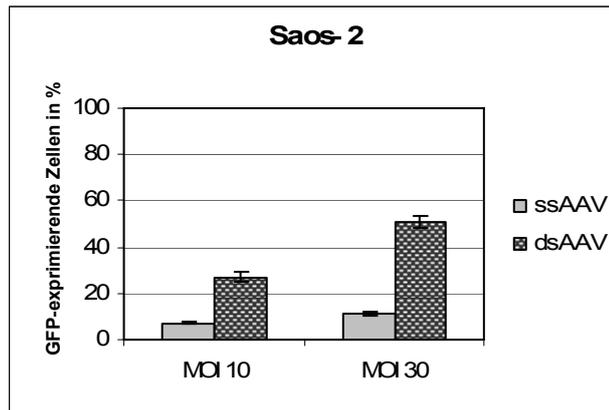


Abbildung 13:  
 Anteil GFP-exprimierender Zellen [y-Achse] der Osteosarkomzelllinie Saos-2, 2Tage nach Infektion mit ssAAV (grauer Balken) oder dsAAV (schattierter Balken) bei MOI 10 und 30 [x-Achse]

### 4.3. Generierung von selbstkomplementären AAV (scAAV)

Da durch dsAAV in allen Versuchen eine 2- bis 5- fach höhere GFP-Expression als durch ssAAV erzielt werden konnte, obwohl nur 10 % der Viren selbstkomplementäre DNS enthielten, wollten wir testen wie sich die Transduktionseffizienz von AAV verhalten würde, wenn (fast) alle Vektoren selbstkomplementäre DNS enthielten.

Deshalb wurde von Franz Gerner und Tobias Herold ein Plasmid kloniert, das ebenso wie das pdsAGFPFG ein 2,3kb langes DNS-Stück flankiert von zwei ITRs enthielt, allerdings war hier eine Deletion im Bereich der terminal resolution site eingefügt. Dies führt dazu, dass kein Strangabbruch erfolgt und die Replikation von einem ITR ausgehend über das mutierte ITR hinweg fortgesetzt wird, um das Genom erneut zu durchlaufen. Dieses pscAGFPFG Plasmid wurde zur adenovirusfreien Verpackung von scAAV verwendet. In einem alkalischen Agarosegel zeigte sich das scAAV zu mehr als 90 % selbstkomplementäre Viren enthielt.

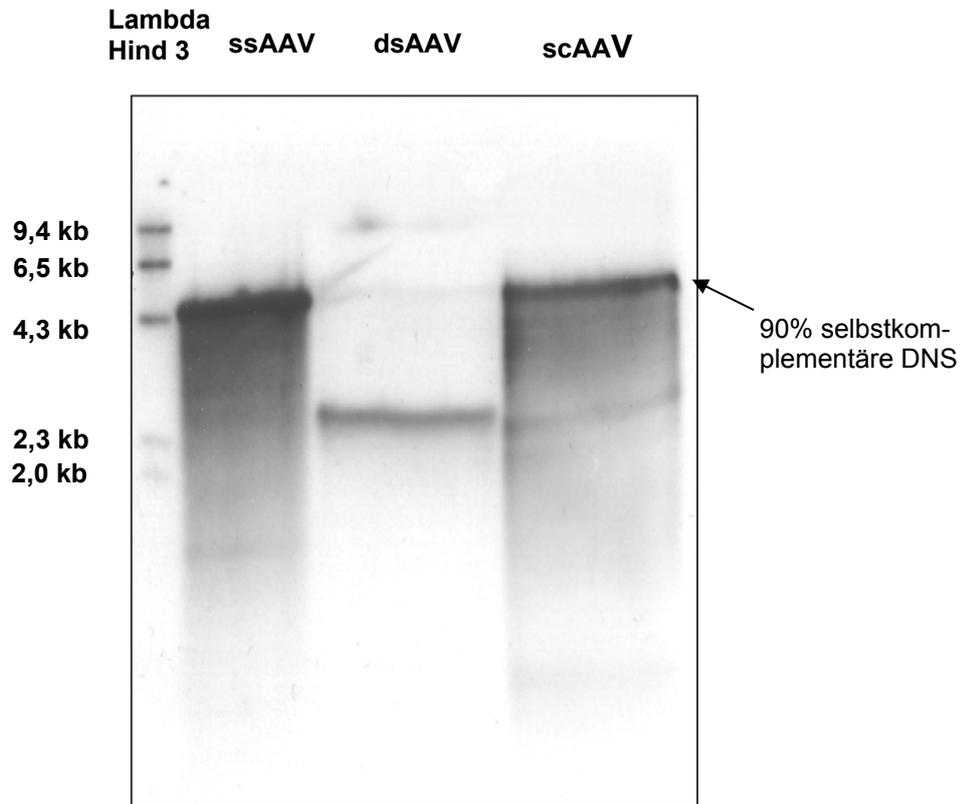


Abbildung 14: Alkalisches Agarosegel zur denaturierenden Auftrennung von ssAAV, dsAAV und scAAV: Aufgetragen wurden der Größenmarker Lambda Hind 3, ssAAV, dsAAV und scAAV.

Der rekombinante AAV Vektor ssAAV (links) enthält eine einzelsträngige DNS von 4,7 kb Größe analog zum Wildtyp Virus. dsAAV(Mitte) und scAAV(rechts) sind verschiedene Konstrukte von nur 2,3 kb Größe zur Generierung selbstkomplementärer Vektoren.

Etwa 90 % der dsAAV Vektoren enthalten einzelsträngige 2,3 kb lange DNS und nur 10 % enthalten selbstkomplementäre DNS (4,7 kb).

Bei scAAV Vektoren war der Anteil selbstkomplementärer DNS mit 90 % wesentlich höher.

#### 4.4. Möglichkeiten zur Verbesserung der Transgen-Expression beim AAV-vermittelten Gentransfer

##### 4.4.1. Erhöhung der Effizienz von AAV durch Verwendung von selbstkomplementären Vektoren

Es erfolgte nun der quantitative Vergleich der Transgen-Expression in Tumorzelllinien nach Infektion mit einzelsträngigem rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (ssAAV), doppelsträngigem rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (dsAAV) und selbstkomplementärem rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (scAAV).

Da scAAV tatsächlich selbstkomplementär war, konnte nun zum Vergleich der Konzentration gegenüber rAAV der genomische Titer herangezogen werden, der mit Hilfe der Real-Time-PCR (RT-PCR) ermittelt wurde. Nachdem davon auszugehen war, dass jedes scAAV-

Viruspartikel zwei GFP-codierende DNS-Sequenzen enthielt, wurde die Hälfte der Anzahl der detektierten Genome als Titer angenommen. Bei dsAAV hingegen konnte nicht festgestellt werden, wie häufig nur eine GFP-codierende DNS-Sequenz in ein Kapsid verpackt wurde oder eine zweite zusätzlich, die jedoch keine selbstkomplementäre DNS bildeten. Deswegen nahmen wir an, dass jedes detektierte GFP-Genom einem Viruspartikel entsprach und überschätzten damit bewusst den Titer. Dies erklärt, weshalb die GFP-Expression nach Infektion mit dsAAV nicht oder nur geringfügig höher war als mit einzelsträngigem ssAAV.

Die GFP-Expression nach scAAV-vermitteltem Gentransfer war bei allen soliden Tumorzelllinien höher als mit einzelsträngigem rAAV. Die einzige getestete Zelllinie, die sich selbst mit scAAV nicht effizient infizieren ließ, war MEC-1, eine humane B-CLL-Zelllinie. Es ergaben sich im einzelnen folgende Werte für die Transgen-Expression in den untersuchten Zelllinien:

Die Infektion der Kolonkarzinom-Zelllinie *CO115* mit 5000 genomischen Partikeln pro Zelle führte unter Verwendung von ssAAV zu einem Anteil GFP-exprimierender Zellen von  $21,5 \pm 0,6$  %, bei dsAAV von  $35,0 \pm 0,8$  % und bei scAAV von  $79,7 \pm 1,7$  %. Durch scAAV ließ sich die Transduktionsrate folglich auf fast das 4-fache gegenüber ssAAV erhöhen (vgl. Abbildung 15).

Die Mammakarzinom-Zelllinie *HS 578 t* wurde mit 10000 genomischen Partikeln pro Zelle infiziert. Die Verwendung von ssAAV führte zu einer GFP-Expression in  $58 \pm 1,9$  % der Zellen, von dsAAV zu einer GFP-Expression in  $41,9 \pm 2,2$  % der Zellen und von scAAV zu einer GFP-Expression in  $77,9 \pm 3,1$  % der Zellen. Durch Verwendung von scAAV wurde somit eine Steigerung des Anteils GFP-exprimierender Zellen um etwa 30 % erzielt (vgl. Abbildung 15).

Nach Infektion der B-CLL-Zelllinie *MEC-1* mit 10000 genomischen Partikeln pro Zelle konnten bei ssAAV  $1,1 \pm 0,2$  %, bei dsAAV  $1,0 \pm 0,2$  % und bei scAAV  $1,2 \pm 0,2$  % GFP-exprimierende Zellen detektiert werden. Diese Zelllinie ließ sich mit AAV-Vektoren unabhängig, ob sie einzel- oder doppelsträngige DNS enthielten, nicht effizient transduzieren (vgl. Abbildung 15).

Die Infektion der Burkitt-Lymphom-Zelllinie *Raji* mit 10000 genomischen Partikeln führte bei ssAAV-Verwendung zu  $1,9 \pm 0,1$  %, bei dsAAV zu  $3,1 \pm 0,2$  % und bei scAAV zu  $21,5 \pm 1,8$  % GFP-exprimierenden Zellen. Es ließ sich also bei dieser schwer zu transduzierenden Zelllinie eine Steigerung der GFP-Expression auf mehr als das 10-fache erreichen.

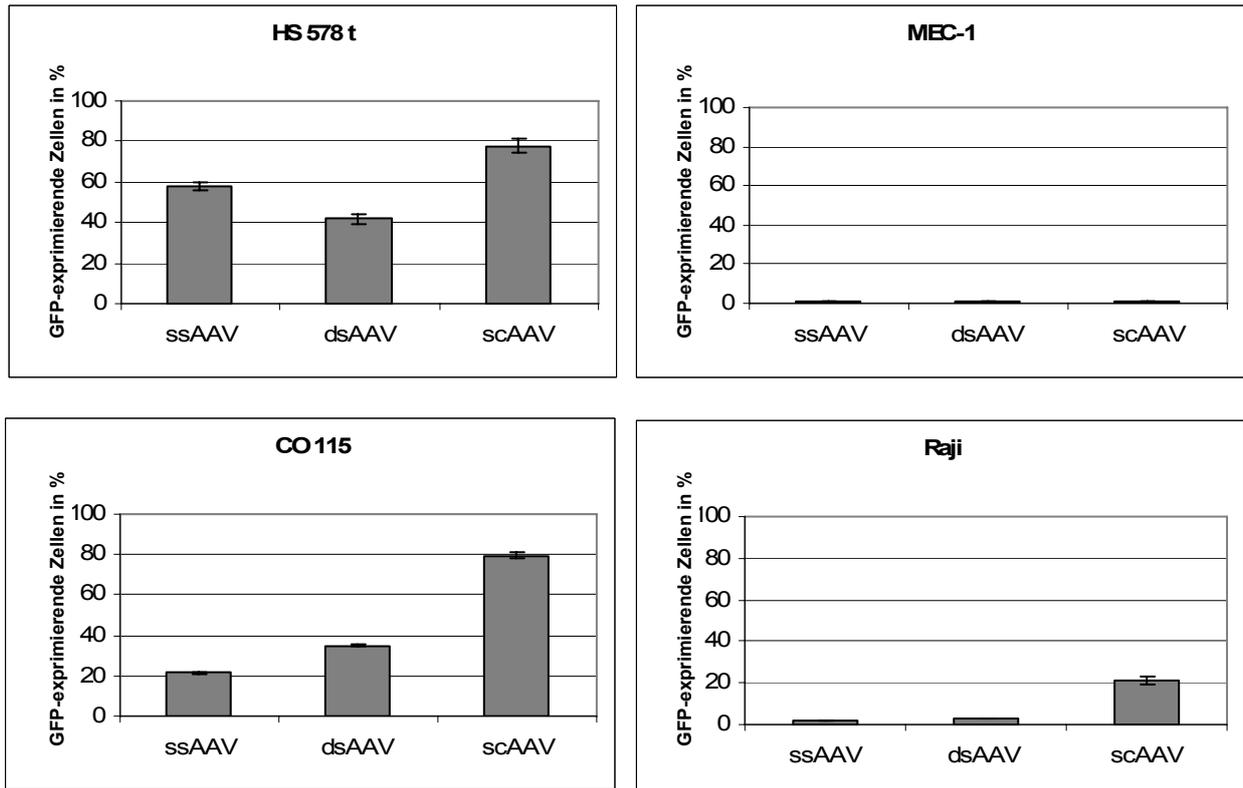


Abbildung 15: Anteil GFP-exprimierender Zellen [y-Achse] 2 Tage nach Infektion mit ssAAV, dsAAV oder scAAV [x-Achse]; Bei HS 578 t-, MEC-1- und Raji- Zellen wurden jeweils  $10^4$  genomische Partikel eingesetzt, bei CO115 wurden  $5 \times 10^3$  verwendet.

Die Zellen der Zervixkarzinom-Zelllinie *HeLa* exprimierten nach Infektion mit 500 genomischen Partikeln pro Zelle unter Verwendung von ssAAV zu  $20,8 \pm 0,9$  %, von dsAAV zu  $13,9 \pm 0,5$  % und von scAAV zu  $51,5 \pm 0,5$  % GFP. Durch Verwendung von scAAV ließ sich hier die Transduktionsrate um den Faktor 2,5 steigern (siehe Abbildung 16).

Nach Infektion der Mammakarzinom-Zelllinie *HBL 100* mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle konnten folgende Werte für den Anteil GFP-exprimierender Zellen erzielt werden: ssAAV  $21,1 \pm 2,1$  %, dsAAV  $17,0 \pm 1,5$  % und scAAV  $51,2 \pm 4,0$  %. Der Anteil GFP-exprimierender Zellen erhöhte sich hier durch die Verwendung von scAAV um das 2,4-fache (vgl. Abbildung 17).

Nach Infektion der Mammakarzinom-Zelllinie *MCF-7* mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle ohne MG132 zeigte sich in  $2,8 \pm 0,2$  % für ssAAV, in  $3,6 \pm 0,4$  % für dsAAV und in  $11,3 \pm 1,1$  % für scAAV der Zellen GFP-Expression. Durch scAAV ließ sich folglich die Anzahl GFP-positiver Zellen auf das 4-fache steigern (vgl. Abbildung 18).

Die Infektion der Melanom-Zelllinie *MV3* mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle führte zur GFP-Expression in  $26,9 \pm 0,4$  % der Zellen durch ssAAV, in  $33,8 \pm 0,2$  % durch dsAAV und in  $78,3 \pm 2,4$  % durch scAAV. Die Infektion mit scAAV steigerte also die Transduktionsrate gegenüber ssAAV um das 2,9-fache (vgl. Abbildung 19).

Die Kolonkarzinom-Zelllinie *HT29* wurde mit 10000 genomischen Partikeln pro Zelle infiziert. Es konnten durch ssAAV  $2,8 \pm 0,2$  %, durch dsAAV  $3,6 \pm 0,2$  % und durch scAAV  $23,0 \pm 0,2$  % Zellen zur GFP-Expression veranlasst werden. Die Verwendung von scAAV erhöhte hier die Transduktionsrate auf das 8- fache (vgl. Abbildung 20).

Nach Infektion der Kolonkarzinom-Zelllinie *LOVO* mit 5000 genomischen Partikeln pro Zelle konnte eine GFP-Expression von  $7,6 \pm 0,4$  % der Zellen durch ssAAV, von  $6,8 \pm 0,1$  % durch dsAAV und von  $40,5 \pm 0,7$  % durch scAAV erzielt werden. Der Anteil GFP-exprimierender Zellen stieg hier also durch die Verwendung von scAAV auf das 5,3-fache (vgl. Abbildung 21).

Die Infektion der Neuroblastom-Zelllinie *SK-N-MC* mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle resultierte in einer GFP-Expression in  $17,7 \pm 1,0$  % der Zellen durch ssAAV, in  $24,7 \pm 0,6$  % durch dsAAV und in  $77,7$  % durch scAAV. Der Anteil GFP positiver Zellen ließ sich also durch Verwendung von scAAV vervierfachen (vgl. Abbildung 22).

Durch Infektion der Osteosarkom-Zelllinie *Saos-2* mit 10000 genomischen Partikeln pro Zelle ließ sich in  $4,1 \pm 0,8$  % der Zellen durch ssAAV, in  $7,9 \pm 1,0$  % durch dsAAV und in  $69,7 \pm 1,4$  % durch scAAV GFP-Expression nachweisen. Durch Verwendung von scAAV steigerte sich also die Anzahl GFP-positiver Zellen auf das 17- fache (vgl. Abbildung 23).

Die Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie *MM 436* exprimierten nach Infektion mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle mit ssAAV als Vektor zu  $43,7 \pm 0,9$  %, mit dsAAV zu  $20,1 \pm 0,3$  % und mit scAAV zu  $78,6 \pm 0,3$  % GFP. Der Anteil der GFP-positiven Zellen stieg unter Verwendung von scAAV also fast auf das Doppelte an (vgl. Abbildung 24).

In den Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie *T47d* konnte nach Infektion mit 10000 genomischen Partikeln pro Zelle ohne MG132 ein Anteil GFP-exprimierender Zellen von  $5,6 \pm 0,5$  % durch ssAAV,  $7,8 \pm 0,2$  % durch dsAAV und  $49,2 \pm 0,9$  % durch scAAV nachgewiesen werden. Die Verwendung von scAAV erbrachte somit eine Vergrößerung des Anteils GFP-exprimierender Zellen auf das 9- fache (vgl. Abbildung 25)

#### **4.4.2. Erhöhung der Effizienz des AAV-vermittelten Gentransfers durch Zugabe von MG132**

Durch Zugabe des Proteasomen-Inhibitors MG132 versuchten wir darüber hinaus eine weitere Steigerung der Transduktionsrate zu erreichen. Dabei sollte der Proteasomen-Inhibitor den Abbau der Viren auf dem Weg durch die Zelle verhindern.

Der Proteasomen-Inhibitor MG 132 konnte in einigen Zelllinien die Effizienz der AAV-vermittelten Transgen-Expression steigern, führte jedoch auch bei einigen Versuchen zu einem beträchtlichen Absinken der Zellzahl, so dass nicht mehr ausreichend viele Zellen für eine aussagekräftige FACS-Analyse der Transgen-Expression vorhanden waren. Im

Folgendes wird detailliert auf die Auswirkungen auf die einzelnen Tumorzelllinien eingegangen.

In den Zelllinien CO115, MEC-1, HS 578 t und Raji konnten nur Werte für die Infektion mit den verschiedenen AAV-Typen ohne Zugabe des Proteasomen-Inhibitors MG132 erhoben werden, da bei dessen Zugabe, die Zellzahl so stark sank, dass eine aussagekräftige FACS-Analyse der Transgen-Expression nicht mehr möglich war.

#### 4.4.2.1. Zelllinien, bei denen auch unter Verwendung von scAAV durch MG132 eine Erhöhung des Anteils Transgen exprimierender Zellen erfolgt.

Nach Zugabe von MG132 bei der Infektion von *HeLa*-Zellen exprimierten  $23,4 \pm 1,3$  % der Zellen GFP bei Verwendung von ssAAV,  $16,6 \pm 0,7$  % bei dsAAV und  $57,1 \pm 0,6$  % bei scAAV. Bei zusätzlicher Zugabe von MG132 steigerte sich die Transduktionsrate um weitere 11 % gegenüber der alleinigen Verwendung von scAAV.

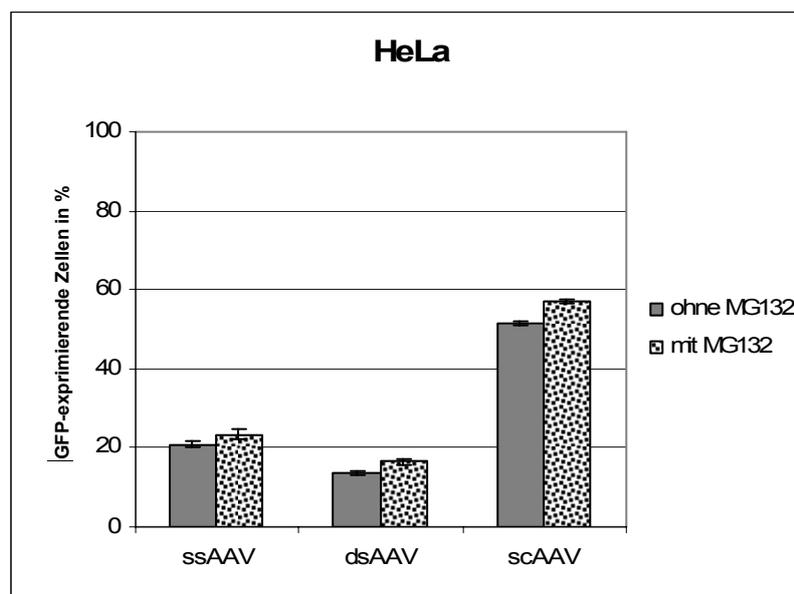


Abbildung 16: Anteil GFP-exprimierender *HeLa*-Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 500 genomischen AAV Partikeln im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne (grauer Balken) Zugabe des Proteasomen-Inhibitors MG132.

Nach Infektion der Mammakarzinom-Zelllinie *HBL 100* mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle in Anwesenheit von MG132 konnten folgende Werte für den Anteil GFP-exprimierender Zellen erzielt werden:  $45,8 \pm 3,6$  % für ssAAV,  $31,4 \pm 1,2$  % für dsAAV und  $63,5 \pm 5,2$  % für scAAV. MG132 bewirkte bei Anwendung von scAAV eine Erhöhung der GFP-Expression um 24 % im Vergleich zu scAAV alleine.

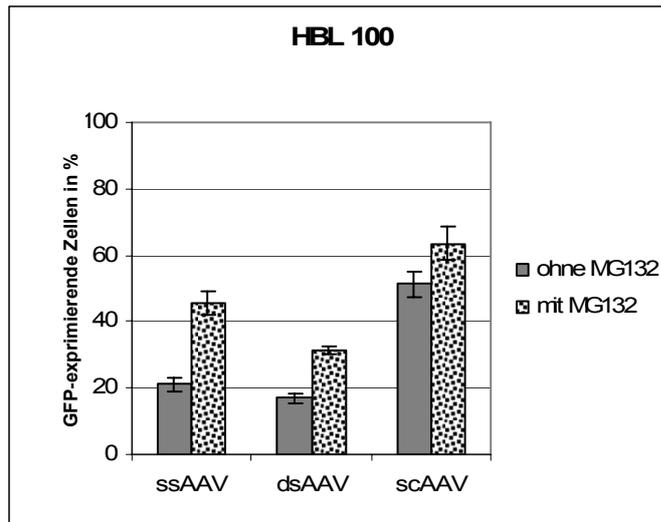


Abbildung 17: Anteil GFP-exprimierender HBL 100 Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 1000 genomischen Partikeln AAV im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne (grauer Balken) Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132.

Nach Infektion der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle unter Zugabe von MG132 war in  $11,8 \pm 0,9$  % für ssAAV, in  $6,2 \pm 0,5$  % für dsAAV und in  $16,4 \pm 1,1$  % der Zellen für scAAV GFP-Expression nachweisbar. Durch die zusätzliche Zugabe von MG132 bei dem Gentransfer durch scAAV erfolgte eine weitere Steigerung um 45 %.

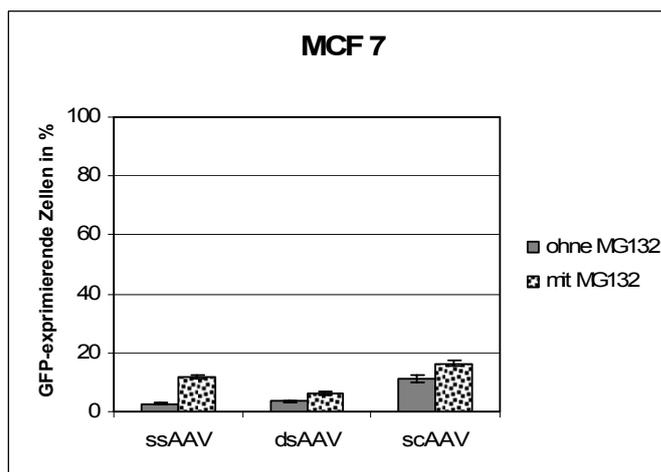


Abbildung 18: Anteil GFP-exprimierender MCF7-Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 1000 genomischen Partikeln AAV, im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne (grauer Balken) Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132.

Die Infektion der Melanom-Zelllinie *MV3* mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle in Anwesenheit von MG132 führte zur GFP-Expression in  $55,6 \pm 1,1$  % der Zellen durch ssAAV, in  $38,3 \pm 2,0$  % durch dsAAV und in  $88,9 \pm 0,3$  % durch scAAV. Unter Zugabe von MG132 steigerte sich somit die Transduktionsrate gegenüber des Einsatzes von scAAV ohne MG132 um 14 %.

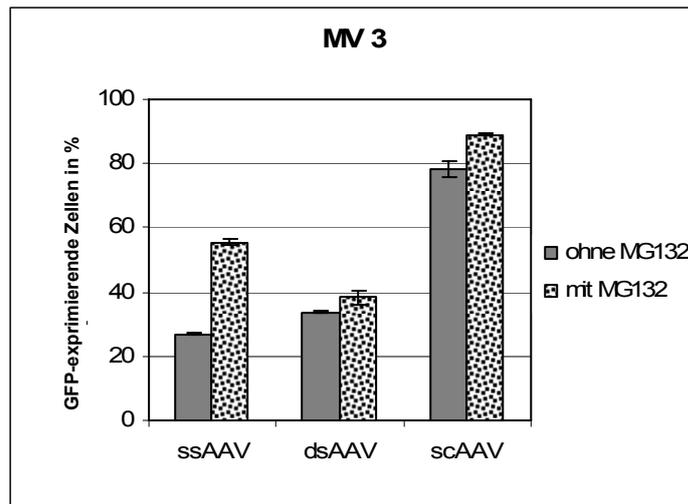


Abbildung 19: Anteil GFP-exprimierender *MV3*-Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 1000 genomischen Partikeln AAV, im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne Zugabe (grauer Balken) des Proteasomeninhibitors MG132.

Die Kolonkarzinom-Zelllinie *HT29* wurde mit 10000 genomischen Partikeln pro Zelle infiziert. Dabei konnte unter Zugabe von MG132 der Anteil GFP-exprimierender Zellen auf  $22,4 \pm 0,8$  % für ssAAV,  $26,4 \pm 0,3$  % für dsAAV und  $57,4 \pm 1,9$  % für scAAV gesteigert werden. Die Zugabe von MG132 zu scAAV steigerte die Transgen-Expression auf das 20-fache gegenüber der Verwendung von ssAAV und zumindest auf mehr als das Doppelte gegenüber der Verwendung von scAAV.

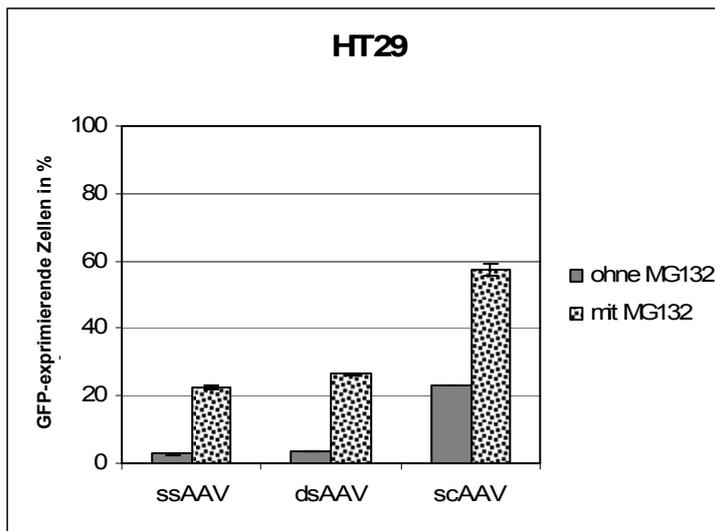


Abbildung 20: Anteil GFP-exprimierender HT29-Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 10000 genomischen Partikeln AAV, im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne (grauer Balken) Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132.

Durch Zugabe von MG132 bei Infektion der Kolonkarzinom-Zelllinie LOVO mit 5000 genomischen Partikeln pro Zelle ließen sich die Werte auf  $35,1 \pm 0,9$  % durch ssAAV,  $33,1 \pm 1,6$  % durch dsAAV und  $73,3 \pm 0,9$  % durch scAAV steigern. Es wurde durch die Zugabe von MG132 bei Verwendung von scAAV eine Steigerung der Transduktionsrate auf das 9,6-fache gegenüber der Infektion mit ssAAV erreicht, damit brachte die Anwesenheit von MG132 bei Verwendung von scAAV fast eine Verdopplung der Transduktionsrate.

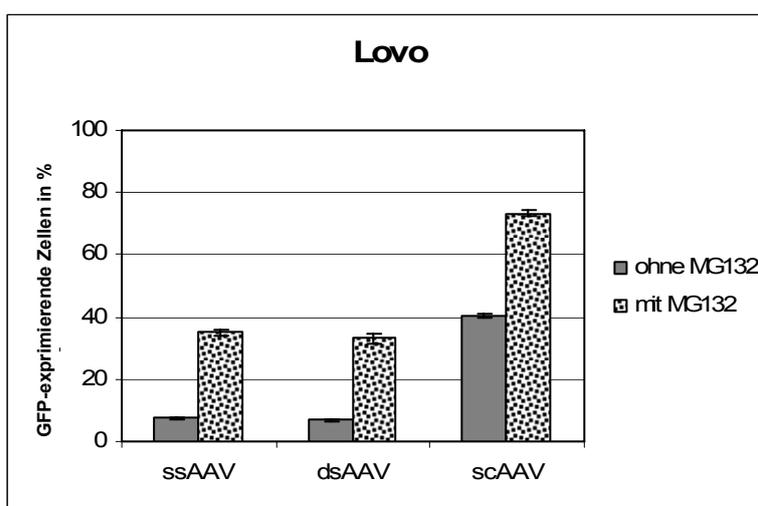


Abbildung 21: Anteil GFP-exprimierender LOVO-Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 5000 genomischen Partikeln AAV, im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne Zugabe (grauer Balken) des Proteasomeninhibitors MG132.

#### 4.4.2.2. Zellen, bei denen durch Verwendung von scAAV und dsAAV eine Steigerung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen erreicht werden kann, während MG132 keinen Effekt zeigt

Die Infektion der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle unter Verwendung von MG132 führte zu Werten von  $11,2 \pm 0,4$  % GFP-exprimierender Zellen durch ssAAV,  $10,3 \pm 0,6$  % durch dsAAV und  $22,9 \pm 0,8$  % durch scAAV. Der Anteil GFP-positiver Zellen ließ sich also bei Verwendung von scAAV durch MG132 nicht steigern.

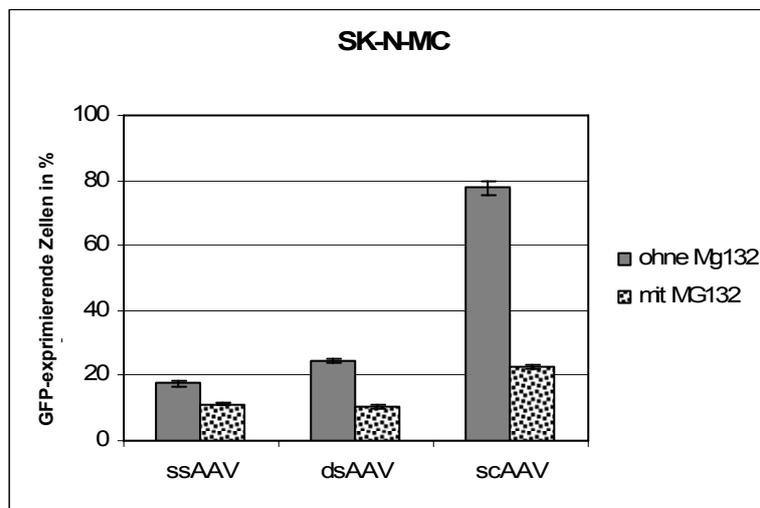


Abbildung 22: Anteil GFP-exprimierender SK-N-MC-Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 1000 genomischen Partikeln AAV, im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne Zugabe (grauer Balken) des Proteasomeninhibitors MG132

Durch Zugabe von MG132 bei der Infektion der Mammakarzinom-Zelllinie MM 436 mit 1000 genomischen Partikeln pro Zelle steigerten sich die Werte für die Vektoren ssAAV auf  $52,5 \pm 6,2$  % und dsAAV auf  $29,1 \pm 0,8$  %, der Wert für scAAV fiel dagegen auf  $50,3 \pm 4,9$  %.

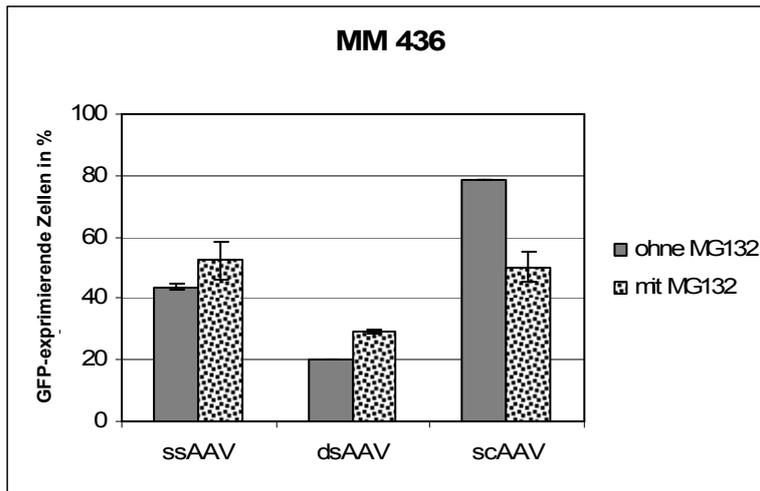


Abbildung 23:  
 Anteil GFP-exprimierender MM436-Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 1000 genomischen Partikeln AAV, im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne (grauer Balken) Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132.

Bei Infektion der Osteosarkom-Zelllinie Saos-2 mit 10000 genomischen Partikeln pro Zelle mit Zugabe von MG132 wurden zwar die Werte von ssAAV auf  $50,4 \pm 1,7$  % ca. um den Faktor 12 und von dsAAV auf  $41,0 \pm 0,4$  % ca. um den Faktor 5 gesteigert, die durch scAAV vermittelte Expression fiel hingegen auf 55,5 % ab. Durch Zugabe von MG132 konnte hier also keine weitere Steigerung bei Verwendung von scAAV erzielt werden.

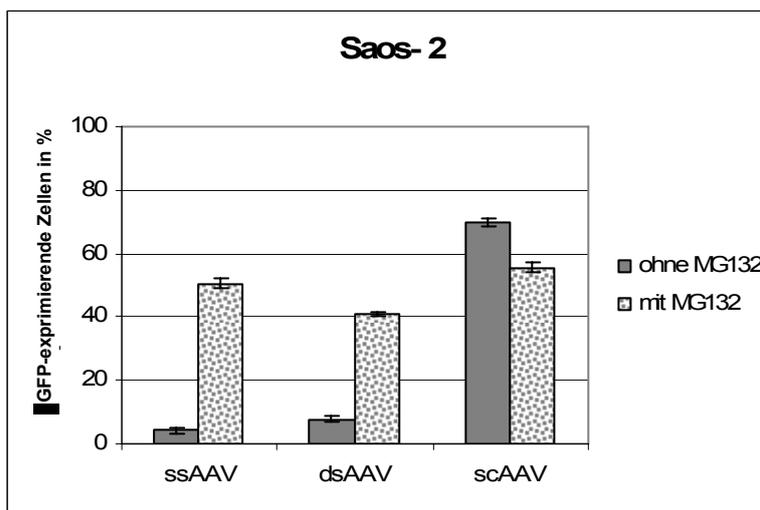


Abbildung 24:  
 Anteil GFP-exprimierender Saos-2-Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 10000 genomischen Partikeln AAV, im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne Zugabe (grauer Balken) des Proteasomeninhibitors MG132.

In den Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie *T47d* veränderten sich nach Infektion mit 10000 genomischen Partikeln pro Zelle unter Zugabe von MG132 die Werte von ssAAV mit  $5,8 \pm 1,2$  % und dsAAV mit  $7,5 \pm 0,8$  % kaum, es fiel aber der Wert von scAAV auf 28,7 %.

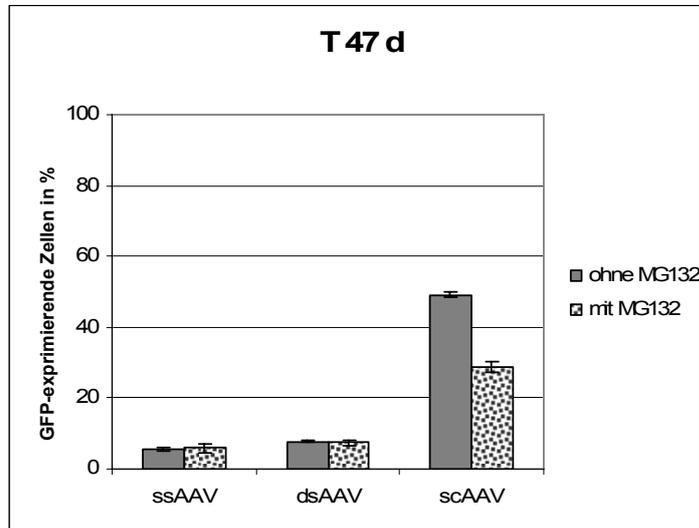


Abbildung 25:  
Anteil GFP-exprimierender *T47d*-Zellen [y-Achse], 2 Tage nach Infektion mit 10000 genomischen Partikeln AAV, im Vergleich ssAAV, dsAAV und scAAV [x-Achse] mit (gepunkteter Balken) und ohne Zugabe (grauer Balken) des Proteasomeninhibitors MG132.

#### 4.5. Quantitativer Vergleich der Transgen-Expression in HeLa-Tumoren nach Infektion mit einzelsträngigem rekombinantem Adeno-assoziierten Virus (ssAAV) und selbstkomplementärem rekombinantem Adeno-assoziierten Virus (scAAV) *in vivo*

##### 4.5.1. Charakterisierung der Tumorwachstumskinetik

Nachdem scAAV den ssAAV deutlich in der Transduktionsrate verschiedener Tumorzelllinien überlegen waren, testeten wir die Übertragbarkeit auf ein *in vivo* Modell.

Um weiter humane Zelllinien verwenden zu können, wählten wir ein severe-combined-immuno-deficient- (SCID-) Maus-Modell. Da die Mäuse kein effizientes Immunsystem besitzen, konnte das Risiko einer möglichen Immunreaktion gegen die Zellen minimiert werden. Als Zelllinie wählten wir HeLa, da diese humanen Cervixkarzinomzellen in den Zellkulturversuchen besonders effizient zu transduzieren waren. Nach Vorversuchen zur Bestimmung der optimalen Zellzahl, wurden den Mäusen beidseits in die Flanken je  $1 \times 10^6$  Zellen subcutan injiziert. Die Zellen wuchsen gut an, so dass nach einer Woche tastbare Tumore entstanden waren. In diese Tumoren wurde dann direkt 40  $\mu$ l Virussuspension

injiziert. Das Einspritzen eines größeren Volumens wäre technisch nicht möglich gewesen. Die MOI 10, die durch etwa  $8 \times 10^7$  infektiösen Partikel erzielt wurde, erschien uns auf Grund der *in vitro* Daten als ausreichend, um eine effiziente Transduktion zu erreichen.

Die Wachstumskurve ergab sich aus den Zellzahlen an Tag zwei, vier und sieben nach Injektion der Viren. Es zeigte sich, dass alle Tumoren exponentiell gewachsen sind. Dabei fiel auf, dass die Tumoren, denen scAAV injiziert wurde etwas langsamer wuchsen als die Tumoren der Kontrollgruppe.

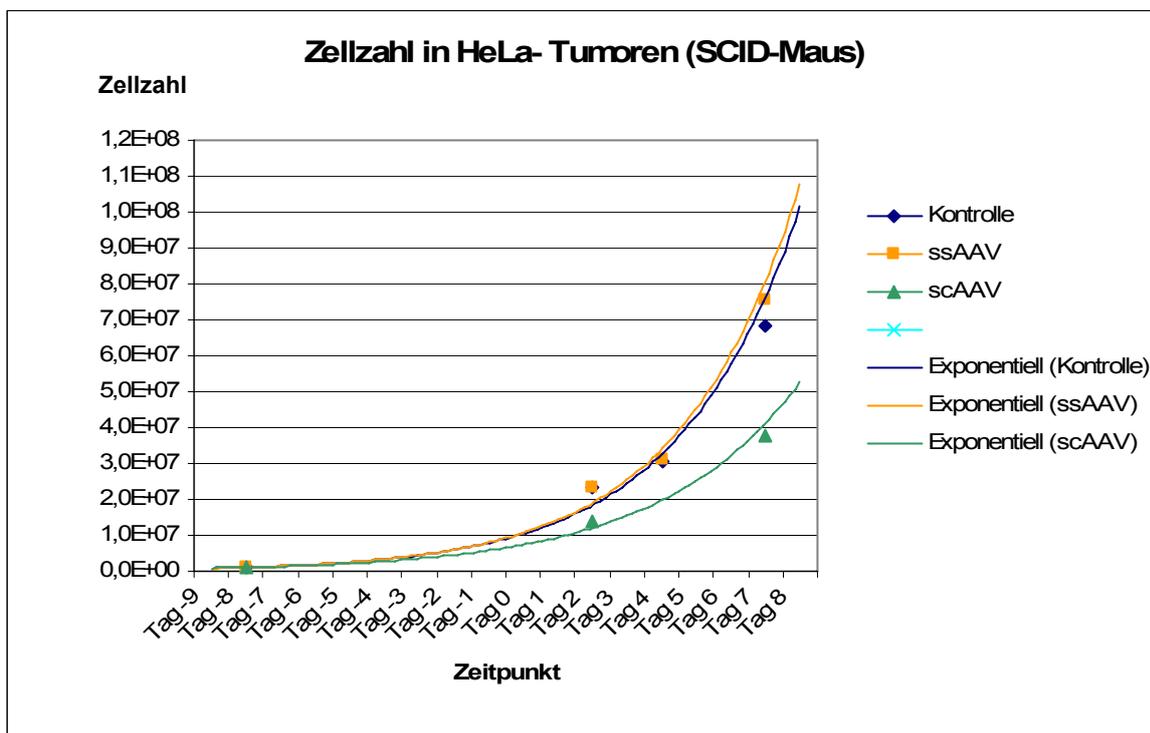


Abbildung 26:  
Wachstumskurve der subkutanen Tumoren; Die Zellzahl [y-Achse] wurde erhoben bei Injektion der Hela Zellen an Tag -8 und nach Entfernung der Tumoren an Tag 2, 4 und 7 nach AAV Injektion [x-Achse].

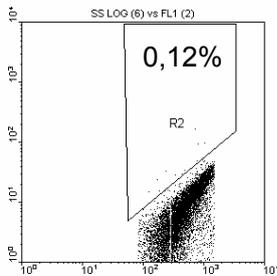
#### 4.5.2. Nachweis der GFP-Expression in den Tumoren

Um die Anzahl fluoreszierender Zellen zu objektivieren, wurden die Tumorzellen vereinzelt und durchflusszytometrisch der Anteil GFP-exprimierender Zellen bestimmt.

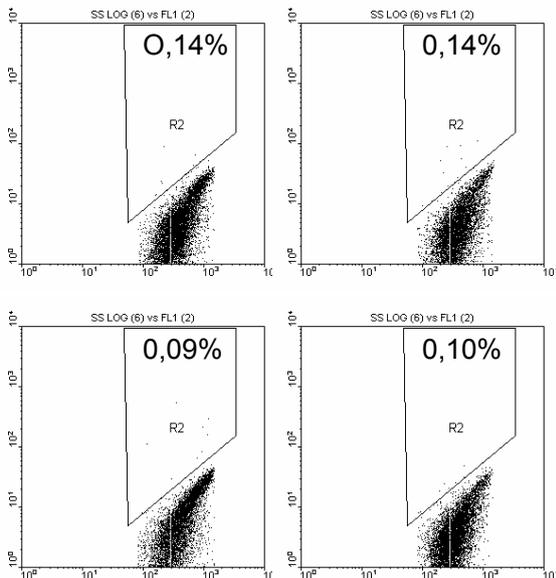
Sowohl in den unterschiedlichen Teilen eines Tumors als auch in den verschiedenen Tumoren einer Gruppe gab es große Unterschiede in der Anzahl GFP-exprimierender Zellen, woraus sich eine hohe Standardabweichung ergibt. Der Mittelwert der mit ssAAV infizierten Tumore lag an Tag 2 nach Infektion bei  $0,11 \pm 0,03$  %, an Tag 4 bei  $0,21 \pm 0,05$  % und an

Tag7 bei  $0,09 \pm 0,04$  %. Die Mittelwerte der mit scAAV infizierten Tumore lagen etwas höher bei  $0,16 \pm 0,09$  % an Tag 2, bei  $0,49 \pm 0,42$  % an Tag 4 und bei  $0,12 \pm 0,06$  % an Tag 7 (vgl. Abbildung 27, 28, 29).

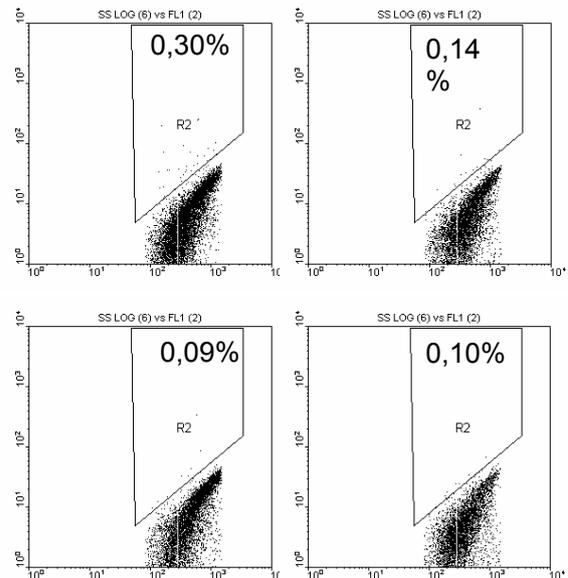
### Negativkontrolle



### ssAAV



### scAAV

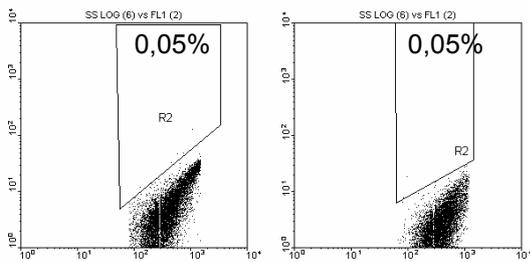


**Abbildung 27:** GFP-exprimierende Tumorzellen gemessen mittels Durchflusszytometrie am Tag 2 nach Injektion von  $8 \times 10^7$  infektiösen AAV Partikeln in HeLa- Tumore. Die Größe der Zellen [x-Achse] ist gegenüber der Stärke der Fluoreszenz im FITC- Kanal [y-Achse] zur Quantifizierung der GFP Expression aufgetragen.

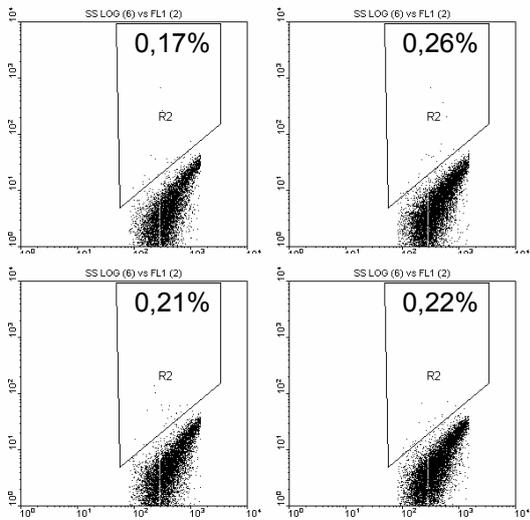
Links: 4 Proben aus zwei Tumoren, in die ssAAV injiziert wurde; Proben aus dem selben Tumor sind jeweils untereinander dargestellt

Rechts: 4 Proben aus zwei Tumoren, in die scAAV injiziert wurde; Proben aus dem selben Tumor sind jeweils untereinander dargestellt.

## Negativkontrollen



## ssAAV



## scAAV

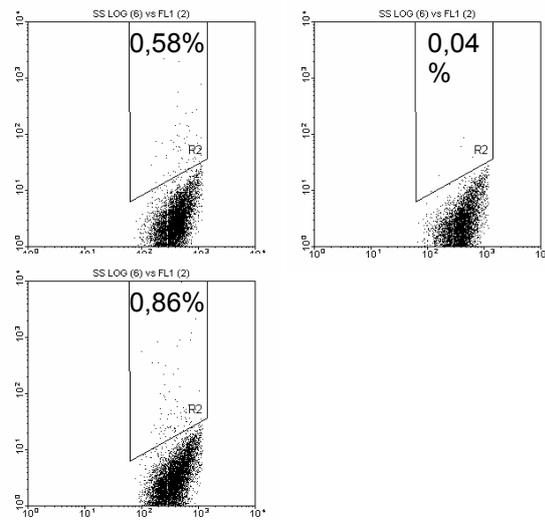
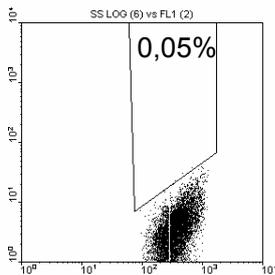


Abbildung 28: GFP-exprimierende Tumorzellen gemessen mittels Durchflusszytometrie am Tag 4 nach Injektion von  $8 \times 10^7$  infektiösen AAV Partikeln in HeLa- Tumore. Die Größe der Zellen [x-Achse] ist gegenüber der Stärke der Fluoreszenz im FITC- Kanal [y-Achse] zur Quantifizierung der GFP-Expression aufgetragen.

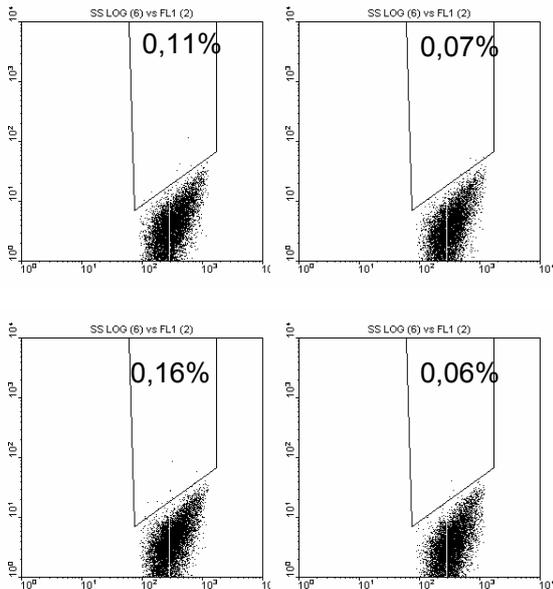
Links: 4 Proben aus zwei Tumoren, in die ssAAV injiziert wurde; Proben aus dem selben Tumor sind jeweils untereinander dargestellt

Rechts: 3 Proben aus einem Tumoren, in den scAAV injiziert wurde.

## Negativkontrolle



## ssAAV



## sCAAV

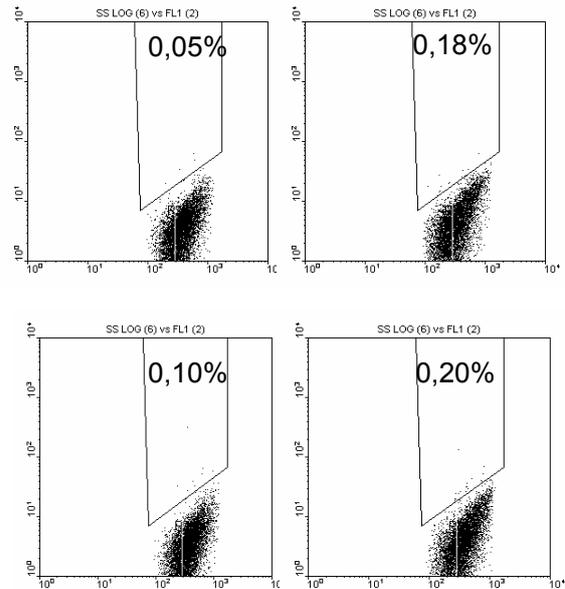


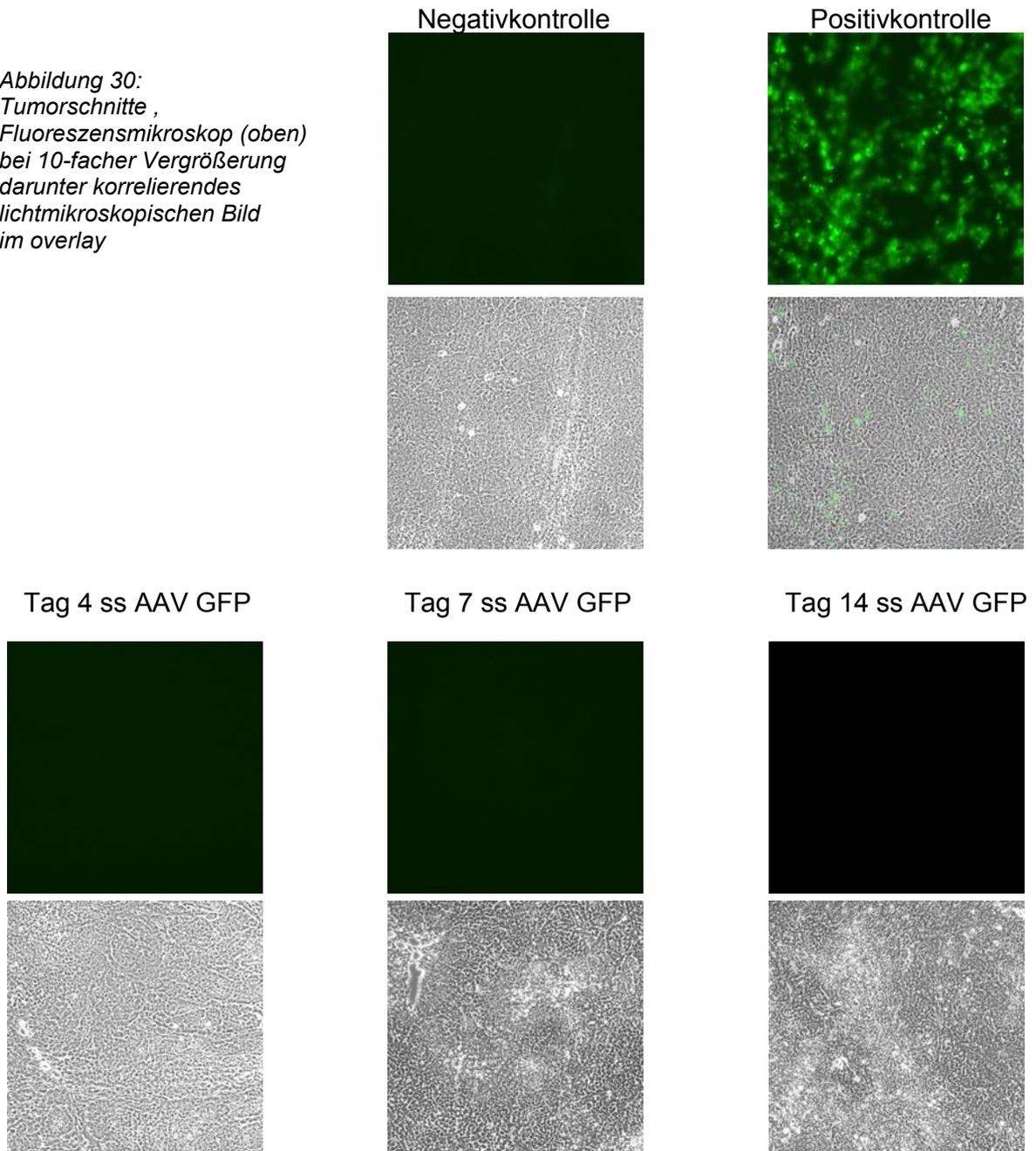
Abbildung 29: GFP-exprimierende Tumorzellen gemessen mittels Durchflusszytometrie am Tag 7 nach Injektion von  $8 \times 10^7$  infektiösen AAV Partikeln in HeLa- Tumore. Die Größe der Zellen [x-Achse] ist gegenüber der Stärke der Fluoreszenz im FITC- Kanal [y-Achse] zur Quantifizierung der GFP-Expression aufgetragen.

Links: 4 Proben aus zwei Tumoren, in die ssAAV injiziert wurde; Proben aus dem selben Tumor sind jeweils untereinander dargestellt

Rechts: 4 Proben aus zwei Tumoren, in die sCAAV injiziert wurde; Proben aus dem selben Tumor sind jeweils untereinander dargestellt.

Um das Verteilungsmuster der transduzierten Zellen im Tumor erkennen zu können, wurden Gefrierschnitte der mit AAV infizierten Tumore im Vergleich zu einer Negativkontrolle und einer Positivkontrolle mikroskopiert. In der Positivkontrolle, die durch subkutane Injektion eines Gemisches aus HeLa-Zellen und stabil mit GFP transfizierten HeLa-Zellen im Mausmodell generiert wurden, zeigten sich in vielen Zellen deutliche Fluoreszenzsignale. In den infizierten Tumoren konnten im Vergleich zur nicht infizierten Negativkontrolle keine klaren Fluoreszenzsignale detektiert werden, da man mit dieser Methode nicht so sensitiv einzelne Zellen erkennen kann wie mit der Durchflusszytometrie. Somit konnte nicht festgestellt werden, ob sich die wenigen transduzierten Zellen entlang des Stichkanals befanden oder ob sich die Viren über den gesamten Tumor verteilt hatten.

Abbildung 30:  
 Tumorschnitte ,  
 Fluoreszenzmikroskop (oben)  
 bei 10-facher Vergrößerung  
 darunter korrelierendes  
 lichtmikroskopischen Bild  
 im overlay



Nachdem nur ein sehr geringes Signal in der Durchflusszytometrie kam und visuell im Fluoreszenzmikroskop keine GFP-Expression erkannt werden konnte, wurde mittels quantitativer PCR überprüft, ob DNS, die für GFP codiert, im Tumorgewebe nachweisbar war. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob das Problem auf der Ebene der Transgen-Expression liegt oder ob die Vektor-DNS gar nicht in die Tumoren eindringen konnte beziehungsweise wieder abgebaut wurde.

Es konnten nach Hochrechnung auf den Gesamtumor noch  $7,78 \times 10^5$  GFP-codierende Sequenzen nachgewiesen werden, also etwa 0,0097 % der ursprünglich eingesetzten  $8 \times 10^9$  genomischen beziehungsweise 0,97 % der eingesetzten  $8,0 \times 10^7$  infektiösen Partikel.

Zum Vergleich wurden HeLa-Zellen *in vitro* mit  $2,8 \times 10^{10}$  genomischen Partikeln bzw.  $2,4 \times 10^8$  (MOI entsprechend der geschätzten MOI im Tumor) infiziert. Es konnten in der quantitativen PCR  $2,0 \times 10^{10}$  GFP-codierende Sequenzen nachgewiesen werden, also 0,71 % der eingesetzten genomischen beziehungsweise 83,3 % der infektiösen Partikel. Der Anteil der Vektor-DNS, die tatsächlich in den Zellkern der Zielzellen gelangt, ist also *in vivo* um den Faktor 86 geringer als *in vitro*. In diesem Fall ist somit nicht nur die Doppelstrangsynthese ein limitierender Faktor, sondern auch der Transport der Vektoren aus der Tumor-Peripherie in den Zellkern.

### 4.5.3 Tumorstruktur

Da sich die HeLa-Zellen *in vivo* deutlich schlechter transduzieren ließen als *in vitro*, untersuchten wir die Tumorstruktur, um so eine mögliche Ursache für den oben genannten Befund zu finden. Um die Histologie der Tumoren beurteilen zu können, wurde von einem HeLa-Tumor, in den keine AAV injiziert wurden, im Pathologischen Institut der LMU ein Gefrierschnitt angefertigt und HE gefärbt.

Die Tumorstruktur entsprach einem hochmalignen, stark entdifferenzierten, invasiven Karzinom, das durchaus mit einem natürlich gewachsenen vergleichbar war. Die Zellen bildeten Nester zwischen Bindegewebsfasern.

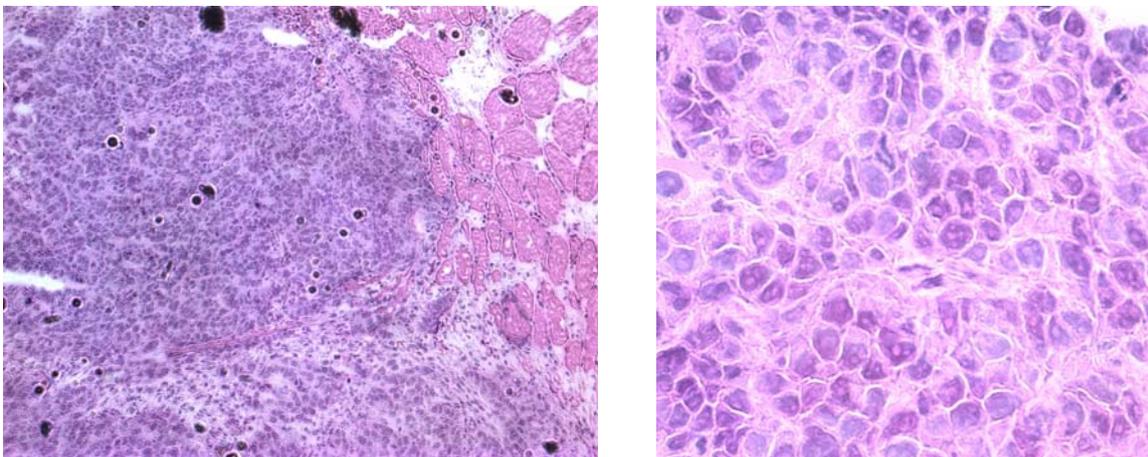


Abbildung 31: Histologie eines HE- gefärbten HeLa- Tumors

Links: Übersichtsaufnahme (10-fache Vergrößerung im Lichtmikroskop) eines subkutan invasiv wachsenden, entdifferenzierten HeLa- Tumors.

Rechts: Bei stärkerer Vergrößerung (40-fach im Lichtmikroskop) zeigen sich Bindegewebsstränge, die Zellnester umgeben

## 4.6. Transgen-Expression in Spheroiden nach Infektion mit AAV

### 4.6.1. Generierung eines Spheroidmodells

Nachdem sich die oben beschriebenen gravierenden Unterschiede in Bezug auf die Gentransfer-Effizienz zwischen *in vivo* und *in vitro* Versuchen gezeigt hatten, etablierten wir nach dem Vorbild einer australischen Arbeitsgruppe (Kelm, 2003) ein Spheroidmodell, um einen dreidimensionalen Zellverband außerhalb eines Tiermodells untersuchen zu können. In hängenden Tropfen bildeten sich kugelförmige Zellklümpchen von etwa 1mm Größe. Die Zellen hingen bei dieser Größe noch fest zusammen, während größere Spheroide leicht zerfielen.

### 4.6.2. Lokalisierung der Transgen-Expression in HeLa-Spheroiden

Die Spheroide wurden durch Zugabe von 1  $\mu$ l AAV zum Medium infiziert.

Am Tag 5 nach Infektion zeigten sich über das Spheroid verteilte, oft weit im Inneren liegende GFP-exprimierende Zellen. (vgl. Abbildung 32)

In der konfokalen Mikroskopie zeigten sich in verschiedenen Ebenen des Spheroid liegende fluoreszierende Zellen. (vgl. Abbildung 33)

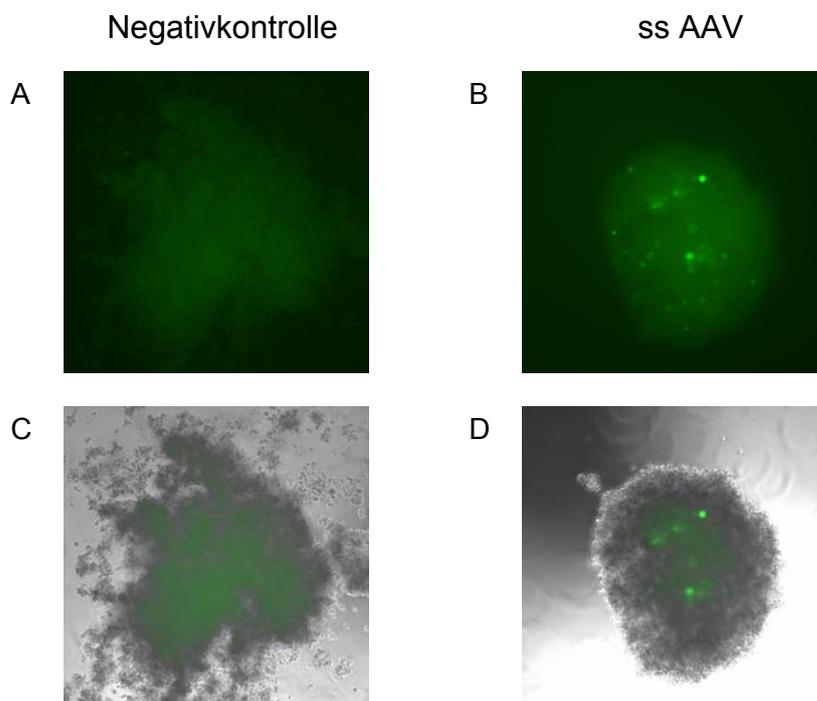


Abbildung 32: HeLa- Spheroide Tag 5

B und D zeigen ein Spheroid nach Infektion mit etwa 10000 genomischen Partikeln ssAAV/Zelle. (B) Fluoreszenzmikroskopie bei 10-facher Vergrößerung, darunter (D) overlay mit dem korrespondierenden lichtmikroskopischen Bild.

A und C zeigen ein nicht infiziertes Spheroid unter dem Fluoreszenzmikroskop (A) bei 10-facher Vergrößerung, darunter (C) overlay mit dem korrespondierenden lichtmikroskopischen Bild.

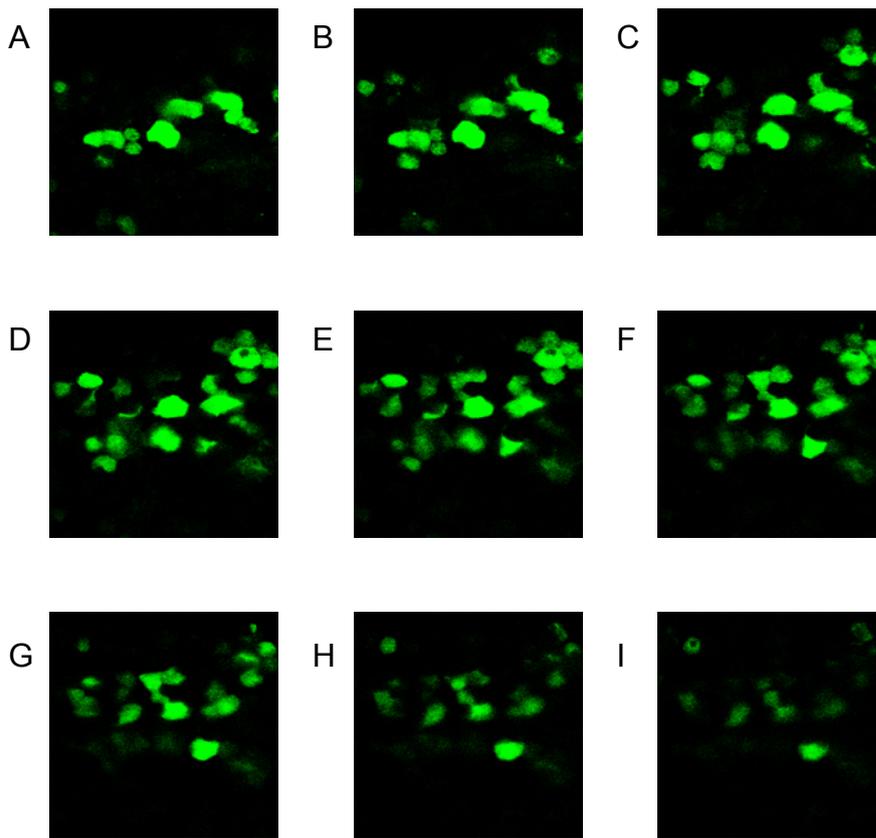


Abbildung 33: HeLa Spheroid Tag 2 nach Infektion mit etwa 10000 genomischen ssAAV Partikeln pro Zelle in der konfokalen Laser-Mikroskopie; zur genaueren Lokalisation der infizierten Zellen *in vitro* sind serielle Schnittbilder durch das Innere des gesamten Spheroides dargestellt (A-I).

#### 4.6.3. Vergleich der Transgen-Expression in HeLa- und SK-N-MC-Spheroiden

Da in der Literatur eine gute Durchdringung von neuronalen Tumoren *in vivo* und bei Verwendung eines Spheroidmodells durch AAV gezeigt werden konnte (Enger, 2002), verglichen wir die Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC mit den HeLa-Zellen in einem Spheroidmodell.

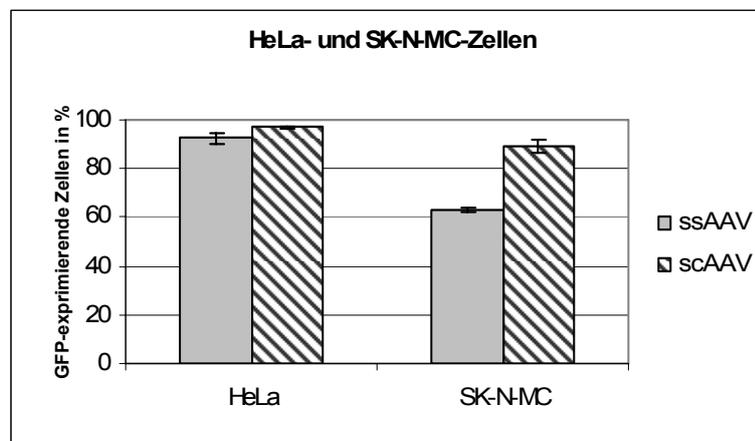
Vor dem Hintergrund, dass sich HeLa-Zellen *in vitro* etwas besser infizieren lassen als SK-N-MC-Zellen, wurde der Anteil GFP-exprimierender Zellen der beiden Zelllinien sowohl nach Infektion der konventionellen Zellrasen als auch der Spheroide durchflusszytometrisch bestimmt und direkt verglichen. Es wurden 500 genomische Partikel pro Zelle verwendet. Die Messung erfolgte am 2. Tag nach Infektion.

Der Anteil GFP-exprimierender Zellen betrug nach Infektion des Zellrasens unter Verwendung von ssAAV  $92,43 \pm 2,50$  % bei HeLa-Zellen und  $62,77 \pm 0,95$  % bei SK-N-MC-

Zellen, unter Verwendung von scAAV  $97,13 \pm 0,47$  % bei HeLa-Zellen und  $89,43 \pm 2,53$  % bei SK-N-MC-Zellen

In HeLa-Spheroide konnte durch ssAAV eine GFP-Expression in  $1,68 \pm 0,17$  % der Zellen erreicht werden, durch scAAV in  $2,92 \pm 0,56$  % der Zellen. In SK-N-MC-Spheroide wurde von  $3,63 \pm 0,22$  der Zellen nach ssAAV Applikation GFP exprimiert, unter Verwendung von scAAV in  $7,73 \pm 0,41$  % der Zellen. Es konnte also gezeigt werden, dass SK-N-MC-Spheroide effizienter durch AAV transduziert werden konnten als HeLa-Spheroide, obwohl in der Zellkultur HeLa-Zellen zu einem höheren Anteil transduziert werden konnten als SK-N-MC-Zellen.

34A



34B

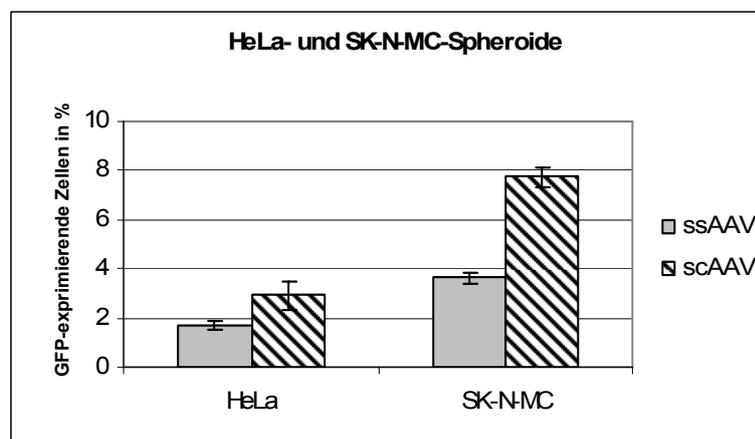
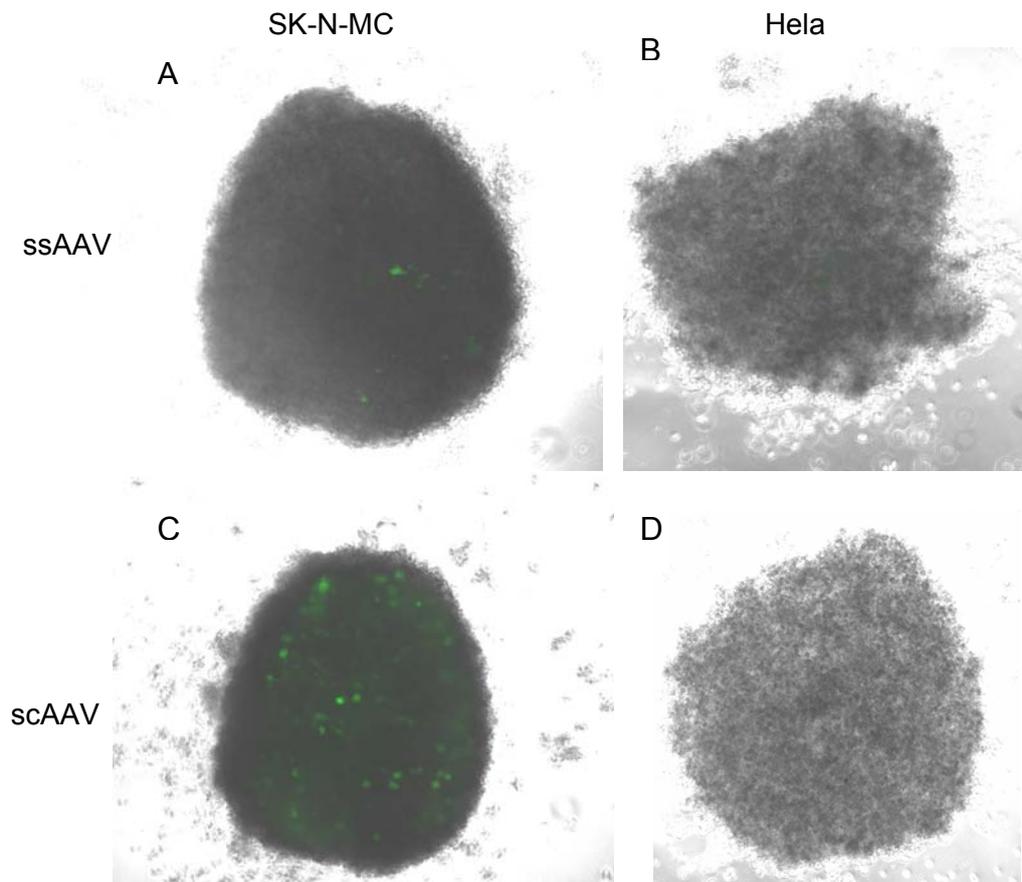


Abbildung 34:  
Vergleich HeLa und SK-N-MC Zellen [x-Achse] 2 Tage nach Infektion mit 500 genomischen Partikeln AAV in Bezug auf die Anzahl GFP-exprimierender Zellen [in %] [y-Achse], graue Balken: Infektion mit ssAAV, schattierter Balken: Infektion mit scAAV

Obere Abbildung 34A: Ergebnisse aus Zellkulturexperiment

Untere Abbildung 34B: Ergebnisse aus dem Spheroidmodell



*Abbildung 35: Vergleich von SK-N-MC- Spheroide und HeLa Spheroide bezüglich der GFP-Expression nach Infektion mit ssAAV oder scAAV (500 genomische Partikel pro Zelle) Links: SK-N-MC Spheroide (A, C ), rechts: HeLa Spheroide (B, D), die beiden oberen (A, B) wurden mit ssAAV transduziert, die beiden unteren(C, D) mit scAAV. Es wurden Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt (300 ms Belichtungszeit, 10-fache Vergrößerung) und mit Durchlichtbildern der Spheroide unterlagert.*

## 5. Diskussion

### 5.1. Virale Vektoren für die Gentherapie

Viele Erkrankungen basieren auf der genetisch bedingten Fehlfunktion von Proteinen. Um diese Fehlfunktion auszugleichen, versucht man in der Gentherapie, die fehlenden DNS-Sequenzen zu ersetzen oder die Fehlfunktion durch das Einbringen oder Modifizieren von Genen zu korrigieren. Für den Gentransfer stehen virale und nicht-virale Vektorsysteme zur Verfügung.

Bei nicht-viralen Vektorsystemen handelt es sich meist um DNS-Plasmide, die die erhöhte Expression eines Proteins in der Zielzelle vermitteln oder aber auch um RNS (siRNS) beziehungsweise Oligonukleotide, die die Proteinexpression gezielt inhibieren. Beim Vektordesign werden die Nukleinsäuren durch Komplexbildung an kationische Polymere oder Lipide gebunden, die funktionelle Gruppen besitzen, um Interaktionen mit dem extrazellulären Milieu und intrazelluläres Trafficking zu vermitteln (De Laporte, 2005). Nicht-virale Methoden besitzen im Vergleich zu viralen Vektoren oft eine höhere Sicherheit, eine höhere Kapazität große Gene zu transportieren, eine Ortsspezifität und geringere toxische oder inflammatorische Effekte. Durch die geringe Transfektionseffizienz und Transgen-Expression sind sie jedoch in ihrer klinischen Anwendung stark eingeschränkt (Boulaiz, 2005).

Virale Vektorsysteme ermöglichen im Allgemeinen eine höhere Transduktionseffizienz und eine Langzeitexpression, können aber mit Toxizitäten, einer höheren Immunogenität, einer geringeren Spezifität für die Zielzelle und hohen Kosten verbunden sein (Boulaiz, 2005).

Die gängigsten viralen Vektorsysteme basieren auf Adenoviren, Herpes simplex Viren (HSV), Lentiviren, Retroviren und Adeno-assoziierten-Viren (AAV). Die einzelnen Vektoren bieten dabei verschiedene Vor- und Nachteile, die gegeneinander für die verschiedenen Anwendungen abgewogen werden müssen (Lundstrom, 2003).

AAV-Vektoren bieten viele Vorteile viraler Vektoren bei nur gering ausgeprägtem Sicherheitsrisiko im Vergleich zu anderen viralen Vektoren.

AAV-basierte Vektoren sind nicht pathogen (Goncalves, 2005). Im Gegensatz zu den meisten anderen viralen Vektoren wirkt rAAV nicht zytotoxisch und nur geringfügig immunogen (Chirmule, 1999). AAV lässt sich effizient einsetzen, da eine Aufreinigung zu hohen Titern möglich ist und sich sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende Zellen infizieren lassen (Carter, 2000).

Für die unterschiedlichen Anwendungsgebiete gerade bei angeborenen und chronischen Krankheiten kann es von Vorteil sein, wenn eine Genomintegration durch den Vektor und damit eine Langzeitexpression ermöglicht wird, wie es bei wtAAV der Fall ist. Es ist möglich auch bei rekombinanten AAV-Vektoren, diese natürliche Fähigkeit zur Genomintegration zu erhalten (Philpott, 2002). Dies dient zum einen der Sicherheit des Systems, da die Stelle im

Genom bekannt ist, an der AAV sich integriert. Zum anderen kann so eine langfristige Genexpression erzielt werden, die schon tierexperimentell nachgewiesen werden konnte (Samulski, 1999; Xiao, 1996; Kaplitt, 1994). Gerade in der Tumorthherapie kann dies ein wichtiger Vorteil sein, da bei der hohen Zellteilungsrate so die therapeutischen Gene über mehrere Zellgenerationen wirken können. Bei bestimmten Anwendungen ist es jedoch aus Sicherheitsgründen auch sinnvoll, die Fähigkeit zur Weitergabe an Tochterzellen zu vermeiden, wie es bei vielen rekombinanten AAV-basierten Vektoren der Fall ist.

Da AAV ein breites Wirtsspektrum besitzt, ist es möglich dieses Vektorsystem auf den verschiedensten Geweben und damit auch unterschiedlichen Tumorarten einzusetzen (Summerford, 1998). Gerade für humane solide epitheliale Tumore besteht ein relativer Tropismus von AAV (Maas, 1998). Diese Eigenschaften machen AAV-basierte Vektoren zu einem sehr interessanten Gentransfersystem für die Therapie solider Tumore.

AAV lässt sich also sicher und effizient als Gentherapievektor einsetzen und erfüllt damit zwei grundlegende Kriterien für eine klinische Anwendung.

Auch im Vergleich zu anderen viralen Vektorsystemen sind AAV-basierte Vektoren viel versprechend.

Adenovirale Vektoren, die die Fähigkeit zur Replikation besitzen, können auf Tochterzellen weitergegeben und besser in großen Mengen produziert werden. Sie können etwas größere DNS-Sequenzen transportieren, sind aber pathogen und viel stärker immunogen als AAV, so dass sie gerade in Bezug auf die Sicherheit AAV nachstehen.

Herpes simplex Viren besitzen den Vorteil, dass sehr große DNS-Sequenzen verpackt werden können, aber auch diese Viren sind pathogen.

Retroviren können nur sich in Teilung befindliche Zellen infizieren, was deren Effizienz stark einschränkt, zudem ergeben sich aus der Integration ins Genom, welche zufallsmäßig abläuft, erhebliche Sicherheitsrisiken (Lundstrom, 2003).

## **5.2. Gentherapie von Tumoren**

Die Entdeckung gemeinsamer molekularer Veränderungen in verschiedenen Tumorarten weckte die Hoffnung, Gentherapie auch in diesem Bereich therapeutisch einsetzen zu können (Galani, 2001).

In Frage kommen für diese Anwendung sowohl direkt auf die Tumorzellen wirkende Suizidgene, die durch Umsetzung von Prodrugs in aktive Substanzen zu einer Tötung der Zellen führen, als auch indirekt wirkende Gene wie Zellzyklusregulatoren oder immunmodulatorische Ansätze. Eine Vielzahl therapeutischer Gene zeigt direkte antitumorale Effekte. Darunter finden sich unter anderem die codierenden Gene für proapoptischen Proteine wie p53, E1A, p202, PEA3 und BAX (Lo, 2005).

Es kommen ebenfalls Vektoren zum Einsatz, die direkt toxisch auf die Zellen wirken. Ein Beispiel hierfür sind replizierende Vektoren auf der Basis von Adenoviren, die zu einer Zytolyse von Tumorzellen führen.

Auch die Inhibition von aktivierten Oncogenen durch Blockierung der Transkription oder Translation werden untersucht (Wilson, 2002).

Als weitere Option dürfen die Möglichkeiten der körpereigenen Immunabwehr nicht übersehen werden, die durch immunmodulatorische Gene stimuliert werden kann. Besonders Interleukin-2 und Interferon- $\gamma$  kommen hier bei Nierenzellkarzinomen und Melanomen zum Einsatz. Durch das Einbringen von Genen, die für Tumorantigene codieren, wird versucht eine „Impfung gegen Krebs“ zu erzielen. Da viele Tumorantigene von dem Immunsystem nicht als fremd erkannt werden, ist die Kombination mit einem viralen Vektor sinnvoll. Um zusätzlich die Reaktion auf das Antigen zu verstärken, kann eine Kombination mit immunmodulatorischen Genen eingesetzt werden (Liu, 2004; Wilson, 2002).

Andere Ansätze beinhalten den Transfer von antiangiogenen Genen, um die Bildung der Tumorblutgefäße zu unterbinden. Das Einsprossen von Blutgefäßen in das Tumorgewebe trägt entscheidend zum Wachstum eines Tumors bei, da nur so die notwendige Sauerstoffversorgung der Zellen gewährleistet werden kann. Indem Tumoren verschiedene angiogene Faktoren bilden, die die Aktivierung, Migration und Proliferation von Endothelzellen induzieren, können neue Gefäße gebildet werden, die an das bestehende Gefäßsystem angeschlossen werden (Carmeliet, 2003; Leek, 1994). Antiangiogenetische Faktoren wie Angiostatin oder Endostatin können im Tiermodell das Tumorstadium und eine Fernmetastasierung unterdrücken (O'Reilly, 1997; O'Reilly, 1994, Sauter, 2000). Da diese Anwendung theoretisch auch in anderen Geweben zu einer Suppression der Angiogenese führen könnte, stellt ein gezielter gentherapeutischer Ansatz, der auf Tumorendothelzellen gerichtet ist, eine mögliche Weiterentwicklung dar.

Klinische Studien werden bereits für Vektoren basierend auf Adenoviren durchgeführt, die das in über 50 % der malignen Tumore mutierte p53 durch Wildtyp p53 ersetzen sollen. Durch die Expression des den Zellzyklus regulierenden Wildtyp p53 kann eine Apoptose von Tumorzellen erreicht werden.

Auch AAV könnte gerade bei Tumoren mit Mutationen oder Deletionen von p53 in Zukunft therapeutisch eingesetzt werden, da gezeigt werden konnte, dass Wildtyp-AAV selektiv Apoptose in Tumorzellen induziert, die kein p53 exprimieren (Raj, 2001).

Auch für andere gentherapeutische Ansätze ist rAAV ein interessanter Vektor.

rAAV ist durch die Eigenschaft, eine längerfristige Transgen-Expression in der Leber zu vermitteln, für eine systemische Überexpression löslicher Faktoren, wie sie gerade bei antiangiogenetischen Ansätzen notwendig sind, prädestiniert (Samulski, 1999). Für den auf Tumorzellen gerichteten Gentransfer bestehen bislang noch nicht viele Daten. Die wenigen

Daten weisen jedoch darauf hin, dass eine Infektion von Tumorzellen zwar möglich, aber eine Effizienzsteigerung für den Einsatz *in vivo* erforderlich ist (Peng, 2000; Teschendorf, 2001).

In verschiedenen Modellen konnten durch AAV-basierte Vektoren schon verschiedene gentherapeutische Ansätze zur Tumorthapie untersucht werden. In einem Ovarialkarzinom konnten in einem Nacktmausmodell eine Transduktionsrate von 95% erzielt werden und damit das therapeutische Gen nm23H1 eingeschleust werden. In früheren Studien war gezeigt worden, dass Deletionen im Bereich dieses Gens bei verschiedenen soliden Tumoren mit der Bildung von Metastasen assoziiert sind (Marone, 1996). Der AAV-vermittelte Gentransfer von nm23H1 verhinderte bei 60 % der Tiere die Entwicklung von Lebermetastasen und führte darüber hinaus zu einer mittleren Verlängerung der Lebenszeit um 35 Tage (Li, 2005). Auch Tumor-Nekrose-Faktor-verbundener-Apoptose-induzierender-Ligand (TRAIL), der Apoptose in verschiedenen Tumoren erzielt und das Wachstum TRAIL sensitiver Tumoren hemmt, jedoch gesunde Zellen nicht angreift, konnte erfolgreich AAV-vermittelt in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* exprimiert werden. In einem Mausmodell hingegen zeigten sich zwar ein messbarer Effekt bezüglich der Apoptose und ein vermindertes Tumorstadium, die Effizienz der AAV-Vektoren war *in vivo* allerdings so gering, dass ein Nachweis von TRAIL nicht möglich war (Yoo, 2005).

Der Gentransfer in Tumorzellen ist vor allem notwendig, um Suizidgene einzuschleusen oder die Zellen stärker immunogen zu machen. Gerade bei diesen Anwendungen ist es wünschenswert, dass alle Tumorzellen durch den Gentransfer erreicht werden. Dies ist jedoch vor allem *in vivo* bislang nicht erreicht worden. Diese mangelnde Effizienz lässt sich teilweise dadurch ausgleichen, dass Tumorzellen, auf die ein Suizidgen übertragen wurde, Prodrug aktivierende Enzyme produzieren, die auch auf die nicht-transduzierten Nachbarzellen wirken. Durch diesen so genannten Bystander-Effekt werden also auch Tumorzellen getötet, die nicht infiziert wurden. Dieser Effekt konnte durch eine Kombination aus verschiedenen Prodrugs noch verstärkt werden (Wu, 2005).

Probleme die beim Gentransfer in Tumore in erster Linie überwunden werden müssen sind die Spezifität, so dass selektiv Tumorzellen durch die Vektoren erreicht werden, und die bislang niedrige Effizienz der verschiedenen Vektorsysteme (Galanis, 2001).

In dieser Arbeit wurden Möglichkeiten untersucht, die Effizienz von AAV beim Tumor-Gentransfer zu erhöhen.

### 5.3. Gentransfer durch AAV in verschiedene Tumorzelllinien *in vitro*

Es konnte bereits in älteren Untersuchungen gezeigt werden, dass AAV (Serotyp 2) zum Gentransfer in verschiedene Tumorzelllinien geeignet ist. Vor allem die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa ließ sich sehr gut durch AAV infizieren. Weitere humane epitheliale Tumorzelllinien sowie frisch aus Ovarialkarzinomen und Melanomen gewonnene Zellen ließen sich ebenfalls effizient infizieren, aber zu geringeren Anteilen als HeLa-Zellen. Murine Tumorzelllinien und humane hämatopoetische Zelllinien ließen sich hingegen kaum infizieren (Maas et al., 1998). Auch alle in unseren Experimenten verwendeten soliden Tumorzelllinien ließen sich effizient durch AAV-2 transduzieren. Allerdings zeigten sich große Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien, ebenso wie bei den von Maas durchgeführten Versuchen, obwohl die Viren durch Anwendung modifizierter Verfahren, besser aufgereinigt waren. Die Vektoren in unseren Versuchen waren Adenovirus-frei verpackt worden. Ein Helferplasmid ermöglicht hierbei die Verpackung von rAAV, ohne dass Verunreinigungen durch das toxische Adenovirus entstehen. Dies führte dazu, dass die Aufreinigung von rekombinanten AAV-Vektoren einfacher und effizienter wurde als bei den von Maas verwendeten Vektoren (Xiao, 1998).

Auch in unseren Versuchen ließen sich HeLa-Zellen am effizientesten transduzieren. Verschiedene Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben, wie Melanomen, Mammakarzinomen, Kolonkarzinomen, Osteosarkomen oder Neuroblastomen, ließen sich mit deutlichen Unterschieden in der Effizienz mit AAV infizieren. Auch Zelllinien aus der gleichen Tumorart variierten stark bezüglich der AAV-vermittelten Transgen-Expression. HT29-Zellen ließen sich zum Beispiel durch 10000 AAV-Partikeln/ Zelle zu 2,8 % transduzieren, CO115-Zellen hingegen durch nur 5000 AAV-Partikeln/ Zelle zu 21,5 %, obwohl beide Zelllinien ihren Ursprung in Kolonkarzinomen haben. Für die meisten Zelllinien wurde jedoch eine relativ große Virusmenge verwendet, um eine effiziente Transduktion zu erzielen. Die benötigte Virusmenge schränkt die Möglichkeiten der therapeutischen Anwendung *in vivo* sowohl bezüglich der Applikation als auch der Herstellung ein.

In früheren Studien hatte sich gezeigt, dass verschiedene Methoden die Transduktionseffizienz von AAV steigern können. Als erstes ist die Koinfektion mit Adenoviren zu nennen. Da die natürliche Infektion durch das Dependovirus AAV immer mit einer Koinfektion einhergeht, ist es nicht verwunderlich, dass dies auch beim Einsatz von AAV als Gentherapievektor eine Erhöhung der Transduktionsrate mit sich bringt. *In vivo* ist aber eine Koinfektion mit dem pathologischen Adenovirus nicht wünschenswert, so dass andere Faktoren zur Effizienzerhöhung von AAV als Gentherapievektor untersucht wurden. Besonders zu erwähnen sind die Bestrahlung mit UV-Licht oder Gamma-Strahlen, DNS-

schädigende Substanzen und Inhibitoren der DNS-Synthese sowie Topoisomerase-Inhibitoren wie Etoposid, die alle zu einer gesteigerten AAV-vermittelten Genexpression führten. Wildtyp-AAV-Genome amplifizieren sich, wenn die Wirtszellen mit einer der gerade genannten Methoden oder Substanzen behandelt werden (Alexander, 1994; Alexander 1996). Der Einsatz dieser Methoden ist mit der vermehrten Bildung doppelsträngiger DNS verbunden. Alle DNS-schädigenden Substanzen, DNS-Synthese- Inhibitoren und Topoisomerase-Inhibitoren können die DNS durch verschiedene Mechanismen verändern. Gemeinsam sind ihnen hingegen die Reparaturmechanismen, die sie induzieren. Da Wirtszell-DNS-Polymerasen für die Konversion einzelsträngiger Vektorgenome in doppelsträngige Moleküle benötigt werden, könnten diese Behandlungsmethoden die Transduktion sich nicht teilender Zellen erhöhen, indem sie DNS Synthese im Rahmen eines Reparaturmechanismus in Zellen induzieren, die sich gerade nicht in der S-Phase befinden (Russel,1995; Braun-Falco, 2005). Diese physikalischen und chemischen Methoden sind jedoch *in vivo* in ihrer Anwendung stark eingeschränkt, da umliegendes Gewebe geschädigt werden kann. So führt die Bestrahlung mit UV Licht zwar zum Beispiel in Fibroblasten zu einer 40-fachen Erhöhung der Transgen-Expression, gleichzeitig erliegen bei dieser Behandlung jedoch Keratinozyten dem Zelltod (Braun-Falco, 2005).

Die Inhibition der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosinkinase (EGF-R TK) führte in Keratinozyten und verschiedenen anderen Zelllinien ebenfalls zu einer Steigerung der Transduktionseffizienz von AAV und einer prolongierten Expression. Es wurde gezeigt, dass EGF-R TK die Phosphorylierung von einzelsträngigen D-Sequenz bindendem Protein beeinflusst, das an das virale Genom bindet und damit die Doppelstrangsynthese inhibiert (Braun-Falco, 2005). Ebenso wie durch die vorher genannten physikalischen und chemischen Faktoren wird auch hier die Transduktionseffizienz erhöht, indem die Doppelstrangsynthese von AAV ermöglicht oder zumindest beschleunigt wird.

Natürlich könnte der synergistische Effekt von Chemotherapeutika (wie z.B. Topoisomerase-Inhibitoren) oder einer Bestrahlung im Kontext eines AAV-vermittelten Tumorgentransfers genutzt werden, wenn diese Behandlungen bei einem Patienten gut durchführbar und möglicherweise sowieso indiziert sind. Wenn die Gentherapie jedoch unabhängig von Bestrahlung und Chemotherapie eingesetzt werden soll, ist es wünschenswert, andere Möglichkeiten zur Erhöhung der Transduktionseffizienz von AAV zu finden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es ein doppelsträngiges (dsAAV) beziehungsweise selbstkomplementäres AAV (scAAV) basiertes Vektorsystem zu generieren und auf verschiedenen Tumorzelllinien zu untersuchen. Die Doppelstrangsynthese scheint auch in Tumorzellen ein wichtiger limitierender Faktor für die Transgen-Expression zu sein, so dass scAAV den Gentransfer in solide Tumorzellen wesentlich effizienter macht. In der Literatur

wurde beschrieben, dass durch scAAV sowohl *in vitro* in HeLa-Zellen als auch *in vivo* in der Maus-Leber eine schnellere und höhere Transgen-Expression unabhängig von der Doppelstrangsynthese der Wirtszellen erzielt werden konnte (McCarty, 2001).

Zunächst wurde in unseren Versuchen ein Konstrukt verwendet, in dem statt 4,7 kb ITR flankierter DNS 2,3 kb lange ITR flankierte DNS verpackt wurde, weil davon ausgegangen werden konnte, dass zwei dieser kürzeren Sequenzen in ein Kapsid verpackt werden können. Vorausgesetzt, dass es sich um DNS-Stränge unterschiedlicher Polarität handelt, können die beiden Stränge sich dann zu einem Doppelstrang zusammen fügen. Dieses Konstrukt wird als doppelsträngiges Adeno-assoziiertes Virus (dsAAV) bezeichnet. Dieser zunächst verwendete doppelsträngige AAV-Vektor enthielt nur einen Anteil selbstkomplementärer Genome von 10 %, da es bei diesem Konstrukt auch möglich ist, dass nur eine kürzere Sequenz oder zwei Sequenzen gleicher Polarität in ein Kapsid verpackt werden, die dann keine selbstkomplementäre DNS bilden. Dennoch brachte schon dieser geringe Anteil selbstkomplementärer Vektoren eine deutliche Steigerung der Transduktionseffizienz. Je nach Zelllinie ließ sich so die Transduktionsrate verdoppeln bis vervierfachen. Da diese Ergebnisse schon viel versprechend waren, aber in diesem Fall nur ein geringer Teil selbstkomplementäre DNS gebildet wurde, verwendeten wir für die weiteren Experimente ein selbstkomplementäres Vektorkonstrukt (scAAV), das ebenso wie das von McCarty an 2003 beschriebene, durch eine Deletion in der terminal resolution site in einer der beiden flankierenden ITR-Sequenzen fast ausschließlich selbstkomplementäre AAV-Partikel hervorbringen sollte. Unter denaturierenden Bedingungen zeigte sich, dass die scAAV-Verpackung zu etwa 90 % selbstkomplementäre Vektoren enthielt.

Durch Verwendung von selbstkomplementärem AAV ließ sich die Transgen-Expression deutlich erhöhen. Wir haben die Effizienz von scAAV in mehreren Zelllinien untersucht. Es zeigte sich, dass durch scAAV an Tag 2 nach Infektion von HeLa-Zellen eine höhere Transgen-Expression erreicht wird als durch ssAAV. Dieses Ergebnis ließ sich auf das breite Spektrum der untersuchten soliden Tumorzelllinien übertragen. Mit einer großen Variabilität zeigten sich je nach Tumorzelllinie Steigerung der Transduktionsrate auf das zwei- bis siebzehnfache durch die Verwendung von scAAV. Besonders Tumorzelllinien, die sich zunächst schlecht transduzieren ließen wie zum Beispiel die Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 oder die Osteosarkom-Zelllinie Saos-2 ließen sich unter Verwendung von scAAV effizient transduzieren.

Der Nachteil des selbstkomplementären AAV ist, dass die ohnehin schon relativ kurze DNS-Sequenz, die in AAV-Vektoren verpackt werden kann, von etwa 4,7kb auf 2,3kb reduziert wird. Der wünschenswerte Einsatz von scAAV, der ebenso in Tumorzellen wie in normalen

Zellen eine erhöhte Transduktionsrate ermöglicht, ist also auf Anwendungen eingeschränkt, in denen nur ein relativ kurzes Transgen benötigt wird.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, eine mögliche synergistische Wirkung von dem Proteasomen-Inhibitor MG132 mit AAV für den Gentransfer in Tumorzelllinien zu untersuchen.

Der Einsatz von Proteasomen-Inhibitoren ist eng mit dem aktuellen Modell zur Infektionsbiologie von AAV verbunden.

AAV bindet an den auf den meisten Zellen exprimierten Heparansulfat-Proteoglykanrezeptor und weiteren Korezeptoren. Die Viruspartikel werden dann in vielen Zellen als Clathrin-coated Vesicles in die Zelle aufgenommen, in einigen Zelllinien muss man jedoch davon ausgehen, dass es auch andere Wege gibt als die Clathrin abhängige Endozytose. Größtenteils wird AAV über das frühe bzw. späte Endosom durch die Zelle geleitet, wofür ein saures Milieu in der Zelle benötigt wird. Die Viren werden so in der perinukleären Region freigesetzt. Auf diesem Weg, sowohl im Zytosol als auch im Nukleus, kann AAV mit Ubiquitin konjugiert und über Proteasomen abgebaut werden (Douar, 2000).

MG132 wurde als Proteasomen-Inhibitor gewählt, da er schon in früheren Versuchen an Bronchialepithelzellen zur Effizienzsteigerung von AAV erfolgreich eingesetzt worden war (Douar, 2001). Ein anderer Proteasomen-Inhibitor LLnL hatte in Keratinozyten in nicht toxischen Dosen keinen Einfluss auf die Transduktionseffizienz von AAV gezeigt (Braun-Falco, 2005).

In allen verwendeten Tumorzelllinien ist die Zellzahl durch MG132 im Vergleich zur Negativkontrolle abgefallen, in einigen Zelllinien so stark, dass die Durchführung einer aussagekräftigen Durchflusszytometrie nicht mehr möglich war. Zahlreiche Proteine, die regulatorisch auf den Zellzyklus wirken, werden über Proteasomen abgebaut. Wenn dieser Abbauweg nun inhibiert ist, kann dies in Zellen zur Apoptose führen. Besonders Tumorzellen sind davon betroffen. Eine Rolle spielt dabei sicher der hohe Zellumsatz. Allerdings reicht dies im Vergleich zu anderen sich schnell teilenden Zellen nicht als alleinige Erklärung aus. Weitere Faktoren wie zum Beispiel der Anstieg von p27 in transformierten Zellen müssen noch genauer untersucht werden. Diese selektive Apoptose induzierende Wirkung von Proteasomen-Inhibitoren auf maligne entartete Zellen kann therapeutisch genutzt werden. Derzeit laufen mehrere klinische Studien. Eine Phase II Studie, in die Patienten mit multiplem Myelom eingeschlossen wurden, ergab erste vorläufige Ergebnisse: Unabhängig von zuvor durchgeführten Therapien erreichten 33 % der Patienten ein stabiles Krankheitsstadium und 52 % zumindest ein teilweises Ansprechen auf die Therapie (Adams, 2002).

Auch in unseren Versuchen sank die Zellzahl sowohl bei Zelllinien, die aus soliden Tumoren stammten, wie die Kolonkarzinom-Zelllinie CO115, als auch bei aus dem hämatopoetischen System stammenden Zellen wie MEC-1 oder Raji durch die Zugabe von MG132 bei der

Infektion mit AAV stark ab. In diesen Tumorzelllinien könnte durch weitere Verdünnung von MG132 versucht werden, dennoch einen Effekt auf die Transduktionseffizienz von AAV zu erreichen, ohne die Zelle in die Apoptose zu treiben. Für Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass die Toleranz gegenüber MG132 wesentlich geringer ist als bei Bronchialzellen (Braun-Falco, 2005).

Der Proteasomen-Inhibitor MG132 führte vor allem in Kombination mit der Anwendung von scAAV nur in einem Teil der untersuchten Tumorzelllinien zu einer erhöhten Transduktion. Die einzige getestete Zelllinie in der MG132 nicht einmal im Vergleich zu ssAAV alleine eine Steigerung brachte war die Neuroblastom-Zelllinie SK-N-MC. In allen anderen Zelllinien, die nicht durch MG132 in die Apoptose getrieben wurden, ließ sich eine Steigerung gegenüber ssAAV alleine zeigen. Bei Verwendung von scAAV hingegen divergierten die Effekte stark. In HT29-Zellen ließ sich durch Verwendung des Proteasomen-Inhibitors eine mehr als verdoppelte Transduktionsrate beim Gentransfer durch scAAV erzielen. In anderen Zelllinien wie MM 436 wurde durch MG132 eine Reduktion der Transduktionsrate auf 60 % des Ausgangswertes bei Anwendung von scAAV alleine ausgelöst. Schon früher wurde gezeigt, dass die durch AAV-Vektoren vermittelte Transgen-Expression, in bestimmten Zellarten stärker durch Proteasomen-Inhibitoren zu beeinflussen ist als in anderen. Für apikale Bronchialzellen wurde von Jennings gezeigt, dass die Ubiquitinilierung und der Abbau durch Proteasomen verhindern, dass durch Endozytose aufgenommene AAV-Partikel den Zellkern erreichen können. In diesen Zellen ließ sich die Transduktion sowohl durch Proteasomen-Inhibitoren als auch durch Ubiquitinligase-Inhibitoren stark erhöhen. Dies konnte auf Leberzellen und Synoviozyten übertragen werden. Hingegen sind Skelett- und Herzmuskel von diesem Problem nicht betroffen und folglich erhöht sich der Gentransfer nicht in jeder Zellart durch Zugabe von Proteasomen-Inhibitoren (Dongsheng, 2000; Jennings, 2005).

Hierfür könnten verschiedene Faktoren verantwortlich sein. Zum einen könnte dieser Abbauweg nicht in allen Zellen gleich stark ausgeprägt sein. Zum anderen wäre es möglich, dass in manchen Zellen andere Faktoren wie die Oberflächenrezeptoren so ein großes Hindernis für die Infektion sind, dass auch die Unterbindung des Abbaus von AAV keinen Einfluss auf die Expressionsrate hat. Es wäre auch sinnvoll die Effekte anderer Proteasomen-Inhibitoren auf verschiedene Zielzellen zu testen, da zum Beispiel der Proteasomen-Inhibitor LLnL auf Bronchialzellen gute Effekte erzielte, jedoch auf Keratinozyten wirkungslos war, die sich wiederum durch MG132 gut beeinflussen ließen, so dass durchaus Unterschiede in der Wirkung der einzelnen Proteasomen-Inhibitoren auf unterschiedliche Zellarten bestehen (Braun-Falco, 2005; Duan, 2000).

Da AAV-Partikel eigentlich zu groß sind, um ohne vorherige Spaltung in ein Proteasom aufgenommen zu werden, stellt sich die Frage, ob wirklich die Vektoren abgebaut werden oder ob andere Substanzen, die den Transport von AAV in den Zellkern vermitteln, eliminiert

werden. Dafür kämen verschiedene Transkriptionsfaktoren, aber auch Tumorsuppressorgene wie p53 in Frage. Interessant ist hierbei auch, weshalb Proteasomen-Inhibitoren auch noch 13 Tage nach der Infektion Einfluss auf die Transgen-Expression in Synoviozyten haben und nicht nur in zeitlichem Zusammenhang mit der rAAV-Infektion (Jennings, 2005). Hingegen wurde bei der Infektion von HeLa-Zellen nur bei einem zeitlichen Zusammenhang von bis zu 5 Stunden nach Infektion ein Effekt durch MG132 erzielt (Douar et al., 2000).

#### **5.4. AAV als Gentherapievektor für Tumoren *in vivo***

Da HeLa-Zellen *in vitro* sehr gut infizierbar sind, wählten wir diese Zervixkarzinom-Zelllinie zur Generierung eines *in vivo* Modells. Die HeLa-Tumoren ließen sich in diesem Modell durch rekombinanten AAV nur in sehr geringem Ausmaß transduzieren, obwohl in einem anderen Zervixkarzinommodell (SiHa Zellen) gezeigt wurde, dass ein therapeutischer Gentransfer für das JE Gen, das in HPV induzierten Karzinomen fehlt und Onkogene inhibiert, durch rAAV-Injektion *in vivo* möglich ist und das Tumorstadium dadurch verlangsamt wird (Kunke, 2000).

In früheren Studien wurden jedoch ähnliche Probleme bei der Transduktion anderer maligner Tumoren *in vivo* beobachtet:

Es zeigte sich, dass Tumore *in vivo* schwieriger zu transduzieren sind als gesundes Gewebe. Hepatozelluläre Karzinome zeigten nach rAAV-Infektion *in vivo* nur nach Bestrahlung oder Koinfektion mit Adenoviren eine Transgen-Expression (Peng, 2000).

Auch bei Kolon- und Pankreaskarzinom-Modellen konnte kaum eine Transgen-Expression nachgewiesen werden, obwohl die Zelllinien *in vitro* gut zu infizieren waren. Adenoviren hingegen führten in diesem Modell zu einer effizienten Transgen-Expression (Teschendorf, 2001).

Ein limitierender Faktor für den AAV-vermittelten Gentransfer ist auch *in vivo* die Doppelstrangsynthese. Es konnte für gesundes Leber-, Muskel- und Gehirngewebe gezeigt werden, dass die Transduktion nach Infektion mit scAAV im Mausmodell nicht nur schneller ist, sondern auch deutlich mehr Zellen eine Transgen-Expression zeigen. Die Expression eines durch AAV-Vektoren in die Leberzellen von Mäusen transportierten Erythropoietin-Gens wurde an Hand des ansteigenden Hämatokrites bestimmt. Dieser stieg bei Verwendung von scAAV bereits in der zweiten Woche nach Applikation von etwa 40 % auf 65 % an, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Erythropoetin bereits in der ersten Woche vermehrt exprimiert wurde, hingegen bei Verwendung von ssAAV erst nach drei Wochen auf nur etwa 55 % (McCarty, 2003).

In unserem Modell ließ sich zwar die positive Wirkung von scAAV nachvollziehen, da sich durch die Verwendung von scAAV auch *in vivo* die Transduktionsrate verdoppeln ließ, jedoch wurde trotzdem kein Gentransfer in mehr als 1 % der Zellen erzielt. Es müssen also noch weitere Faktoren die effektive Transduktion von HeLa-Tumoren *in vivo* verhindern.

Eine Erklärung wäre der Abbau der Viren im Tumorgewebe. Dies würde auch erklären, weshalb nur noch ein geringer Anteil der injizierten Vektor-DNS im Tumorgewebe durch die quantitative PCR nachweisbar war. Der Einsatz von Proteasomen-Inhibitoren könnte auch *in vivo* eine Effizienzerhöhung bewirken. Hierzu wäre die Durchführung weiterer Versuche nötig.

Eine andere Erklärung wäre, dass die Tumorstruktur den Transport der Viren in die Tumorzellen behindert. In der Histologie der subkutan gewachsenen HeLa-Tumoren waren breite Bindegewebsstränge zu sehen, die die Zellen umgaben. Von Peng wurde eine biochemische oder mechanische Blut-Tumor Barriere für hepatozelluläre Karzinome postuliert, da sich bestimmte Chemotherapeutika zwar im gesunden Lebergewebe anreichern, aber kaum in primäre Leberkarzinome eindringen können (Peng, 2000).

Einen Teil dieser Barriere bilden abnorme Gefäße in Tumoren, die auf Grund ihrer veränderten Morphologie insbesondere den erheblichen Schwankungen in der Dicke der Basalmembran die Blutversorgung der Tumore nicht gleichmäßig gewährleisten können. Der höhere interstitielle Druck in Tumoren erschwert den Transport von Substanzen in den Tumor zusätzlich (Jain, 2005). Teilweise kann dieses Problem durch Applikation von rAAV durch Jetinjektion überwunden werden. Der hohe Druck kann hierbei den interstitiellen Druck gut überwinden und somit eine bessere Ausbreitung des Virus im Tumor erreichen als bei gewöhnlicher Injektion, bei der die Transgen-Expression oft auf den Stichkanal begrenzt ist (Janouskova, 2003).

Glioblastome sind ein Beispiel für Tumoren, die sich *in vivo* gut durch AAV transduzieren lassen. Sie können sogar besser in diese Art von Tumor eindringen als Adenoviren. AAV-vermittelte Transgen-Expression konnte in einem Mausmodell in Clustern über das ganze Glioblastom verteilt detektiert werden (Enger, 2002).

Um die Unterschiede von scAAV und ssAAV als Vektoren für die Gentherapie solider Tumoren *in vivo* weiter vergleichend zu untersuchen, könnte es sinnvoll sein, ein anderes Modell zu wählen wie etwa das von Enger verwendete Glioblastommodell.

Um die Frage, welche weiteren Faktoren dafür verantwortlich sind, dass in diesem HeLa-Modell für solide Tumore ein Gentransfer durch AAV nur mit minimaler Effizienz möglich war, untersuchen zu können, etablierten wir ein Spheroidmodell.

## 5.5. Spheroide als Modell für den Gentransfer von AAV in dreidimensionalen Zellverbänden

Auch in einem Spheroidmodell war von Enger gezeigt worden, dass rAAV gut in die Mitte eines Glioblastom Zellverbandes eindringen konnte. Diese Spheroide entstanden aus Biopsien von rezidierten humanen Glioblastomen, die stark zerkleinert und in Medium kultiviert wurden (Enger, 2002). Um diesen Effekt auch für Tumorzelllinien untersuchen zu können, generierten wir in Anlehnung an eine von Kelm beschriebene Methode Spheroide in hängenden Tropfen (Kelm, 2003). Die Spheroide, die ausschließlich aus der jeweiligen Zelllinie bestehen, spiegeln das Verhalten der jeweiligen Tumorzellen wieder, unterscheiden sich aber von natürlich gewachsenen Tumoren, da hier keine Fibroblasten und Blutgefäße einsprossen können. Auch die Blutversorgung entfällt in diesem Modell. Dennoch hat es viele Eigenschaften von natürlich gewachsenen Tumoren: Den Aufbau mit einer äußeren proliferierenden Schale, einer Intermediärzone und einem hypoxischen nekrotischen Zentrum, die verminderte Permeabilität für Medikamente, die Inhibition von Apoptose und eine Modulation der Proteinexpression unter anderem von Topoisomerasen und Reparatur Enzymen (Kelm, 2003). Damit erhielten wir ein dreidimensionales *in vitro* Modell, das uns helfen sollte, die Unterschiede zwischen den Beobachtungen *in vitro* und im Mausmodell besser zu verstehen. Wir nutzten dieses Modell, um zu untersuchen, ob AAV in HeLa-Spheroiden eine Transgen-Expression im Zentrum der Spheroide induziert, also zwischen die Zellen eindringen kann. Die transgenen Zellen waren tatsächlich im ganzen Spheroid verteilt, allerdings wurde eine relativ große Virusmenge benötigt. Die Transgen-Expression war deutlich geringer im dreidimensionalen Modell als bei Kultivierung als Monolayer in Zellkulturschalen. Auch bei SK-N-MC-Spheroiden, aus einer Neuroblastom-Zelllinie, sank die Anzahl GFP-exprimierender Zellen gegenüber der Zellkulturschale ab. Im Vergleich zeigte sich jedoch, dass sich bei gleicher MOI die Neuroblastomspheroide besser transduzieren ließen als die HeLa-Spheroide, obwohl *in vitro* HeLa-Zellen wesentlich leichter zu transduzieren waren als SK-N-MC-Zellen. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass Neuroblastome auch *in vivo* leichter zu transduzieren sind als Zervixkarzinome. Damit ergibt sich eine Übereinstimmung mit dem von Enger beschriebenen Befund, dass AAV einen sehr effizienten Gentransfer in neuronale Tumoren gewährleisten kann. In den von Enger durchgeführten Versuchen wurden humane Glioblastom Spheroide verwendet, allerdings waren diese Spheroide aus Biopsie-Material und nicht *in vitro* aus Tumorzelllinien gezüchtet, wie in unseren Experimenten. In diesen Versuchen zeigte sich, dass eine sichtbare rAAV-vermittelte GFP-Expression erreicht werden konnte und die Viren in die Spheroide eindringen können. Diese Daten ließen sich von Enger auf ein *in vivo* Modell, bei dem die humanen Tumorspheroide Nacktratten implantiert wurden, übertragen. Obwohl es sich bei Glioblastomen, die neuroektodermalen Ursprunges sind, um einen histologisch ganz

anderen Tumor handelt als bei dem aus sympathischem Nervengewebe stammenden Neuroblastom, das meist in der Nebenniere von Kindern entsteht, lassen sich diese beiden hochmalignen neuronalen Tumorarten in dreidimensionalen Modellen gut durch AAV transduzieren. *In vitro* hingegen war der AAV-vermittelte Gentransfer weder in Neuroblastomzellen noch in Glioblastomzellen effizienter als in die meisten anderen Tumorzelllinien. Man kann also annehmen, dass in neuronalen Tumoren das Gewebe eine bessere Penetration durch AAV ermöglicht als in epithelialen Tumoren.

Der Zell-Zellkontakt könnte hier entweder zu einer festen Barriere führen, die die Durchdringung mit AAV erschwert oder er löst Mechanismen aus, die den Weg von AAV in den Zellkern oder die dortige Expression verhindern. Dies könnte in Form von veränderter Rezeptorexpression ebenso geschehen, wie in Form von intrazellulär regulierten Transportmechanismen beziehungsweise gesteigertem Abbau von AAV in der Zelle.

### **5.6. Perspektiven für die Gentherapie von malignen Erkrankungen durch AAV**

Die ideale Vorstellung von einem AAV-basierten Gentherapievektor für Krebserkrankungen beinhaltet, dass der Vektor nach einmaliger Applikation einen selektiven Gentransfer in Tumorzellen ermöglicht, ohne gefährliche Nebenwirkungen auszulösen. Eine einmalige Verabreichung ist wünschenswert, da nach mehrfacher Applikation von AAV-Vektoren stark erhöhte Titer von neutralisierenden Antikörpern gemessen wurden (Moss, 2004). Deswegen ist es nötig eine hohe Effizienz zu erreichen. Möglichkeiten zur Steigerung der Gentransfer-Effizienz von AAV wurden in dieser Arbeit untersucht. Durch die Aufreinigung zu hohen Titern soll erreicht werden, die Vektoren in einem kleinen Volumen in ausreichender Menge applizieren zu können. Um die für 50 Patienten in einer Studie benötigte Menge an Vektoren zu verpacken, werden beispielsweise derzeit etwa 20 000 Rollflaschen benötigt. Obwohl die Herstellung von AAV-Vektoren in diesen hohen Konzentrationen noch immer ein zentrales Problem darstellt, deuten sich hier in letzter Zeit technische Lösungen an. So wurden von Farson et al. 2004 mehrere Verpackungszelllinien entwickelt. Nach Integration von Rep und Cap Genen in A549 Zellen konnten durch Infektion mit den entsprechenden AAV-Vektoren verschiedene Produktionszelllinien kreiert werden. Diese Zelllinien konnten dann an die Serum-freien Bedingungen in Bioreaktoren gewöhnt werden. Auf diese Weise wurden bis zu  $10^4$  Partikel/ Zelle produziert. Die so hergestellten Vektoren sind den gewöhnlichen rAAV-Vektoren sehr ähnlich und frei von Wildtyp-AAV. Ein 500 l Bioreaktor mit diesen Zelllinien kann eine Menge von Vektoren produzieren, die etwa 25000 Zellkulturflaschen oder 2500 Hochkapazitäts- Rollflaschen entspricht.

AAV-Vektoren könne sehr effizient für die systemische Überexpression solubler Faktoren eingesetzt werde. In verschiedenen Studien wird der AAV-vermittelte Gentransfer daher gerade bei Patienten mit angeborenen Gendefekten wie Hämophilie oder zystische Fibrose

untersucht (Wang, 2005; Moss, 2004). Patienten mit zystischer Fibrose wurde AAV mit dem Transgen CFTR aerosolisch verabreicht. Darunter zeigten die Patienten nach 30 Tagen eine signifikante Besserung der chronischen Erkrankung gegenüber einer Kontrollgruppe. Es zeigten sich zahlreiche Nebenwirkungen jedoch nie signifikant stärker als in der Kontrollgruppe. Bei keiner Nebenwirkung konnte ein sicherer Zusammenhang zu AAV festgestellt werden. Die Bildung von Antikörpern gegen AAV beeinflusste die Wirkung der Gentherapie nicht. Langzeitergebnisse stehen allerdings noch aus (Moss, 2004). Es stellt sich hier die Frage, ob diese viel versprechenden Ergebnisse auch auf die Tumorthherapie übertragen werden können. Vor dem Hintergrund, dass der AAV-vermittelte Gentransfer in Tumorzellen -wie auch diese Arbeit gezeigt hat- unter *in vivo*-Bedingungen deutlichen Limitationen unterliegt, könnte in der systemischen Überexpression von Faktoren, die zu einer Wachstumshemmung von Tumoren in der Lage sind eine viel versprechende Strategie für die Anwendung von AAV-Vektoren in dieser Anwendung liegen. Die meisten experimentellen Daten dazu liegen für antiangiogene Faktoren vor (Davidoff, 2002; Davidoff, 2005).

Soll die Tumorzelle das Ziel des Gentransfers sein -in der Absicht der Überexpression von Suizidgenen oder immunmodulatorischen Faktoren, durch die eine Immunantwort gegen den Tumor induziert werden soll,- dann ist eine wesentliche Voraussetzung im Hinblick auf die Vermeidung schwerer Nebenwirkungen, dass selektiv die Tumorzellen getroffen werden. Eine intratumorale Injektion des Vektors stellt die einfachste Methode dar, um eine solche Spezifität zu erreichen. Effektiver wäre es jedoch, wenn die Tumorzellen auch nach systemischer Gabe des Vektors transduziert werden könnten. Dies setzt aber voraus, dass ein sehr selektives Targeting erfolgen muss, vor allem wenn Suizidgene zur Anwendung kommen, während dies zum Beispiel beim Ersatz eines mutierten p53 ein geringeres Problem darstellen würde.

AAV ist besonders für die Infektion von Muskel, Leber und Gehirn, hingegen weniger für Zellen megakariozytischen Ursprunges oder vaskuläre Endothelzellen geeignet (Braun-Falco, 2005). Um selektiv die gewünschte Zellart zu erreichen, können verschiedene Strategien zum Targeting angewendet werden. Zur Verfügung stehen Methoden zum direkten und indirekten Targeting. Beim indirekten Targeting wird ein Molekül an das Virus gebunden, das selektiv an ein Oberflächenmolekül der Zielzelle bindet. Hierbei kommen bispezifische Antikörper ebenso zum Einsatz wie Avidin-gekoppelte Liganden, die dann an einen biotinylierten Vektor binden. Beim direkten Targeting ist ein spezifischer Ligand oder Antikörper direkt in das Viruskapsid integriert. Dafür stehen bei AAV mehrere Regionen zur Verfügung, die auch zum Teil funktionell überprüft wurden. Die viel versprechendste Stelle liegt zwischen den Aminosäuren 587 und 588 auf der VP3 Region. Da die VP3 Region auch in VP2 und VP1 Proteinen gefunden werden kann, wird die eingefügte Region etwa 60 Mal

auf einem AAV-Kapsid repräsentiert. Auf diese Weise kann der Tropismus an praktisch jede Zielzelle angepasst werden, indem entsprechende Liganden eingebaut werden (Büning, 2004). Die Wahl der Liganden richtet sich dabei jeweils nach der jeweils gewählten Zielstruktur auf den zu transduzierenden Zellen. Jedoch muss jedes neue Vektorkonstrukt aufwendig hergestellt und im Hinblick auf die Verpackungseffizienz und den Tropismus getestet werden. Daher wurde vor kurzem eine neuen kombinatorische Methode entwickelt, bei der eine Vektor-Bibliothek mit zufällig in die VP3 Region eingefügten Peptidsequenzen generiert und anschließend auf den Zielzellen getestet wird. Diejenigen Mutanten die sich in den Zellen replizieren konnten werden erneut zur Infektion der Zielzellen eingesetzt. Nach fünf Selektionszyklen können so spezifische Vektoren generiert werden (Perabo, 2003). Diese Technik könnte in der Zukunft auch den Tumorzell-gerichteten AAV-vermittelten Gentransfer in der *in vivo*-Situation deutlich verbessern, wenn es gelingt Vektoren zu generieren, welche einen Tumorzell-spezifischen Tropismus aufweisen. Da die Tumorzellmatrix, wie auch diese Arbeit gezeigt hat, eine entscheidende Barriere für den AAV-vermittelten Tumorgentransfer *in vivo* darstellt, könnte auch ein Targeting auf die extrazelluläre Matrix eine viel versprechende Strategie darstellen.

Hierzu gibt es erste Ergebnisse unter Verwendung von retroviralen Vektoren, die in einem Tiermodell intravenös appliziert wurden. Durch das Targeting auf Kollagen in der Tumormatrix konnte eine Akkumulation in den Tumorgefäßen erreicht werden. Die Tumorzellen wurden hoch effizient infiziert. Gegenüber von Wildtyp Vektoren mit normalem Tropismus zeigte sich ein erhöhter Gentransfer sowie eine verstärkte Langzeitexpression, ohne dass toxische Effekte hervorzurufen wurden (Gordon, 2001).

Grundsätzlich müssen bei der Verwendung von viralen Vektoren für die Tumorthherapie in jedem Fall die Vektoren, die verwendeten Gene, ihre Produkte und deren Wirkung sehr genau charakterisiert sein, um Schäden zu vermeiden und neue Krankheiten zu verhindern, wie sie bei den Kindern mit einer kombinierten Immunschwäche aufgetreten sind (Check, 2002).

Bezogen auf die Verwendung von AAV als Genthherapievektor für die Tumorthherapie ist aufgrund der biologischen Charakteristika von einer guten Sicherheit auszugehen. Es erscheinen aber Optimierungen in drei Bereichen notwendig:

- 1) Verbesserung der Produktion von effizienten Vektoren in großen Mengen.
- 2) Entwicklung von Vektoren zum zielgerichteten Einsatz
- 3) Verbesserung der Gewebegängigkeit bei Verwendung der Viren zum Tumorgentransfer.

Die technischen Werkzeuge zur Umsetzung dieser Punkte stehen mittlerweile wie beschrieben zur Verfügung, sodass AAV ein wachsendes Potential als Genthherapievektor zur Behandlung von Tumoren aufweist.

## 6. Zusammenfassung

Tumorerkrankungen stellen die zweithäufigste Todesursache in den Industrieländern nach den kardiovaskulären Erkrankungen dar. Trotz moderner Therapien verlaufen diese Erkrankungen vor allem im fortgeschrittenen Stadium immer noch häufig letal.

Es besteht also Bedarf neue, innovative Therapieansätze zu verfolgen und zu optimieren. Die Gentherapie ermöglicht die Umsetzung attraktiver Strategien zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Solche Strategien basieren entweder auf einem Gentransfer in Tumorzellen mit dem Ziel diese so zu modifizieren, dass sich daraus ein anti-Tumor Effekt ergibt (Überexpression immunmodulatorischer Faktoren, Suizidgene), oder auf der systemischen Überexpression solubler Faktoren, die zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen (z. B. antiangiogene Faktoren). Solche Ansätze konnten in jüngster Zeit erfolgreich in Tiermodellen umgesetzt werden. Ergebnisse aus klinischen Studien sind demgegenüber bislang enttäuschend ausgefallen. Limitationen der verwendeten Vektorsysteme werden dafür verantwortlich gemacht. Daher ist die weitere Optimierung der Vektorsysteme von entscheidender Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung des Tumor-Gentransfers in soliden Tumoren basierend auf dem Adeno-assoziierten Virus (AAV). AAV ist ein einzelsträngiges DNS-Virus. Auf dem Weg zur Transgen-Expression stellt die Doppelstrangsynthese einen wesentlichen limitierenden Schritt dar.

In dieser Arbeit wurden modifizierte AAV-Vektoren, die primär eine doppelsträngige DNS zur Verfügung stellen, im Hinblick auf die Effizienz des Tumor-Gentransfers unter *in vitro*-Bedingungen systematisch untersucht. Es wurden dazu AAV-Vektoren hergestellt, die primär eine doppelsträngige DNS zur Verfügung stellen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von doppelsträngigem AAV (dsAAV), bei dem etwa 10 % der Vektoren einer Präparation doppelsträngige DNS aufweisen, die Transduktionsrate in soliden Tumorzelllinien bis auf das 4-fache erhöht werden kann. Durch die Verwendung eines self-complementary AAV (scAAV) Vektors, bei dem in über 90 % Viren generiert werden, die eine doppelsträngige DNS aufweisen, konnte die Transduktionsrate weiter bis auf das bis zu 17-fache gegenüber konventionellen einzelsträngigen AAV gesteigert werden.

Der Abbau von AAV über Proteasomen wurde in Epithelien der Atemwege als ein Faktor charakterisiert, der für eine Verminderung der Gentransfer-Effizienz verantwortlich ist. In dieser Arbeit konnte durch Einsatz eines Proteasomen-Inhibitors (MG132) gezeigt werden, dass dieser Mechanismus auch für den Gentransfer in Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt. Dies trifft vor allem für die Tumorzelllinien zu, die durch MG132 nicht in die Apoptose getrieben werden. *In vitro* konnte somit durch kombinierte Verwendung von scAAV sowie

MG132 der Tumor-Gentransfer in bestimmten Zelllinien -wie zum Beispiel in der Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 um den Faktor 20- verbessert werden.

Bei der Anwendung der modifizierten AAV-Vektoren in einem HeLa-SCID-Mausmodell zeigte sich aber eine deutliche Abnahme der Gentransfer-Effizienz unter *in vivo*-Bedingungen. In vergleichenden Experimente an Tumor-Spheroide von HeLa-Zellen und einer humanen Neuroblastom-Zelllinie wurde herausgearbeitet, dass die extrazelluläre Matrix (ECM) eine hemmende Rolle beim AAV-vermittelten Gentransfers in HeLa-Spheroide ausübt, während sie beim Gentransfer in Tumoren neuronalen Ursprungs (Neuroblastom) signifikant geringer ausfällt.

Um AAV als Vektor für den *in vivo* Tumor-Gentransfer einsetzen zu können, müssen Strategien gefunden werden, um die Barriere, die durch die extrazelluläre Matrix gegeben ist, zu überwinden. Ein Targeting der Vektoren, das heißt, eine gezielte Veränderung des natürlichen Tropismus der Viren, stellt dazu einen attraktiven Lösungsansatz dar.

## Danksagung

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. Michael Hallek für die Vergabe des Themas und die Möglichkeit, die Versuche in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Durch die zahlreichen Labor- und Arbeitsgruppenbesprechungen war immer eine kontinuierliche Diskussion der Ergebnisse möglich.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Ulrich Hacker, der diese Arbeit mitbetreute, für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und Ideen. Außerdem danke ich ihm für die regelmäßigen Rücksprachen während des Schreibens der Arbeit, die die Probleme der örtlichen Entfernung etwas lindern konnten.

Für die Anregungen während der Versuche im Genzentrum gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Hildegard Büning, die mich bei der Etablierung des alkalischen Agarosegels und der Durchführung der Versuche *in vitro* sehr unterstützte und mir viele Anregungen gab.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Susan King. Ohne sie wären die Versuche im Mausmodell und deren Auswertung nicht möglich gewesen. Sie stand jederzeit für Fragen bereit, auch noch nachdem sie schon die Arbeitsgruppe verlassen hatte. Vielen Dank für die wissenschaftliche sowie technische Unterstützung und für die Abende und Wochenenden, die sie mit mir im Labor verbracht hat.

Frau Kristin Leike möchte ich für die präzise Vermittlung der *in vitro* Methoden und die technische Unterstützung danken.

Herrn Michael Hagemann danke ich für die Pflege der Versuchstiere und die fachkundige Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente.

Herrn Franz Gerner und Herrn Tobias Herold möchte ich für die Klonierung des selbstkomplementären AAV Vektors danken.

Frau Kerstin Lux und Herrn Nico Goerlitz gilt mein Dank für die Hilfe am konfokalen Laser-Mikroskop. Herrn Professor Lochmüller danke ich für die Erlaubnis das Mikroskop zu verwenden.

Der ganzen Arbeitsgruppe Hallek danke ich für die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken: meinem verstorbenen Vater, für den ich mich mit diesem Thema beschäftigt habe und meiner Mutter, die mir das Studium und diese Promotion ermöglicht hat und mich in jeder Hinsicht dabei unterstützte.

Zuletzt danke ich meinem Freund Matthias Nischwitz für seine Geduld, seine Fahrdienste, wenn es spät im Labor wurde und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

## Literaturverzeichnis

1. Abrial C, Mouret- Revnier MA, Amat S, Sillet- Bach I, Bougnoux P, Delva R, Cure H, Dauplat J, Penault- Llorca F, Chollet P: **Tumor parameters, clinical and pathological responses, medical management, and survival through time on 710 operable breast cancers.** *Med Oncol.* 2005; 22(3): 223-40
2. Adams J: **Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer,** *Current Opinion in chemical Biology* 2002, **6**: 493-500)
3. Alexander IE, Russel DW, Miller AD: **DNA damaging agents greatly increase the transduction of non dividing cells by adeno associated virus,** *J Virol* 1994, **68**: 8282- 8287
4. Alexander IE, Russel DW, Spence AM, Miller AD: **Effect of gamma irradiation on transduction of dividing and nondividing cells in the brain and muscle of rats by adeno- associated virus vectors.** *Hum Gene Ther* 1996; 7:841-50
5. Atchison RW, Castro BC, Hammon WM: **Adenovirus-associated defective virus particles.** *Science* 1965, **149**:754-756.
6. Berns KI: **Parvovirus replication.** *Microbiol Rev* 1990, **54**:316-329
7. Boulaiz H, Marchal JA, Prados J, Melguizo C, Aranega A: **Non-viral and viral vectors for gene therapy.** *Cell Mol Biol* 2005 Sep 2; 51(1): 3-22.
8. Braun-Falco M, Eisenried A, Büning H, Ring J: **Recombinant adeno-associated virus type 2- mediated gene transfer into human keratinocytes is influenced by both the ubiquitin/ proteasome pathway and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase.** *Arch Dermatol Res* 2005, 296: 528-535
9. Büning H, Braun- Falco M, Hallek M: **Progress in the Use of Adeno- Associated Viral Vectors for Gene Therapy.** *Cells Tissues Organs* 2004; 177: 139-150
10. Carmeliet P: **Angiogenesis in health and disease.** *Nat Med* 2003; 9(6): 653-60
11. Carter PJ, Samulski RJ: **Adeno- associated viral vectors as gene delivery vehicles.** *Int J Molecular Medicine* 2000, **6**: 17-27
12. Cavanazzo- Calvo M: **Gene Therapy of human severe combined immune deficiency (SCID)- X1 disease,** *Science* 2000, 288: 669- 672
13. Check E.: **Gene Therapy: a tragic setback,** *Nature* 2002, 402: 116-118
14. Chejanovsky N, Carter BJ: **Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication.** *Virology* 1989, **173**:120-128.
15. Chirmule N, Propert K, Magosin S, Quian R, Wilson J: **Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans,** *Gene Ther* 1999, **6**: 1574-1583
16. Davidoff AM *et al.* **rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice.** *Cancer Res* 2002; **62**: 3077-3083.

17. Davidoff AM *et al.* **Careful decoy receptor titering is required to inhibit tumor angiogenesis while avoiding adversely altering VEGF bioavailability.** *Mol Ther* 2005; **11**: 300-310.
18. De Laporte L, Rea JC, Shea LD: **Design of modular non-viral gene therapy vectors.** *Biomaterials* 27 (2006) 947-954.
19. Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J, Engelhardt JF: **Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus.** *Journal of Clinical Investigation* 2000, **105** (11): 1573- 1587
20. Enger PO *et al.*: **Adeno- Associated Viral vectors Penetrate Human Solid Tumor Tissue in vivo more effectively than Adenoviral vectors.** *Human Gene Therapy* 2002, **13**: 1115-1125
21. Farson D, Harding TC, Tao L, Liu J, Powell S, Vimal V, Yendluri S, Koprivnikar K, Ho K, Twitty C, Husak P, Lin A, Snyder RO, Donahue BA : **Development and characterization of a cell line for large scale, serum- free production of recombinant adeno-associated viral vectors.** *Gene Medicine* 2004; **6**(12): 1369-81
22. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ: **Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors.** *J Virol* 1996, **70**:3227-3234.
23. Galanis E, Vile R, Russel SJ: **Delivery systems intended for in vivo gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors,** *Oncology/ Hematology* 2001, **38**: 177- 192
24. Goncalves M AFV: **Adeno- associated virus: from defective virus to effective vector,** *J Virol* 2005, **2**:43
25. Gordon EM, Chen ZH, Liu L, Whitley M, Liu L, Wei D, Groshen S, Hinton DR, Anderson WF, Beart RW Jr, Hall FL: **Systemic administration of a matrix- targeted retroviral vector is efficacious for cancer gene therapy in mice.** *Hum Gen Ther* 2001; **20**; **12**(2): 193-204
26. Grimm D, Kay MA: **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* 2003, **3**:281-304.
27. Jain RK: **Normalizing of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy.** *Science* 2005, **37**: 58-62
28. Janouskova O, Nellessen T, Stokrova J, Jinoch P, Smahel M: **Delivery of recombinant adeno associated Virus by jet injection,** *International Journal of Molecular Medicine* 2003, **12**: 687-691
29. Jennings K, Miyamae T, Traister R, Marinov A, Katakura S, Sowders D, Trapnell B, Wilson J M, Gao G, Hirsch R: **Proteasome Inhibition Enhances AAV-Mediated Transgene Expression in Human Synoviocytes in Vitro and in Vivo.** *Molecular Therapy* 2005 **11**(4): 600-607
30. Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM:

**Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis.** *J Virol* 1996, **70**:520-532.

31. Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ: **Long term gene expression and phenotype correction using adeno associated virus vectors in the Mammalian brain.** *Nat Genet* 1994, **8**:148-153
32. Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, Nakamura T, Oshimi K, Daida H: **Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection.** *J Virol* 2005, **79**:609-614.
33. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK: **Method for Generation of Homogeneous Multicellular Tumor Spheroids Applicable to a Wide Variety of Cell Types,** *Biotechnology and Bioengineering* 2003, Vol. 83 No.2: 173-180
34. Kunke D, Grimm D, Denger S, Kreuzer J, Delius H, Komitowski D, Kleinschmidt JA: **Preclinical study on gene therapy of cervical carcinoma using adeno-associated virus vectors.** *Cancer Gene Therapy* 2000, **7**(5): 766-777
35. Leek RD, Harris AL, Lewis CE: **Cytokine network in solide human tumors: regulation of angiogenesis.** *J Leukoc Biol* 1994; **56**: 423-35
36. Li J, Zhou J, Chen G, Wang S, Xing H, Gao Q, Lu Y, He Y, Ma D: **Inhibition of ovarian cancer metastasis by adeno associated virus- mediated gene Transfer of nm 23 H1 in an orthopic implantation model.** *Cancer Gene Therapy* 2005, Sep 23 [ Epub ahead of print]
37. Linden RM, Winocour E, Berns KI: **The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:7966-7972.
38. Liu M, Acres B, Balloul JM, Bizouarne N, Paul S, Slos P, Squiban P: **Gene based vaccines and immunotherapeutics.** *PNAS* 2004; **101**(2): 14567- 14571
39. Lo HW, Day CP, Hung MC: **Cancer- specific gene therapy.** *Adv Genet.* 2005; **54**: 235-55
40. Löffler, Petrides: **Biochemie und Pathobiochemie,** 6.Auflage, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1998
41. Lundstrom K: **Latest development in viral vectors for gene therapy,** *Trends in Biotechnology* 2003, Vol.21 No.3
42. Maas G et al: **Recombinant Adeno- Associated Virus for the Generation of Autologous, Gene-Modified Tumor Vaccines: Evidence for a High Transduction Efficiency into Primary Epithelial Cancaer Cells,** *GeneTherapy* 1998, **9**: 1049-1059
43. Marone M, Scambia G, Ferrandina G, Gianitelli C, Benedetti- Panici P, Iacovella S, Leone A, Mancuso S: **Nm23 expression in endometrial and cervical cancer: inverse correlation with lymph node involvement and myometrial invasion.** *Br J Cancer* 1996, **74** (7): 1063-8

44. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ: **Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis.** *Gene Ther* 2001, **8**:1248-1254.
45. McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ: **Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo** *Gene Therapy*, 2003, **10**: 2112-2118
46. Moss RB, Rodman D, Spencer LT, Aitken ML, Zeitlin PL, Waltz D, Milla C, Brody AS, Clancy JP, Ramsey B, Hamblett N, Heald AE: **Repeated Adeno-Associated Virus Serotype 2 Aerosol-Mediated Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Gene Transfer to the Lungs of Patients With Cystic Fibrosis.** *Chest* 2004; **125**: 509-521
47. Nakai H, Storm TA, Kay MA: **Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver *in vivo*.** *J Virol* 2000, **74**:9451-9463.
48. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J: **Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.** *Cell* 1997; **88**(2):277-85
49. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: **Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma.** *Cell* 1994; **79**: 315-28
50. Peng D, Qiang C, Sun Y, Barajas MA, Prieto J: **Transduction of hepatocellular carcinoma using recombinant adeno associated virus in vitro and in vivo effects of genotoxic agents.** *J Hepatolog* 2000, **32** (6): 975-978
51. Perabo L, Büning H, Kofler DM, Ried MU, Girod A, Wendtner CM, Enssle J, Hallek M: **In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display.** *Molecular Therapy* 2003; **8**: 151-157
52. Pereira DJ, McCarty DM, Muzyczka N: **The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection.** *J Virol* 1997, **71**:1079-1088.
53. Philpott NJ, Giraud-Wali C, Dupuis C, Gomos J, Hamilton H, Berns KI, Falck-Pedersen E: **Efficient integration of recombinant adeno-associated virus DNA vectors requires a p5-rep sequence in cis.** *J Virol* 2002, **76**:5411-5421.
54. Philpott NJ, Gomos J, Berns KI, Falck-Pedersen E: **A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:12381-12385.
55. Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A: **Human fibroblast growth factor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2.** *Nat Med* 1999, **5**:71-77.

56. Rabinowitz JE, Samulski RJ: **Building a better vector: the manipulation of AAV virions.** *Virology* 2000, **278**:301-308.
57. Raj K, Ogston PH, Beard P: **Virus mediated killing of cells that lack p53 activity.** *Nature* 2001; 412: 914- 916
58. Russel DW, Alexander IE, Miller AD: **DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors.** *Proc Natl Acad Sci* 1995, Vol 92: 5719-5723
59. Samulski RJ, Sally M, Muzyczka N: **Adeno- Associated Viral Vectors. The development of human gene therapy** (T. Friedmann, Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press 1999, Cold Spring Harbor, NY
60. Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, Mandeli J, Woo SL: **Adenovirus- mediated genetransfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(9): 4802-07
61. Srivastara A, Lusby EW, Berns KI: **Nucleotide sequence and organization of adeno- associated virus 2 genome,** *J Virol.* 1983, **45**: 555-564.
62. Summerford C, Samulski RJ: **Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions.** *J Virol* 1998, **72**:1438-1445.
63. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ:  **$\alpha_v\beta_5$  integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection.** *Nat Med* 1999, **5**:78-82.
64. Tal J: **Adeno-Associated Virus- Based Vectors in Gene Therapy.** *JBiomed Sci* 2000; 7: 279-291
65. Teschendorf et al.: **rAAV as a vector for the in vitro and in vivo gene transfer into solid tumors.** *Molecular Therapy* 2001 Vol. 3 No. 5: 178
66. Wang L, Herzog RW: **AAV-mediated gene transfer for treatment of hemophilia.** *Curr Gene Ther.* 2005; 5(3): 349-60
67. Wilson DR: **Viral- mediated gene transfer for cancer treatment;** *Current Pharmacologic Biotechnology,* 2002; 3(2): 151-64
68. Wistuba A, Kern A, Weger S, Grimm D, Kleinschmidt J: **Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly.** *J Virol* 1997, **71**:1341-1352.
69. Wu DH, Liu L, Chen LH: **Antitumor effects and radiosensitization of cytosine deaminase and thymidine kinase fusion suicide gene on colorectal carcinoma cells.** *World J Gastroenterol* 2005, 11(20): 3051- 3055
70. Xiao X, Li J, Samulski RJ: **Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus.** *J Virol* 1998, **72**:2224-2232.

71. Xiao X, Li J, Samulski RJ: **Efficient long term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector.** *J Virol* 1996, **70**:8098-8108
72. Yakobson B, Hrynko TA, Peak MJ, Winocour E: **Replication of Adeno- Associated Virus in Cells irradiated with UV Light at 254nm,** *J Virol* 1989, **63**: 1023-1030
73. Yalkinoglu AO, Heilbronn R, Burkle A, Schlehofer JR, zur Hausen H: **DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress.** *Cancer Res* 1988, **48**:3123-3129.
74. Young SM Jr, Samulski RJ: **Adeno-associated virus (AAV) sitespecific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:13525-13530.
75. Yoo J, Choi S, Hwang KS, Cho WK, Jung CR, Kwon ST, Im DS: **Adeno- associated virus mediated gene transfer of a secreted form of TRAIL inhibits tumor growth and occurrence in an experimental tumor model;** *Journal of gene medicine* 2005, Sep 6 [Epub ahead of print]

## **Erklärung**

**gemäß § 2 Abs. 2 bis 4 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 01. Juni 1983 in der Fassung der siebten Änderungssatzung vom 01. Juni 2005**

Hiermit erkläre ich, diese Dissertation selbständig angefertigt zu haben, mich außer der angegebenen Hilfsmittel keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen zu haben.

Bisher habe ich an keiner anderen Doktorprüfung teilgenommen.

Die hier vorgelegte Dissertation wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, den 12.06.2006,  
Sandra Lutz

## **Lebenslauf**

Name: Sandra Lutz

Geburtsdatum/-ort: 12. Juni 1979 in Augsburg  
Adresse: Burgpflegerstr.1  
86316 Friedberg

### **Schule**

1985 –1989: Grundschule, Friedberg / Bayern  
1989- 1998: Rudolf-Diesel-Gymnasiums in Augsburg  
Juni 1998: Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Note: 1,6)

### **Studium**

seit September 1998: Studium der Humanmedizin an der LMU, München  
August 2000: Ärztliche Vorprüfung  
August 2001: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
September 2003: Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung  
Oktober 2003- März 2004: „Freisemester“ für die experimentelle Laborarbeit  
April 2005: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### **Pflegepraktika**

April 1999: Innere Medizin im Krankenhaus Friedberg / Bayern  
August 1999: Onkologische Tagesklinik, 1. Frauenklinik des Klinikums  
Innenstadt der LMU, München

### **Famulaturen**

Februar/ März 2001: Dr. H. Lang, Praktischer Arzt/ Naturheilverfahren, Augsburg  
Februar/ März 2002: Pathologisches Institut der LMU, München  
August/ September 2002: Psychiatrische Klinik der LMU, München  
März 2003: Anästhesie/ Intensivmedizin, Kaiser Franz- Josef- Spital, Wien,  
Österreich

## **Praktisches Jahr**

April- August 2004:

**Chirurgie** (zweimal 8 Wochen)

1. Teil: Princess Alexandra Hospital, University of Queensland, Brisbane, Australien

2. Teil: Singapore General Hospital, University of Singapore, Singapur

August- November 2004:

**Neurologie**

Städtisches Krankenhaus München- Harlaching

November 2004-Februar 2005: **Innere Medizin**

Medizinische Klinik Innenstadt der LMU, München

## **Berufserfahrung**

Juni – Dezember 2005:

Stipendium der Max-Planck- Gesellschaft als wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Assistenzärztin in der Neurologie des Max-Planck- Instituts für Psychiatrie in München

Seit Januar 2006:

Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Assistenzärztin in der Neurologie des Max- Planck- Instituts für Psychiatrie in München

## **Publikation**

Hacker UT, Wingenfeld L, Kofler DM, Schuhmann NK, Lutz S, Herold T, King SBS, Gerner FM, Perabo L, Rabinowitz J, McCarty DM, Samulski RJ, Hallek M, Büning H:

**Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency.**

J Gene Med. 2005 Nov 7(11): 1429-38

München, den 12.06.2006